زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹٤

بررسی کالوس‌زایی رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) در شرایط کشت بافت تحت تاثیر عوامل هورمونی، نوع ریزنمونه و زمان یادداشت‌برداری

کمال قاسمی بزدی*[۱]، حمید حیدری زادی[۲] و مینا ربیعی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۰

چکیده

رزماری (Rosemarinus officinalis L.) گیاهی است پایا، بسیار معطر با ساقه‌های چوبی که در داروسازی کاربردهای زیادی دارد. در تحقیق حاضر از دو نوع ریزنمونه میانگره و جوانه انتهایی گیاه رزماری بر روی محیط کشت MS حاوی ۸ ترکیب هورمونی مختلف شامل NAA، 2,4-D، BAP و کینتین استفاده شد. سه زمان مختلف در فاصله‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز پس از کشت به عنوان زمان‌های یادداشت‌برداری در نظر گرفته شد و درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار بررسی شد. بر اساس نتایج، میزان کالوس‌زایی تحت تأثیر زمان یادداشت‌برداری، نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی و اثرات متقابل صفات در سطح یک درصد معنی‌دار بود. بهترین کالوس‌زایی، ۴۰ روز پس از کشت مشاهده شد و درصد کالوس‌زایی ریزنمونه میانگره (۴۲/۱ درصد) بالاتر از جوانه انتهایی (۳۵/۹ درصد) بود. بالاترین میزان کالوس‌زایی (۹۳/۳ درصد) مربوط به ریزنمونه میانگره در زمان ۴۰ روز پس از کشت بر روی محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد و کمترین میزان کالوس‌زایی نیز (۵ درصد) به محیط کشت بدون هورمون تعلق داشت که نشان دهنده ضرورت منابع هورمونی در محیط کشت است. از بین سیتوکینین‌های مورد استفاده، BAP بهتر از کینتین بود و از میان اکسین‌ها نیز NAA نقش بهتری نسبت به 2,4-D داشت.

واژگان کلیدی: اکسین، تکثیر، سیتوکینین، کشت درون شیشه‌ای

[۱]* عضو هیات علمی (دانشیار) سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، ایران، پست الکترونیک نویسنده مسئول: kamalghasemi@gmail.com
[۲] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور البرز، کرج، ایران.
[۳] عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه پیام نور البرز، کرج، ایران.

مقدمه

گیاهان دارویی، از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان متمادی از آنها استفاده کرده است و در شرایط فعلی نه تنها ارزش خود را در زمینه تولید دارو از دست نداده‌اند، بلکه اهمیت آنها روز به روز درحال گسترش است؛ چنانچه برخی از داروهای گران قیمت مانند تاکسول و یا برخی از ترکیبات دارویی پرمصرف نظیر آسپرین و دیجی‌توکسین، تنها از منابع‌گیاهی به دست می‌آیند و برخی از آنها مخصوص گیاهان جنگلی و مرتعی هستند (قاسمی بزدی و رمضانی مقدم، ۱۳۹۱).

ایران با دارا بودن شرایط مختلف آب و هوایی و برخورداری از منابع عظیم گیاهان دارویی می‌تواند در زمینه تولید گیاهان دارویی پیشرو باشد و از پتانسیل‌های موجود در این گیاهان بهره ببرد. با توجه به این‌که بسیاری از گیاهان دارویی با استفاده از روش‌های مرسوم قابل تولید نمی‌باشند و روش‌های دیگری همچون تکثیر غیرجنسی برای ازدیاد و اصلاح آنها استفاده می‌شود (Shimomura et al., 1997)، لذا کشت سلول و بافت گیاهی روشی کارآمد و مفید جهت تولید این گونه گیاهان می‌باشد و از این روش جهت تولید گیاهان دارویی استفاده وسیع و گسترده‌ای می‌شود (قاسمی بزدی و احمدی، ۱۳۸۸).

یکی از مهم‌ترین عوامل در ریزازدیادی گیاهان دارویی، تاثیر تنظیم کننده‌های رشدی و اثرات متقابل آنها بر این گیاهان است. وجود سطوح مختلف سیتوکینین برای تکثیر اکثر گونه‌های دارویی ضروری است ولی باید با آزمایش، مقادیر بهینه آن را برای گونه‌های مختلف تعیین نمود. مشخص شده است که وجود مقادیر کم اکسین در محیط کشت یک مانع عمده در راه تکثیر ساقه می‌باشد، اما این مسئله باید در هر گیاهی مورد بررسی قرار گیرد (قاسمی بزدی و احمدی، ۱۳۸۸).

