مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
سال هفتم ، شماره دوم، پاییز و زمستان، ۱۴۰۰

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی اندام‌های مختلف آوندول (*Smyrnium cordifolium*)در شرایط درون شیشه‌ای

آزاده رجبی امیرآبادی[۱]، محمد گردکانه[۲*]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی موسسه آموزش عالی جهاددانشگاهی استان کرمانشاه، ایران.

۲. بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران

پست الکترونیک نویسنده مسئول Mgerdakaneh@gmail.com

چکیده

آوندول (*Smyrnium Cordifolium*) یکی از پرارزش‌ترین گیاهان دارویی بوده و مصرف آن در جهان سابقه طولانی دارد. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی اندام‌های مختلف آوندول در شرایط درون‌شیشه‌ای بود.این مطالعه در شرایط آزمایشگاه کشت‌بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. به منظور القای پینه، فاکتورهای ریزنمونه (ساقه، برگ)، تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و BA، (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵و ۱، میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. ۶ هفته پس از کاشت صفات رنگ کالوس، سرعت کالوس‌زایی، درصد کالوس‌زایی، قطرکالوس و وزن تر کالوس ثبت شد. نتایج نشان داد بیش‌ترین سرعت کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی، بیش‌ترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها در ترکیب ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ریزنمونه ساقه حاصل شد.

جهت باززایی مستقیم، ریزنمونه‌ها (ساقه،برگ) بر روی محیط‌کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵) کشت شدند. ۶ هفته پس از کاشت ریزنمونه کالوس‌زایی انجام دادند و گیاه وارد باززایی نشد. نتایج آزمایش دوم نشان داد که بیش‌ترین سرعت کالوس‌زایی و قطر کالوس در ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به تنهایی حاصل شد. بیشترین درصد کالوس‌زایی در دو ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به تنهایی و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین وزن‌تر کالوس در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم BA به تنهایی بدست آمد.

کلمات کلیدی: آوندول، باززایی، تنظیم کننده‌های رشد، کشت‌بافت.

مقدمه

گیاه آوندول با نام علمی Smyrnium cordifolium از گیاهان مرتعی خانواده چتریان است. این گیاه در ارومیه، سردشت، فارس، لرستان، مشهد، مازندران، کردستان، کرمانشاه و یاسوج بصورت وحشی رویش دارد ودر مناطق مذکور دارای استفاده¬های غذایی و دارویی است ترکیبات این گیاه شامل آلفاسدرن، بتالمن، کامالمن، آرماتتدرن، کرسول استات و تروپولن می¬باشد (Gholami et al., 2020) این گیاه دارویی به دلیل برداشت بی¬رویه از منابع طبیعی در معرض تهدید مداوم قرار¬دارد (Ahsan et al, 2012).