رزماری یا اکلیل کوهی با نام علمی *Rosmarinus officinalis* L از تیره نعنا، گیاه دارویی پایا، بسیار معطر و دارای ساقه‌های چوبی است که به‌علت دارا بودن برگ‌های سبز دایمی و زیبایی خاص و بوی مطبوع آن، در اغلب نواحی به‌صورت تزئینی پرورش می‌یابد. گل‌های آن بوی قوی ولی مطبوعی دارند و برگ‌های آن دارای بو و طعم مخصوص، معطر و کمی تند هستند (زرگری، ۱۳۹۰). این گیاه کاربردهای زیادی در داروسازی دارد از جمله مسهل، قابض، ضد نفخ، معرق، دیورتیک تسریع کننده‌ی زایمان، قاعده‌آور، تب‌بر، محرک و مقوی معده بوده و در رفع مشکلات عصبی کاربرد دارد و به‌عنوان ادویه (چاشنی) در غذاها نیز استفاده می‌شود. از اسانس رزماری در فراورده‌های بهداشتی، صابون‌ها، عطرها، دئودورانت‌ها و تونیک‌های مو استفاده می‌شود و باکتری‌کش، قارچ‌کش و حشره‌کش محسوب می‌شود. عصاره‌ی رزماری آنتی‌اکسیدان است و دارای اثر مدر، ضد تشنج، صفرابر، مقوی معده و نیرو دهنده بسیار قوی است. در رفع زردی، تورم کبد و انسداد مجاری آن موثر است و موارد متعدد دیگری از کاربردها را دارا می‌باشد (زرگری، ۱۳۹۰؛ Dong et al., 2012; Saltan & Ozaydin, 2013).

تکثیر گیاه رزماری از طریق کشت بذر، خوابانیدن و قلمه صورت می‌گیرد که روش قلمه معمول‌تر است. البته با استفاده از این روش، تعداد محدودی گیاه با توجه به حجم خزانه در دسترس خواهد بود و تعداد کمی پایه‌های مادری اولیه تولید می‌شود، ضمن این‌که کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان کشت شده در مزرعه به دلیل قرار گرفتن در معرض تنش‌های حاصل از تغییرات فصلی یکنواخت نیست (Dellacassa et al., 1999). ازدیاد رزماری از طریق بذر نیز زیاد مورد توجه نمی‌باشد. با توجه به این‌که در حالت تکثیر با این روش‌ها تعداد کمی پایه‌های مادری اولیه تولید می‌شود، استفاده از تکنیک‌های کشت بافت می‌تواند

راه حل کارآمد و مفیدی برای غلبه بر مشکلات تکثیر این گیاه باشد (قاسمی بزدی و رمضانی مقدم، ۱۳۹۱).

کشت بافت گیاهی به‌عنوان ابزاری برای حفاظت و تکثیر سریع گیاهان دارویی و همچنین برای فراهم نمودن منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه به‌کار برده می‌شود (Nagesh et al., 2010)، اما تا کنون بجز پژوهش نصیری و همکاران (۱۳۹۰)، تحقیقات زیادی در مورد تکثیر درون شیشه‌ای رزماری در ایران انجام نشده است. آنها آزمایش‌هایی را به منظور تعیین بهترین شرایط تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های رزماری در سطوح مختلف IBA و BAP انجام دادند که بیشترین میزان کالوس از کشت ریزنمونه‌های برگی در تیمار حاوی ۱۰ میکرومولار IBA در ترکیب با ۱۰ و ۵ میکرومولار BAP به‌دست آمد. مناسب‌ترین تیمار جهت القای اندام هوایی از قطعات گره‌دار، ترکیب حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بود. تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA نیز بهترین تیمار در تولید ریشه‌زایی ریزنمونه‌های رزماری بود.

در مورد کشت بافت رزماری در خارج از کشور، گزارش‌هایی بر روی کالوس‌زایی (Caruso et al., 2000; Yesil-Celiktas et al., 2007; Fayaz et al., 2008; Mondo, 2009; Dong et al., 2012)، باززایی (Misra & Chaturvedi, 1991; Yang et al., 1997; Huang & Tsai, 2004) و ریزازدیادی (Gabor-Potor & Pop, 2007) در دسترس هستند، با این وجود برای اهداف تجاری، تکثیر سریع، تجدیدپذیر و در مقیاس وسیع لازم است. در میان تکنیک‌های کشت بافت گیاهی، جنین‌زایی سوماتیکی، پروتکل انعطاف‌پذیر و موثری را برای باززایی گیاه ارائه می‌دهد (Xie et al., 2013).

Dong و همکاران (2012) در کشت برگ رزماری به‌عنوان جداکشت نشان دادند که غلظت بالای ساکارز باعث افزایش القای کالوس و باززایی گیاه می‌شود. در محیط کشت MS با غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هرکدام از هورمون‌های BA و NAA به همراه ۵۰ گرم بر لیتر ساکارز بهترین نتیجه را با نرخ القای کالوس ۸۸/۸ درصد نشان داد. بر اساس نتایج Huang & Tsai (2004)، در شرایط درون شیشه‌ای رزماری، غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هرکدام از هورمون‌های BA و 2,4-D در محیط کشت، بهترین نتیجه را در کالوس‌زایی داشتند و همچنین در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA میزان باززایی گیاه افزایش یافت.

Misra & Chaturvedi (1991) در تحقیقی نشان دادند که اثر سیتوکینین در تمایز جوانه ساقه گیاه رزماری تا حد زیادی توسط نمک‌های معدنی تحت تاثیر قرار گرفته است. آنها اظهار داشتند با توجه به این‌که در حضور NH_4NO_3 و KNO_3 برای القای تمایز جوانه ساقه، علاوه بر مکمل‌ها هورمون رشد نیز ضروری است، برای تمایز مطلوب جوانه ساقه با غلظت حداقل ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر NH_4NO_3 و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر KNO_3 به بهترین نتیجه منجر شد.

Nourin & Humera (2014) از ریزنمونه‌های برگ جوان رزماری توسط غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با BA بر روی محیط کشت تغییر یافته WPM به جنین‌زایی سوماتیکی دست یافتند. بهترین فراوانی القای کالوس در محیط کشت حاوی ۲/۲۵ میکرومول 2,4-D و ۰/۴۵ میکرومول BA بود که ۱۰۰ درصد کالوس‌های تولید شده، جنین‌های سوماتیک تولید کردند.

لذا با توجه به ارزش دارویی بالای گیاه رزماری و به علت این‌که تحقیقات زیادی در مورد کشت درون شیشه‌ای این گیاه در دنیا انجام نشده است و در ایران نیز هنوز تحقیق جامعی در این زمینه صورت نگرفته است، پژوهش‌های درون شیشه‌ای بر روی این گیاه ضروری به‌نظر می‌رسند.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی و کشت بافت موسسه تحقیقات پنبه کشور در شهرستان گرگان طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ انجام شد. جهت انجام آزمایش از دو نوع ریزنمونه میانگره و جوانه انتهایی گیاه رزماری بر روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ویتامین‌های B_5 (Gamborg et al., 1968) حاوی ۸ ترکیب هورمونی مختلف با استفاده از هورمون‌های NAA، 2,4-D، BAP و کینتین استفاده شد (جدول ۱).

جهت سترون‌سازی ریزنمونه‌ها از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۵ درصد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و پس از آن ریزنمونه‌ها سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب دو بار تقطیر استریل شستشو و کشت شدند. شیشه‌های کشت به اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند و هر ۳ هفته یک بار ریزنمونه‌ها واکشت شدند. سه زمان مختلف در فاصله‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز پس از تاریخ کشت به عنوان زمان‌های یادداشت‌برداری در نظر گرفته شد و درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۲۰ ریزنمونه در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MstatC انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) صورت گرفت. در نهایت بر اساس نتایج تجزیه آماری، مناسب‌ترین ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت و زمان یادداشت‌برداری جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری تعیین و ثبت شد.

جدول ۱- نوع و غلظت ترکیبات به‌کار رفته در محیط کشت‌های مورد استفاده در تحقیق

کد محیط‌کشت	عناصر محیط کشت	هورمون‌ها				ساکارز (گرم بر لیتر)	آگار (گرم بر لیتر)	pH
		NAA	BAP	2,4-D	Kin			
MS_0	عناصر معدنی MS و ویتامین‌های B_5	۰	۰	۰	۰	۳۰	۶/۵	۵/۸-۵/۶
MS_1		۰/۵	۰	۰	۰			
MS_2		۰/۵	۲	۰	۰			
MS_3		۰	۲	۰	۰			
MS_4		۰	۲	۰/۵	۰			
MS_5		۰	۰	۰/۵	۰			
MS_6		۰/۵	۰	۰	۲			
MS_7		۰	۰	۰	۲			

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تأثیر عوامل مختلف مورد بررسی بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های گیاه رزماری در جدول شماره ۲ ارایه شده است.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تأثیر عوامل نوع ریزنمونه، زمان یادداشت‌برداری و ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثرات متقابل این فاکتورها بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
زمان یادداشت‌برداری (N)	۲	۱۱۹۶/۵۳**
ریزنمونه (E)	۱	۱۸۳۷/۰۱**
N × E	۲	۲۹۸/۳۶ns
محیط کشت (M)	۷	۱۳۴۲۵/۹۷**
N × M	۱۴	۴۳/۲۹ns
E × M	۷	۳۷۷۶/۱۲**
N × E × M	۱۴	۴۶/۱۶ns
اشتباه	۱۴۴	۱۲۳/۵۸
ضریب تغییرات (CV%)		۲۸/۵

ns: غیر معنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)، میزان کالوس‌زایی تحت تأثیر زمان یادداشت‌برداری، نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثر متقابل ریزنمونه × ترکیبات هورمونی قرارگرفت.

در جدول شماره ۳، میانگین درصد کالوس‌زایی در مورد فاکتورهای اثر نوع ریزنمونه رزماری، ترکیبات هورمونی موجود در محیط کشت MS و اثرات متقابل این فاکتورها به روش آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفته است. باتوجه به نتایج، میزان کالوس‌زایی در بین دو ریزنمونه مورد بررسی متفاوت بود. درصد کالوس‌زایی ریزنمونه میانگره (۴۲/۱ درصد) بالاتر از جوانه انتهایی (۳۵/۹ درصد) بود. بنابراین برای تولید کالوس گیاه رزماری بهتر است از ریزنمونه‌های میانگره استفاده کرد، ضمن این‌که این نوع ریزنمونه قدرت زنده‌مانی بهتری بر روی محیط کشت نشان داد.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثرات متقابل این فاکتورها بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری به روش آزمون LSD