یکی از روش¬های مهم در بیوتکنولوژی کشت¬بافت گیاهی است که تولید سریع گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا را امکان‌پذیر می‌کند (Bhusare, 2022) و می توان از طریق ریزازدیادی به تولید گیاه در مقیاس بزرگ دست یافت (Arpan & Ajay, 2021). کشت‌بافت برای سازگار کردن، تکثیر انبوه و حفظ ژرم پلاسم گیاهان کمیاب و در معرض انقراض کاربرد دارد (Teymourian et al., 2017). باززایی گیاه از طریق اندام‌زایی معمولا شامل القا و رشد شاخه از بافت ریز¬نمونه و به دنبال آن انتقال به محیط متفاوت و سپس تشکیل ریشه و رشد گیاه اس (Soumare et al.,2020) القا کالوس در اندام¬های مختلف گیاهی و باززایی آن یکی از روش‌های کارآمد کشت¬بافت در تکثیر گیاهان تحت شرایط درون شیشه¬ای محسوب می‌شود. بافت کالوس تنها به تکثیر گیاهان محدود نمی‌شود و در موارد دیگری نظیر برنامه‌های انتقال ژن و تولید متابولیت-های ثانویه کاربرد دارد (Saremirad et al., 2021) در بسیاری از گونه¬های گیاهی به شرط تعیین اجزای محیط مناسب، انتخاب ریز¬نمونه مناسب و کنترل مناسب محیط فیزیکی امکان-پذیر است (Encina et al., 2022) نوع ریزنمونه و تنظیم¬کننده¬های رشد گیاه نقش مهمی در شروع کالوس‌دهی دارند زیرا هر ریزنمونه به غلظت خاصی از تنظیم‌کننده‌های رشد و هورمون‌ها برای تولید کالوس در شرایط آزمایشگاهی نیاز دارد (Dar et al., 2021) جدای از ترکیب عناصر ماکرو ومیکرو در محیط کشت، وجود و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مناسب، یکی از عوامل مهمی است که برای کنترل رشد و نمو گیاهان در کشت‌بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در بسیاری از جنبه‌های رشد گیاه نقش اساسی دارند (Nowakowska et al., 2019; Chalehchaleh et al., 2021). 2,4-D بالاترین نرخ القای کالوس را ایجاد می‌کند (Sparjanbabu et al., 2021) القا کالوس در اندام‌های مختلف گیاهی و باززایی آن یکی از روش‌های کارآمد کشت‌بافت در تکثیر گیاهان تحت شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شود. القای کالوس معمولا توسط یک اکسین به ویژه D-۲,۴ تحریک می‌شود و القای پینه از طریق ترکیب اکسین-سیتوکینین برای چندین گیاه گزارش شده¬است (Teymourian et al., 2017) وجود سیتوکینین و اکسین‌ها برای تمایز و باززایی کالوس در گیاهان ضروری است (Kim et al., 2021) نقش سیتوکینین‌ها در تکثیر اندام‌هوایی به خوبی شناخته‌شده است و نوع و غلظت موثرترین آنها در بین گونه‌های مختلف متفاوت است (Ojha, 2012) هورمون گیاهی سیتوکینین نقش مهمی در تقسیم و تمایز سلولی دارند. آنها بر اندام-زایی در کشت‌بافت گیاهی تاثیر می¬گذارند و به بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و رشدی در گیاهان کمک می-کنند (Fathy et al., 2022).

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۰ در آزمایشگاه کشت‌بافت و بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه طی ۲ مرحله آزمایش مجزا به اجرا درآمد. گیاهان جوان آوندول از ارتفاعات کوهستانی کرمانشاه جمع¬آوری گردید.

ضدعفونی ریزنمونه‌های گیاهی: ابتدا اندام‌های مورد آزمایش در زیر جریان آب شهری به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند، سپس نمونه‌ها را در زیر هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار داده شدند. در مرحله بعدی، نمونه‌ها در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت، سه بار با آب دوبار تقطیر استریل شستشو داده‌شدند.