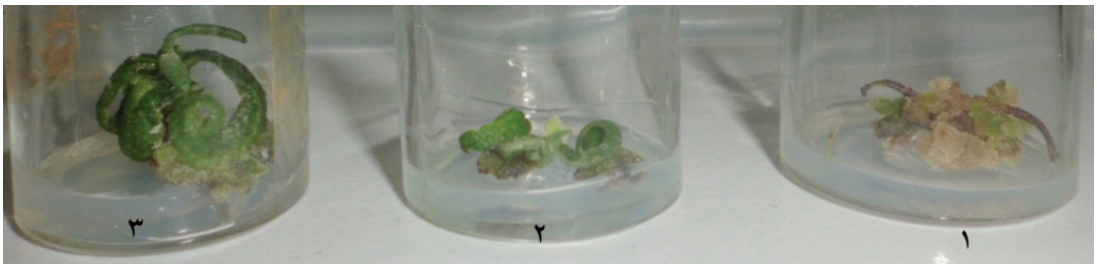
ردیف	کد محیط کشت	ترکیبات هورمونی محیط کشت (میلی‌گرم بر لیتر)	نوع ریزنمونه: میانگره		نوع ریزنمونه: جوانه انتهایی		میانگین ترکیبات هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	
۱	MS_0	MS	۷/۲۰	i	۶/۵۰	i	۶/۸۰	e
۲	MS_1	MS+NAA(0.5)	۳۶/۹	f	۶۲/۸	cd	۴۹/۹	b
۳	MS_2	MS+NAA(0.5)+BAP(2)	۸۸/۳	a	۵۷/۴	d	۷۲/۹	a
۴	MS_3	MS+BAP(2)	۱۵/۱	ghi	۲۲/۱	g	۱۸/۷	d
۵	MS_4	MS+2,4-D(0.5)+BAP(2)	۶۷/۵	c	۴۰/۸	ef	۵۴/۲	b
۶	MS_5	MS+2,4-D(0.5)	۳۳/۳	f	۴۷/۹	e	۴۰/۶	c
۷	MS_6	MS+NAA(0.5)+^{Kin}(2)	۷۸/۷	b	۳۳/۳	f	۵۶/۰	b
۸	MS_7	MS+^{Kin}(2)	۹/۶۰	hi	۱۶/۲	gh	۱۲/۹	de
		میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه (درصد)	۴۲/۱	a	۳۵/۹	b	–	

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری (در سطح احتمال ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی مختلف (جدول ۳)، بالاترین میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها با ۷۲/۹ درصد بر روی محیط کشت MS_2 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد. این مسئله نشان داد که اولا استفاده

توام از مقادیر بالای اکسین و سیتوکینین موجب پدید آمدن شرایط بهتری برای کشت بافت ریزنمونه‌های رزماری شده است. دوم این‌که، کمترین میزان کالوس‌زایی به محیط کشت شاهد MS_0 بدون هورمون تعلق داشت. بنابراین، حضور منابع هورمونی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت توانسته است نقش به‌سزایی در عکس‌العمل ریزنمونه‌ها بازی کند. ترنگ و مقصودی (۱۳۹۱) نیز با مطالعه بر روی گیاه سوسن این نتیجه را که کالوس‌زایی در حضور دو هورمون اکسین و سیتوکینین افزایش می‌یابد تایید کردند.

نتایج جدول ۳ نشان داد که حضور یکی از دو هورمون اکسین و سیتوکینین در محیط کشت به اندازه وجود هر دوی آنها تاثیرگذار نبوده است. بالاترین میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت‌هایی مشاهده شد که در ترکیب آنها از هر دو نوع هورمون اکسین و سیتوکینین استفاده شده بود. با وجود این، نوع منبع اکسین یا سیتوکینین نیز نقش داشتند، به‌طوری که بالاترین میزان کالوس‌زایی بر روی محیط کشت‌هایی بود که در ترکیب آنها از هورمون‌های BAP و NAA استفاده شده بود. بنابراین بر اساس نتایج آزمایش، با وجود این‌که هردو نوع هورمون اکسین و سیتوکینین در ترکیب محیط کشت ضروری به نظر می‌رسیدند، اما از بین سیتوکینین‌های مورد استفاده، BAP بهتر از کینتین عمل کرد (شکل ۱) و از میان دو نوع اکسین مورد تحقیق نیز NAA نقش بهتری را نسبت به 2,4-D بازی کرد. لذا بهترین نتیجه بر روی محیط کشت MS_2 حاوی BAP و NAA مشاهده شد. محیط کشت‌های MS_4 و MS_6 حاوی هر دو نوع ترکیب هورمونی BAP و 2,4-D و همچنین کینتین و NAA با وجود این‌که نسبت به محیط کشت MS_2 اختلاف معنی‌داری داشتند و در گروه پایین‌تری قرار گرفتند، اما در مورد کالوس‌زایی، بالاتر از زمانی بودند که از یکی از هورمون‌ها به تنهایی استفاده شده بود.



شکل ۱- مقایسه کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری ۶۰ روز پس از کشت شامل: ۱) ریزنمونه میانگره بر روی محیط کشت MS_2 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ و ۳) به ترتیب ریزنمونه‌های میانگره و جوانه انتهایی بر روی محیط کشت MS_6 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA.

در صورت استفاده از یکی از منابع هورمونی، اختلافات معنی‌داری بین ریزنمونه‌ها از نظر خصوصیات مورد بررسی مشاهده شد. به عنوان مثال، در صورت استفاده از منابع اکسینی، درصد موفقیت کالوس‌زایی، بالاتر از زمانی بود که از سیتوکینین استفاده شد. در مورد اکسین‌ها به تنهایی نیز، میزان کالوس‌زایی بر روی محیط کشت حاوی NAA با ۴۹/۹ درصد به‌طور معنی‌داری بیشتر از زمانی بود که از 2,4-D به عنوان منبع اکسین استفاده شد (۴۰/۷ درصد). همین خصوصیت برای سیتوکینین BAP (۱۸/۷ درصد) بیشتر از کینتین (۱۲/۹) مشاهده شد (جدول ۳).

از داده‌های جدول ۳ می‌توان نتیجه گرفت که برای کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری وجود اکسین در محیط کشت لازم است. چنانچه مشخص است کمترین درصدها مربوط به محیط کشت‌هایی بودند که در آنها اکسین وجود نداشت (MS_0، MS_3 و MS_7). حضور اکسین هم خود بستگی به نوع اکسین به‌کار رفته در محیط کشت دارد، به‌طوری که در صورت کاربرد

اکسین از نوع NAA، تأثیر بیشتری نسبت به زمانی مشاهده شد که از 2,4-D به عنوان منبع اکسین استفاده شده بود.

برای دستیابی به درصد بالای کالوس‌زایی، با توجه به این‌که کالوس‌زایی در دو فاز تمایززدایی و رشد توده سلولی رخ می‌دهد (قاسمی بزدی و احمدی، ۱۳۸۸)، لذا برای این دو مرحله به ترکیب هر دو هورمون نیاز می‌باشد. در این میان، اکسین کار تمایززدایی را انجام می‌دهد (قاسمی بزدی و رمضانی مقدم، ۱۳۹۱). بر اساس نتایج آزمایش، عکس‌العمل ریزنمونه‌های رزماری نسبت به NAA به تنهایی بالاتر از 2,4-D مشاهده شد و در ترکیب با BAP به میزان ۲ میلی‌گرم بر لیتر بهتر از ترکیب آن با کینتین بود.

بر اساس نتایج میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی محیط کشت بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها (جدول ۳)، بالاترین میزان کالوس‌زایی (۸۸/۳ درصد) در ریزنمونه میانگره در محیط کشت MS_2 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد. کالوس‌زایی در ریزنمونه میانگره نشان داد که حضور اکسین و سیتوکینین با هم در محیط کشت باعث افزایش درصد کالوس‌زایی در حد معنی‌داری شده است و حضور هر کدام از این هورمون‌ها به تنهایی این مقدار را کاهش داده است و در صورتی که در محیط کشت هیچ کدام از هورمون‌ها حضور نداشتند این درصد به کمترین مقدار خود یعنی ۶/۵ درصد کاهش یافت که مربوط به ریزنمونه جوانه انتهایی در محیط کشت MS_0 بود. در تحقیقات اربابیان و مغانلو (۱۳۸۸) بر روی گیاه گون گچی هم نتایج مشابهی به‌دست آمد و حضور اکسین و سیتوکینین در محیط کشت باعث افزایش درصد کالوس‌زایی شد. حقیقت حور و همکاران (۱۳۹۰) نیز نشان دادند که در گیاه *Papaver pesudo orintale* در محیط کشتی که هیچ کدام از دو هورمون در آن حضور نداشتند، کمترین کالوس‌زایی مشاهده شد. شرفی و همکاران (۱۳۸۷) بر روی گیاه دارویی *Artemisia annua* و ولی‌زاده و همکاران (۱۳۸۷) در گیاه زیره پارسی به این نتیجه رسیدند که برای کالوس‌زایی بهتر، حضور اکسین NAA و سیتوکینین BAP لازم است و تمام آنها بالاترین درصد کالوس‌زایی را در محیط کشت‌های حاوی هورمون‌های NAA و BAP مشاهده کردند.

در ریزنمونه جوانه انتهایی، بالاترین درصد کالوس‌زایی (۶۲/۸ درصد) بر روی محیط کشت MS_1 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد، اما کمترین مقدار کالوس‌زایی در جوانه انتهایی مربوط به محیط کشت بدون هورمون MS_0 بود (جدول ۳). از این نتایج چنین برداشت می‌شود که کالوس‌زایی ریزنمونه‌های جوانه انتهایی و میانگره در محیط کشت بدون اکسین و سیتوکینین کمترین مقدار بود. اما با توجه به این‌که بهترین کالوس‌زایی در ریزنمونه جوانه انتهایی مربوط به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بدون سیتوکینین ولی در ریزنمونه میانگره در محیط کشت MS_2 حاوی هر دو نوع هورمون مشاهده شد، نشان دهنده تاثیر متفاوت هورمون‌های مختلف بر ریزنمونه‌های متفاوت بود. لذا با توجه به این‌که در مورد بررسی اثرات هر فاکتور، می‌تواند نتایج متفاوتی وجود داشته باشد، برای هر هدف و منظوری باید بهینه‌ترین شرایط بر اساس آزمایش تعیین شود.