آزمایش اول: ریزنمونه، از برگ‌های جوان به‌اندازه ۱ سانتی متر مربع و ساقه به اندازه نیم سانتی مترمربع از گیاه جدا شد و بر روی محیط¬کشت MS حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارزو ۸ میلی‌گرم در لیتر آگار، تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده جهت کالوس‌زایی شامل D-۲,۴ در پنج غلظت (۰، ۰.۵، ۱ ، ۲ و ۴) میلی‌گرم در لیتر همراه با چهار غلظت BA (۰ ، ۰.۲۵ و ۰.۵ و ۱) میلی‌گرم در لیتر بود، منتقل شدند. برای این منظور بعد از اضافه کردن ۳۰ گرم قند ساکارز و یک گرم اسکوربیک اسید به محلول، pH آن را با استفاده از دستگاه pH متر و با اضافه کردن چند قطره NaOH یا HCl 1/0 نرمال به محیط‌کشت در محدوده ۵/۸ تنظیم گردید. بعد از تنظیم pH، ۸ گرم آگار به ازای هر لیتر به محیط اضافه¬نموده و به همراه یک عدد مگنت روی هیتر دارای شیکر قرار داده تا آگار با رسیدن دمای محلول به نزدیک نقطه جوش، کاملاً حل گردد. در پایان با افزودن غلظت مناسب هورمونی مواد را در ارلن‌های ۲۵۰ (سی سی) تقسیم در نهایت دهانه ارلن را با دو لایه آلومینیوم بسته، و داخل کیسه فریزر قرار دادیم و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ اتمسفر قرار داده شدند تا استریل¬گردند. پس از اتوکلاو و سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، حدود ۲۵ سی سی محیط‌کشت را در پتری‌دیش توزیع نموده و ریزنمونه‌های استریل شده، روی این محیط قرار داده شد. بلافاصله پس از بستن درب پتری دیش توسط پارافیلم درب آن‌ها کاملاً مسدود گردید تا در خارج از هود دچار آلودگی نشوند. سپس کشت‌ها تحت شرایط تاریکی مطلق در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری‌شدند. درنهایت، تعداد روز مورد نیاز جهت شروع کالوس‌زای ثبت گردید و پس از ۶ هفته بعد از کشت، درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا شده، تعداد کالوس‌های تولیدشده، قطرکالوس و ووزن‌تر کالوس اندازه‌گیری و ثبت شد.

آزمایش دوم: پس از ضد عفونی نمونه گیاهی مانند آزمایش اول، ریزنمونه برگ‌های جوان به‌اندازه ۱ سانتی متر مربع و ساقه به اندازه نیم سانتی مترمربع از گیاه جدا شد و بر روی محیط‌کشت MS حاوی ۳۰ میلی گرم در لیتر ساکارزو ۸ میلی گرم در لیتر آگار، تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده جهت باززایی مستقیم BA در چهار سطح (۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱ و ۲) میلی¬گرم در لیتر همراه با) .IBA، ۰/۲۵ ، ۰/۵(استفاده شد. محیط‌های کشت را به مقدار ۲۰ میلی لیتر در ارلن‌های توزیع کرده و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط‌های کشت در هود لامینار، ریزنمونه‌های استریل، بر روی آن‌ها کشت شدند. آزمایش با ۳ تکرار انجام شد و در هر ظرف ۳ ریزنمونه کشت¬شد و بلافاصله پس از بستن ارلن‌ها با فویل الومینیوم، توسط پارافیلم درب آن‌ها کاملاً مسدود گردید تا در اتاقک رشد دچار آلودگی نشوند.

نتایج و بحث:

آزمایش اول

تاثیر نوع ریزنمونه و تنظیم¬کننده¬های رشد D-۲,۴ وBA بر پینه¬زایی ریزنمونه¬ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی نشان داد که اثر ساده هر یک از فاکتورهای نوع ریز¬نمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین (D-۲,۴) و سیتوکنین(BA)، اثرات متقابل دوگانه میان این فاکتور¬ها و اثر متقابل سه گانه ریزنمونه× D × BA-۲,۴ بر روی صفات سرعت و درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و وزن‌تر کالوس در گیاه آوندول دارای اختلاف معنی¬داری در سطح یک درصد بودند(جدول ۱).

سرعت کالوس‌زایی

نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد بیشترین سرعت کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه ساقه در تیمار ۲ میلی¬گرم توفوردی بدون حضور سایتوکینین، بعد از گذشت ۱۴ روزپس از کشت مشاهده شد.(Mortazavi و همکاران ،۲۰۱۶) در پژوهشی با عنوان بررسی پینه‌زایی درگیاه دارویی چویل استفاده ازاکسین NAA بدون حضور سیتوکینین نیز پینه تشکیل ¬شد.

درصد کالوس‌زایی

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه ساقه در ۳ ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیترتوفوردی با ۰/۲۵میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با صفر میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۲ میلی گرم در لیتر توفوردی با صفر میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده شد.(Shakoori و Kashefi، ۲۰۱۹) در پژوهشی عنوان کردند که تیمار-

های محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد تاثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های کالوس، گیاچه‌های احیا شده، متابولیت‌های ثانویه کالوس و اسانس گیاهی و ترکیب آن دارند. (Magyar-Tábori و همکاران، ۲۰۱۰) درپژوهشی عنوان کردند که تأثیر نوع بافت ریزنمونه بر رشد و نمو بافت کالوس باتوجه به گونه گیاهی موثر می باشد.(Karami و همکاران، ۲۰۱۳) در پژوهشی عنوان کردند تعامل دوتنظیم‌کننده رشد اکسینی و سیتوکنینی در القا کالوس نقش مهمی دارد. در این آزمایش مشاهده شد که ریزنمونه ساقه، بهتر از ریزنمونه برگ جهت کالوس‌زایی می‌باشد.(Fazeli-Nasab و Fooladvand، ۲۰۱۹) در پژوهشی عنوان کردند که ریزنمونه ساقه بیش‌ترین پینه‌زایی داشت و قطعات کلئوپتیل و برگ در رتبه‌های بعدی پینه‌زایی بودند و تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر D-۲,۴ به تنهایی و یا به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین پینه را تولید کردند.(Moradi و همکاران، ۲۰۱۹) عنوان‌کردند که ریز¬نمونه ساقه جهت پینه‌زایی مناسب‌تر است.

قطر کالوس

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیش¬ترین قطر کالوس مربوط به ریزنمونه ساقه در ترکیب تنظیم¬کننده رشد توفوردی ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی مشاهده شد. یعنی در تیمار بدون سایتوکینین بالاترین قطر کالوس مشاهده شد(جدول۲).(Razeghi، ۲۰۱۵) در پژوهشی با عنوان تاثیر ترکیب‌های هورمونی بر القاء کالوس گیاه دارویی کرفس کوهی و بررسی رشد آن در محیط کشت مایع، بیشترین اندازه کالوس را در تیمار ۲ میلی گرم اکسین توفوردی و نیم میلی گرم سایتوکینین کاینتین بدست-آوردند، که از نظر تاثیر غلظت اکسین بر قطر کالوس با آزمایش کنونی انجام شده همسو است. (Vatandoost و Zebarjadi، ۲۰۲۰) در پژوهشی بیان داشتند در محیط کشت بدون هورمون رشد (شاهد) کالوس القا نمی‌شود. در سطح ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP با میانگین ۱۳/۱۵ میلی متر بیشترین قطر کالوس را داشتند.

وزن تر کالوس

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان داد که بیشترین وزن‌تر کالوس مربوط به ریزنمونه ساقه در ترکیب تنظیم-کننده رشد توفوردی در دو سطح ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به تنهایی و توفوردی ۴ میلی گرم در ترکیب با بنزیل آدنین ۱میلی گرم در لیتر مشاهده شد. (Saremirad و همکاران، ۲۰۲۱) اعلام کردند ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم درلیتر D-۲,۴ از بیش¬ترین وزن‌تر کالوس برخوردار **بود**. (Asgharzadeh و همکاران، ۲۰۱۵) در پژوهشی عنوان کردند بیش‌ترین وزن تر کالوس در تیمار ترکیبی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون BA با ۰/۲۵ میلی-گرم در لیتر ۲,۴-D و بیشترین وزن خشک کالوس به تیمار ترکیبی ۱ میلی گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر هورمون D-۲,۴ مربوط می‌باشد.