پژوهش Zhao و همکاران (2010) نشان داد که وجود اکسین به همراه سیتوکینین سبب افزایش نقش سیتوکینین می‌شود. بنابراین در تحقیق حاضر اثر مثبت اکسین و سیتوکینین در کالوس‌زایی منطقی است. محیط کشت MS_2 و MS_4 هر دو دارای ترکیبی از اکسین و سیتوکینین بودند و در هر دوی آنها از سیتوکینین BAP به مقدار ۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شده بود و تفاوت آنها فقط در نوع اکسین بود. با توجه به این‌که در کالوس‌زایی ریزنمونه میانگره بین این دو نوع اکسین به تنهایی تفاوت زیادی مشاهده نشد (۳۶/۹ و ۳۳/۳ درصد، به ترتیب در محیط کشت‌های MS_1 و MS_5) ولی در زمان ترکیب با سیتوکینین تفاوت معنی‌داری وجود داشت به گونه‌ای که در صورت استفاده از NAA به همراه BAP، درصد کالوس‌زایی در میانگره به ۸۸/۳ درصد رسید و برای همین ریزنمونه استفاده از 2,4-D به جای NAA همراه با BAP درصد

کالوس‌زایی را به ۶۷/۵ درصد کاهش داد (جدول ۳). این مسئله نشان دهنده اهمیت و تأثیر متقابل نوع هورمون‌ها در ترکیب با یکدیگر برای کالوس‌زایی بهتر می‌باشد. وقتی از ترکیب NAA با سیتوکینین دیگر یعنی کینتین به همان مقدار ۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد باز هم کالوس‌زایی از ۸۸/۳ درصد در میانگره به ۷۸/۷ درصد و در جوانه انتهایی از ۵۷/۴ درصد به ۳۳/۳ درصد کاهش پیدا کرد. این مسئله نشان می‌دهد که NAA و BAP می‌توانند دارای اثر ترکیب‌پذیری بهتری با یکدیگر باشند.

نتایج مقایسه میانگین اثر زمان یادداشت‌برداری بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری (جدول ۴) نشان داد که ریزنمونه‌های مورد بررسی نسبت به زمان‌های مختلف یادداشت‌برداری عکس‌العمل‌های متفاوتی نشان دادند. بیشترین میزان کالوس‌زایی در تاریخ دوم یادداشت‌برداری (پس از ۴۰ روز) مشاهده شد.

نتایج میانگین اثر متقابل زمان یادداشت‌برداری و ترکیبات هورمونی بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها (جدول ۴) نشان داد که محیط کشت MS_2 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در مدت زمان ۴۰ روز پس از کشت دارای بالاترین میزان کالوس‌زایی (۸۰ درصد) بود و پس از آن همین محیط کشت در یادداشت‌برداری ۶۰ روز پس از کشت با مقدار ۷۳/۳ درصد قرار گرفت. کم‌ترین مقدار نیز در تمام زمان‌های یادداشت‌برداری مربوط به محیط کشت MS_0 بود.

در مجموع، اثر متقابل ترکیبات مختلف هورمونی محیط کشت و زمان یادداشت‌برداری بر میزان کالوس‌زایی رزماری تأثیرات متفاوتی داشت به گونه‌ای که با وجود این‌که محیط کشت MS_2 در هر کدام از زمان‌های یادداشت‌برداری، بالاترین درصد کالوس‌زایی را در آن زمان مربوطه داشت، ولی چون خود کالوس‌زایی می‌تواند با زمان یادداشت‌برداری، اثر متقابل داشته باشد، لذا انتخاب بالاترین درصد کالوس‌زایی در زمان مناسب یادداشت‌برداری اهمیت خواهد داشت. در تاریخ ۲۰ روز پس از کشت، کالوس‌زایی تازه شروع به افزایش نمود، در ۴۰ روز پس از کشت به بالاترین حد خود رسید و پس از آن به‌دلیل کاهش زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، با گذشت زمان، درصد کالوس‌های مناسب قابل شمارش نیز کاهش یافت.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثر زمان یادداشت‌برداری، ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثرات متقابل این فاکتورها بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری به روش آزمون LSD

ردیف	کد محیط کشت	زمان یادداشت‌برداری (روز پس از کشت)						میانگین ترکیبات هورمونی (میلی‌گرم بر لیتر)	
		۲۰		۴۰		۶۰			
۱	MS0	۵/۳۰	k	۹/۷۰	jk	۵/۵۰	k	e	۶/۸۰
۲	MS1	۴۵/۹	fgh	۵۶/۶	c-f	۴۷/۱	fgh	b	۴۹/۹
۳	MS2	۶۵/۳	bc	۸۰/۰	a	۷۳/۳	ab	a	۷۲/۹
۴	MS3	۱۴/۸	ijk	۲۲/۳	i	۱۸/۱	ij	d	۱۸/۷
۵	MS4	۵۱/۲	d-g	۶۰/۶	cde	۵۰/۶	efg	b	۵۴/۲
۶	MS5	۳۹/۴	h	۴۵/۰	gh	۳۷/۵	h	c	۴۰/۶
۷	MS6	۵۳/۷	d-g	۶۱/۹	cd	۵۲/۵	d-g	b	۵۶/۰
۸	MS7	۱۲/۵	ijk	۱۵/۶	ijk	۱۰/۶	jk	de	۱۲/۹
	میانگین زمان یادداشت‌برداری (روز)	۳۶/۰۲	b	۴۳/۹۶	a	۳۷/۰۲	b		-

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری (در سطح احتمال ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