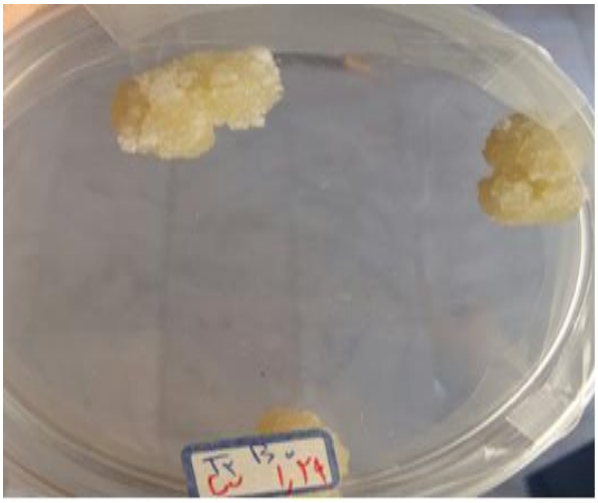

Figure 1: Calluses obtained from stem explants under the influence of 2 mg/L 2,4-D

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات مختلف کالوس زایی آوندول

		Mean squares (MS)			
S.O.V	DF	Percentage of callus formation	Callus formation rate (days)	Callus diameter (mm)	Callus fresh weight (grams)
A	1	21100.74**	54665.39**	1002.59**	4.49**
B	4	4613.65**	2658.61**	80.39**	0.38**
C	3	199.74**	1290.28**	16.88**	0.11**
B×A	4	5230.03**	3169.60**	55.72**	0.70**
C×A	3	107.83**	3796.75**	42.37**	0.26**
B ×C	12	921.76**	1535.94**	35.27**	0.24**
A ×B ×C	12	458.67**	2279.58**	32.85**	0.14**
Error		4.63	5.26	0.09	0.0006
CV%		9.02	7.72	7.72	10.68

*Respectively at the level of 1% and 5% probability, ns = no statistically significant difference
.A: Explant B: 2,4-D C : Benzyl adenine indole butyric acid

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نوع تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات مختلف کالوس‌زایی آوندول

Table 2. Mean comparison the effect of growth regulators on different callus formation traits of avondol

Growth regulator (mg/l)		Percentage of callus formation		Callus formation rate (days)		Callus diameter (mm)		Callus fresh weight (grams)	
2.4-D	BA	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem
0	0	0.00i	22.22g	0.00h	0.00h	0.00r	2.50o	0.00j	0.14i
0	0.25	0.00i	77.77c	0.00h	66.33c	0.00r	4.20l	0.00j	0.05j
0	0.5	22.22g	33.33f	22.22f	33.33e	1.00q	5.75j	0.45e	0.35fg
0	1	11.11h	11.11h	0.00h	0.00h	0.00r	2.00p	0.00j	0.00j
0.5	0	22.22g	0.00i	0.00h	0.00h	3.50m	0.00r	0.20h	0.00j
0/5	0.25	0.00i	100.00a	0.00h	77.66b	0.00r	6.26h	0.00j	0.33g
0/5	0.5	22.22g	0.00i	0.00h	0.00h	1.00q	0.00r	0.15i	0.00j
0/5	1	0.00i	11.11h	0.00h	11.11g	0.00r	5/00k	0.00j	0.03j
1	0	0.00i	100.00a	0.00h	66.66c	0.00r	15.06b	0.00j	1.00a
1	0.25	11.11h	88.88b	0.00h	55.55d	1.00q	5.86j	0.00j	0.66c

1	0.5	11.11h	66.66d	0.00h	55.33d	3.00n	11.80e	0.00j	0.88b
1	1	11.11h	77.33c	0.00h	77.33b	0.00r	5.00k	0.20h	0.20h
2	0	0.00k	100.00a	0.00h	100.00a	0.00r	16.53a	0.00j	1.00a
2	0.25	22.22g	22.22g	0.00h	0.00h	2.00p	10,00f	0.00j	1.00a
2	0/5	11.11h	22.22g	0.00h	0.00h	1.00q	0.00r	0.00j	0.00j
2	1	0.00i	77.33c	0.00h	55.33d	0.00r	8.20g	0.00j	0.58d
4	0	0.00i	44.44e	0.00h	33.33e	0.00r	12.33d	0.00j	0.97a
4	0.25	0.00i	77.33c	0.00h	55.33d	0.00r	6.33h	0.00j	0.38f
4	0.5	11.11h	44.44e	0.00h	22.22f	3.50m	5.80j	0.00j	0.17hi
4	1	22.22g	77.33c	0.00h	77.33b	4.5l	13.50c	0.20h	0.99a

The means with the same letters in each column are not significantly different at the 5% level using Duncan's multiple range test.

آزمایش دوم

تاثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و BA بر باززایی و پینه‌زایی ریزنمونه‌ها

آزمایش دوم این پژوهش جهت باززایی آوندول انجام‌شد که نتیجه پژوهش نشان‌داد با تیمارهای بکار برده شده گیاه وارد باززایی نشد و کالوس‌زایی رخ داد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی، قطر کالوس و وزن‌تر کالوس نشان داد که که اثر ساده هر یک از فاکتورهای نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین (IBA) و سیتوکنین(BA) ، اثرات متقابل دوگانه میان این فاکتورها و اثر متقابل سه گانه ریزنمونه × IBA × BA بر روی صفت سرعت و درصد کالوس‌دهی، قطر کالوس و وزن‌تر کالوس ریزنمونه‌ها در گیاه آوندول دارای اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بودند(جدول ۳).

سرعت کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین سرعت کالوس‌زایی (۹۷/۵۰ درصد) ۲ هفته پس از کشت در ریز-نمونه ساقه در ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به تنهایی مشاهده‌شد.

درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین نشان‌داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه ساقه در ۲ ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به تنهایی و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید مشاهده‌شد. Dar و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند ریزنمونه هر گونه گیاهی در کشت درون شیشه‌ای به‌منظور تولید پینه،ترکیب هورمونی خاصی را نیاز دارد. بعضی گونه‌ها فقط با هورمون سیتوکینین یا اکسین تولید پینه می‌کنند و بعضی دیگر به ترکیب هر دو نوع هورمون نیاز دارند.(Zarei و همکاران ،۲۰۲۰) در پژوهشی عنوان کردند ریزنمونه‌های ساقه بالاترین کالوس‌دهی را داشتند (Kiani و همکاران ،۲۰۲۱) در پژوهشی عنوان کردند بالاترین میزان کالوس¬زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و با تیمار ترکیبی NAA ۴ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۱۰۰ درصد مشاهده شد.

قطر کالوس‌ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین نشان‌داد بیش‌ترین قطر کالوس مربوط به ریزنمونه ساقه در ترکیب تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با ایندول بوتریک اسید صفر میلی‌گرم در لیتر مشاهده‌شد. (Saremirad و همکاران ،۲۰۲۱) در پژوهشی تحت عنوان بهینه‌سازی القاء کالوس در گیاه دارویی رازیانه بیان کردند که در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP وزن تر بالایی داشت. (Ghasemian و همکاران ،۲۰۱۶) پس از بررسی پینه ها در بین تمام تیمارهای مورد استفاده بیش‌ترین قطر کالوس را در محیط پایه MS، حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA ارزیابی

نمودند. Sanaei و همکاران، (۲۰۲۰) در نتیجه پژوهش خود عنوان کردند بیشترین مقدار قطر کالوس مربوط به غلظت 2,4-D ۲ میلی‌گرم در لیتر با قطر ۱/۴۷ سانتی‌متر بود.

وزن‌تر کالوس ریزنمونه‌ها

نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیش‌ترین وزن‌تر کالوس در ریزنمونه ساقه در ترکیب تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین ۱ میلی‌گرم در لیتر با ایندول بوتریک اسید صفر میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد.

(Sadeghian و همکاران ،۲۰۱۴) در پژوهشی عنوان کردند کالوس‌های حاصل از محیط کشت حاوی ۱ میلی-گرم در لیترBAP به تنهایی و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی بیشترین وزن را داشتند. (Sanaei و همکاران، ۲۰۲۰،) در نتیجه پژوهش خود عنوان کردند بررسی‌ها نشان دادند از لحاظ وزن کالوس بیشترین مقدار مربوط به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با وزن ۱/۲۹ گرم مشاهده شد.