از مجموع نتایج جدول ۴ چنین استنباط می‌شود که برای اندازه‌گیری خصوصیات مختلف در کشت بافت رزماری باید زمان‌های متفاوتی را به‌عنوان تاریخ یادداشت‌برداری در نظر گرفت، به‌طوری که در مورد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها، ۴۰ روز پس از کشت اولیه آنها جواب مناسب‌تری داشته است. به دلیل کاهش درصد زنده‌مانی آنها با گذشت زمان و همچنین از بین رفتن تعدادی از ریزنمونه‌های باززا شده، بهتر است در مجموع، یادداشت‌برداری‌ها در آخرین تاریخی صورت گیرد که درصد عکس‌العمل آنها به خصوصیت مورد نظر به‌طور معنی‌داری شروع به کاهش نکرده باشد. چنین مواردی در هنگام ریزازدیادی قلمه‌ها زمانی که هدف تولید تعداد بیشتری جوانه در زمان جنین‌زایی سوماتیکی باشد مهم خواهد بود.

بر اساس نتایج اثر متقابل زمان یادداشت‌برداری و نوع ریزنمونه (جدول ۵)، ریزنمونه میانگره در تاریخ ۴۰ روز پس از کشت، بالاترین درصد کالوس‌زایی را به میزان ۴۷/۲ درصد نشان داد.

جدول ۵- اثر متقابل زمان یادداشت‌برداری و نوع ریزنمونه بر میزان کالوس‌زایی رزماری

ردیف	زمان یادداشت‌برداری (روز پس از کشت)	نوع ریزنمونه: میانگره		نوع ریزنمونه: جوانه انتهایی		میانگین زمان یادداشت‌برداری (روز)	
۱	۲۰	bc	۳۶/۹	c	۳۵/۱	b	۳۶/۰۲
۲	۴۰	a	۴۷/۲	b	۴۰/۸	a	۴۳/۹۶
۳	۶۰	ab	۴۲/۲	c	۳۱/۸	b	۳۷/۰۲
میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه (درصد)		a	۴۲/۱	b	۳۵/۹		-

میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری (در سطح احتمال ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

در مقایسه بین ریزنمونه‌ها مشاهده می‌شود که هرچه از تاریخ کشت، زمان بیشتری می‌گذشت، ریزنمونه‌های میانگره نتایج بهتری نسبت به ریزنمونه‌های جوانه انتهایی در همان زمان مشخص داشتند. مثلا در زمان ۲۰ روز پس از کشت که دو نوع ریزنمونه تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، میزان کالوس‌زایی آنها در یادداشت‌برداری ۶۰ روز پس از کشت کاملا متفاوت شد و در گروه‌های متمایزی از یکدیگر قرار گرفتند. این نشان دهنده قدرت زنده‌مانی بالاتر و دوام بیشتر کالوس‌ها در ریزنمونه میانگره بود. در مجموع، میانگره نسبت به جوانه انتهایی دارای کالوس‌زایی بهتری بود و لذا برای کالوس‌زایی در گیاه رزماری بهتر است از میانگره‌ها استفاده شود.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه طرفه زمان یادداشت‌برداری، نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی محیط کشت (داده‌ها، به دلیل حجم زیاد، نشان داده نشده‌اند)، بالاترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه میان‌گره در زمان ۴۰ روز پس از کشت بر روی محیط کشت MS_2 به میزان ۹۳/۳ درصد بود و کم‌ترین میزان کالوس‌زایی (۵ درصد) نیز به محیط کشت بدون هورمون تعلق داشت.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، کالوس‌زایی ریزنمونه‌های رزماری در ۲۰ روز اول پس از کشت شروع به افزایش کرد و در ۴۰ روز به بالاترین مقدار خود رسید و در ۶۰ روز دوباره کم شد. بهترین ریزنمونه جهت کالوس‌زایی رزماری، میانگره بود و بر روی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر

لیتر NAA بالاترین میزان کالوس‌زایی مشاهده شد و کمترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها نیز متعلق به محیط کشت بدون هورمون بود. بنابراین، حضور منابع هورمونی در محیط کشت توانست نقش به‌سزایی در عکس‌العمل ریزنمونه‌ها بازی کند و استفاده توام از مقادیر بالای اکسین و سیتوکینین موجب پدید آمدن شرایط بهتری برای کشت بافت ریزنمونه‌های رزماری شد.

سپاسگزاری

از کلیه همکاران محترم در آزمایشگاه‌های موسسه تحقیقات پنبه کشور، بخصوص آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی موسسه و آقای میثم گل‌پرور و خانم خجسته مهدویان که همکاری لازم را در انجام هرچه بهتر آزمایش نمودند سپاس‌گزاری می‌شود

منابع:

اربابیان، ص. و مغانلو، م. (۱۳۸۸). بررسی نوع غلظت برخی تیمارهای هورمونی در کشت بافت گونه در معرض انقراض گون گچی. فصلنامه زیست شناسی تکوینی. ۱ (۲): ۳۴-۲۵.