جدول۳-تجزیه واریانس صفات مختلف کالوس‌زایی آوندول تحت تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد(BAو IBA).

Table 3. Analysis of variance of different callus formation traits of avandol under the influence of growth regulators (BA and IBA).

		Mean squares (MS)			
S.O. V	DF	Percentage of callus formation	Callus formation rate (days)	Callus diameter (mm)	Callus fresh weight (grams)
A	1	2110.74**	15780.64**	295.44**	2.09**
(2,4-D) B	3	4613.65**	4948.14**	20.72**	0.06**
(BA)C	2	199.74**	1400.87**	9.22**	0.16**
B×A	3	5230.03**	3488.69**	4.89**	0.05**
C×A	2	107.83**	293.31**	19.13**	0.16**
B ×C	6	921.76**	1981.11**	16.54**	0.12**
A ×B ×C	6	458.67**	1323.47**	29.55**	0.14**
Error		4.63	3.10	4.75	0.004
CV%		9.02	6.56	9.69	7.86

** and * respectively at the level of 1% and 5% probability, ns = no statistically significant difference
.A: Explant B: Benzyl adenine C: indole butyric acid

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر نوع تنظیم‌کننده‌های رشد(BA و IBA) بر صفات مختلف کالوس زایی آوندول

Table 4. Comparison of the mean effect of growth regulators (BA and IBA) on different callus formation traits

Growth regulator (mg/l)		Percentage of callus formation		Callus formation rate (days)		Callus diameter (mm)		Callus fresh weight (grams)	
BA	IBA	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem
0.25	0	11.11de	0.00e	1.00h	7.49abc	1.00h	7.49abc	0.001e	0.00e

0.25	0.25	0.00e	33.33cd	1.50gh	33. 33dc	1.50gh	7.49abc	0.00e	0.40bc
0.25	0.5	22.22de	22.22de	1.00h	11.11de	1.00h	6.00b-e	0.001e	0.26cd
0.5	0	26.25de	97.50a	26.25de	97.50a	4.18d-g	8.63a	0.15de	0.54b
0.5	0.25	22.22de	77.66ab	3.50e-h	77.66a-b	3.50e-h	6.55a-d	0.005e	0.36bc
0.5	0.5	22.22de	77.66ab	4.00efg	77.66a-b	4.00efg	5.22c-f	0.15de	0.26cd
1	0	0.00e	11.11de	1.50gh	11.11de	1.50gh	8.00ab	0.00e	0.96a
1	0.25	33.33cd	88.88b	1.75gh	55.55bc	1.75gh	2.75fgh	0.001e	0.00e
1	0.5	22.22de	11.11de	1.50gh	11.11de	1.50gh	8.00ab	0.004e	0.50b
2	0	0.00e	22.22de	1.50gh	22.22de	1.50gh	8.50ab	0.00e	0.56b
2	0.25	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	3.00fgh	1.50gh	0.00e	0.00e
2	0.5	۱۱/۱۱de	55.55bc	11.11de	2.99fgh	3.00fgh	2.99fgh	0.002e	0.40bc

The means with the same letters in each column are not significantly different at the 5% level using Duncan's multiple range test.

سپاسگزاری

نویسندگان از مسئولان مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می کنند.