ترنگ، ع.ر. و مقصودی، م. (۱۳۹۱). بهینه‌سازی محیط کشت جهت تولید کالوس و باززایی گیاهچه‌های لیلیوم (*Lilium* spp.) در شرایط درون شیشه‌ای. اولین همایش ملی دانشجویی بیوتکنولوژی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

حقیقت حور، م.، اصغری ذکریا، ر. و زارع، ن. (۱۳۹۰). تولید کالوس و باززایی گیاه *Papaver pseudo-orientale* در شرایط درون شیشه‌ای. مجله زیست‌شناسی گیاهی. ۳ (۱۰): ۲۲-۱۱.

زرگری، ع. (۱۳۹۰). گیاهان دارویی، جلد سوم. موسسه انتشارات دانشگاه تهران، چاپ هفتم. ۸۸۸ صفحه.

شرفی، ع.، هاشمی سهی، ه. و جورابچی، ع. (۱۳۸۷). بهینه سازی شرایط باززایی گیاه دارویی *Artemisia annua*. مجله زیست شناسی ایران. ۲۱ (۴): ۵۷۳-۵۶۵.

قاسمی بزدی، ک. و احمدی، ا. (۱۳۸۸). بیوتکنولوژی سلول و بافت (در ریزازدیادی و به‌نژادی گیاهی)- ترجمه. انتشارات مختومقلی فراغی، گرگان. ۲۵۴ صفحه.

قاسمی بزدی، ک. و رمضانی مقدم، م.ر. (۱۳۹۱). راهنمای عملی کشت بافت گیاهی –تالیف. انتشارات نوروزی، گرگان. ۱۵۲ صفحه.

نصیری راد، م.، گلمغانی اصل، ل.، بخشی خانیکی، غ.ر. و حسینی کردخیلی، س.ر. (۱۳۹۰). بررسی کشت بافت گیاه دارویی رزماری *Rosemarinus officinalis*. اولین همایش تخصصی توسعه کشاورزی استان‌های شمال غرب کشور. مشکین شهر، ایران.

ولی زاده، م.، صفرنژاد، ع.، نعمت زاده، ق.ع.، کاظمی تبار، س.ک. و حمیدی، ح. (۱۳۸۷). باززایی زیره پارسی (*Bunium persicum* Boiss.) با استفاده از ریزنمونه جنین برش خورده. مجله نهال و بذر. ۲۴ (۳): ۳۹۸-۳۸۸.

Caruso, J.L., Callahan, J., DeChant, C., Jayasimhulu, K. and Winget, G.D. (2000). Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. Plant Cell Report, 19(5): 500-503.

Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P., Frizzo, C.D., Atti-Serafini, L. and Dugo, P. (1999). *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay. Journal of Essential Oils Research, 11: 27-30.

Dong, Y., Wand, R., Li, Z., Qi, C., Liu, B., Duan, R. and Liu, Y. (2012). Callus induction and plant regeneration from rosemary leaves. Bioscience Methods. 3(3): 21-26.

Fayaz, M.I., Altaf, W.M., Shawl, A.S. and Ramteke, P.W. (2008). Effect of different hormonal combinations on *In vitro* propagation of *Rosmarinus officinalis*. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 4(2): 749-762.

Gabor-Potor, S.A. and Pop, L. (2007). *Rosmarinus officinalis in vitro* culture initiation. Analele Universitätii din Oradea. Fascicula Biologie. 14: 73-76.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. Experiment Cell Research, 50: 151-158.

Huang, P.L. and Tsai, C.C. (2004). Micropropagation and cell suspension culture of *Rosmarinus officinalis*. Research Bulletin of Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, 15(2): 33-43.

Misra, P. and Chaturvedi, H.C. (1991). Influence of inorganic salts on cytokinin induced callogenesis in leaf segments of *Rosmarinus officinalis* L. Plant Science, 79(2): 229-235.

Murashige, T. and Skoog, F.A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Xie, H., Hu, X., Zhang, C.R., Chen, Y.F., Huang, X. and Huang, X.L. (2013). Molecular characterization of a stress related gene MsTPP in relation to somatic embryogenesis of alfalfa. Pakistan Journal of Botany, 45(4): 1285-1291.

Yang, R., Potter, T.P., Curtis, O.F. and Shetty, K. (1997). Tissue culture-based selection of high rosmarinic acid producing clones of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) using Pseudomonas strain. Food Science and Food Biotechnology, 11(1): 73-88.

Yesil-Celiktas, O., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E. and Vardar-Sukan, F. (2007). Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. Journal of Plant Physiology, 164(11): 1536-1542.

Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J. and Lohmann, J.U. (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. Nature, 465: 1089-1092.

Nagesh, K.S., Shanthamma, C. and Pullaiah, T. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Curculigo orchioides* Gaertn. Indian Journal of Biotechnology, 9: 408-413.

Nourin, A. and Humera, A. (2014). Primary and secondary somatic embryogenesis from leaf explants of Rosemary (*Rosemarinus officinalis* L. - Lamiaceae). Pakistan Journal of Botany, 46(3): 903-909.

Saltan, F.Z. and Ozaydin, O. (2013). Ethnobotany of Eskisehir and its environs. Pakistan Journal of Botany, 45(SI): 207-214.

Shimomura, K., Yoshimatsu, K., Jaziri, M. and Ishimaru, K. (1997). Traditional medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. In K. Watanabe and E.R.G. Pehu (eds.), Plant Biotechnology and Plant Genetic Resources for Sustainability and Productivity, R.G. Landes Company and Academic Press Inc., Austin, Texas, pp. 209-225.