منابع و ماخذ

1. Ahsan, S., Amjad, N., Iqbal, A. and Javed, A., (2012). A Review: Tissue Culturing of Important Medicinal Plants. International Journal of Water Resources and Arid Environments 2(4): 127-130.
2. Arpan, M. and Ajay, K., (2021). Microbiome Stimulants for Crops: In book: Mechanisms and Applicathions. Pulusher: Elsevier.
3. Asgharzadeh, R., Moradi, H. and Nematzadeh, Q., (2015). Effect of explant type and BA, 2,4-D type on fresh and dry weight of bitter melon (Momordica charantia L). First National Conference on Agricultural Development; Healthy earth.
4. Bhusare, B.P., (2022). Impact of Plant Tissue Culture (PTC) in Modern Agriculture. Impact of Plant Tissue Culture (PTC) in Modern Agriculture. Mod Concep Dev Agrono. 10(4). MCDA.
5. Chalehchaleh, M., Fallah, F. and Pourjbar, A., (2021). Morphological response of Stevia rebaudiana Bertoni To growth regulators and iron nanoparticle eliminators. The first national conference on the application of modern research in chemistry and agriculture in the development of medicinal plants.
6. Dar, SA., Irshad Ahmad Nawchoo, IA., Tyub, S. and Kamili, AN., (2021). Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of Atropa acuminata Royle ex Lindl. Biotechnology Reports.32.e00688.

7. Encina, C.L. and Regalado, J.J., (2022). Aspects of In Vitro Plant Tissue Culture and Breeding of Asparagus: A Review. Horticulturae. 8, 439.

8. Fathy, M., Saad Eldin, S.M., Naseem, M., Dandekar, T. and Othman, E.M., (2022). Cytokinins: Wide-Spread Signaling Hormones from Plants toHumans with High Medical Potential.Nutrients.14,1495.

9. Fazeli-Nasab, B. and Fooladvand, Z., (2019). The effects of plant growth regulators and explants on callus induction in Ajowan. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 1(32), PP: 364-375.

10. Ghasemian, K., Nazeri, S., Chehregani Rad, A. and Mirzaie Asl, A., (2016). Producing embryogenic callus from zygotic embryo in Dorema ammoniacum D. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 2(28), PP: 364- 373.

11. Gholami, m., Daneshshahrki, A., Asadi, A., Tahmasbi, P. and Shirmardi, H., (2020). The effect of pre-cold and gibberellic acid on sleep failure and growth indices and establishment of Avondol plant (smyrnium cordifolium Boiss). Rangeland Scientific Research Journal. 14 pp. 571-583.

12. Karami, M., Bagherieh, N.M.B. and AghdasiI, M., (2013). 'Optimization of conditions suitable for bean (Phaseolus vulgaris L.) regeneration', 5, 1-14.

13. Kiani, M., Zebarjadi, A. and Amerian, M., (2021). Effects of Plant Growth Regulators on Callus Formation and Regeneration of Lallemantia iberica as a Medicinal-Oil Plant. Journal of Biotechnology. 2(13), PP: 1- 12.

14. Kim, Y.G., Okello, D. and komakech, R., (2021). Histologikal assessment of regeneration plants at callus, shoot organogenesis and plantlet stages during the in vitro micropropagation of Asparagus cochinchinensis. Plant Cell Tissue and organ culture .144(2):1-13.

15. Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J.A.T., Bulley, S.M. and Hudák, I., (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 101, 251-67

16. Moradi., (2019). Investigation of callus induction in Smyrnium Cordifolium under the effects of hormonal compounds Ali. Second International Conference on Medicinal Plants, Organic farming, Natural and medicinal Materials.

17. Mortazavi, R., Dehdari, M. and Masoumi Asl, V., (2016). Study of Callus Induction of Medicinal Chavil Plant (Ferulago angulata B.) Using Types of Explants and Growth Regulators. Biotechnology in agriculture 2(14), PP: 73- 80.

18. Nowakowska, K., Pacholczak, A. and Tepper, W., (2019). The effect of selected growth regulators and culture mediaon regeneration of Daphne mezereum L. ‘Alba’. Scienze Fisiche e Naturali. 30:197–205.

19. Ojha, A., Kumar, S., Singh, M.K. And Bind, D., (2012). An Efficient Protocol For In Vitro Shoot Induction and Somatic Embryogenesis Through Callus Using Root Explants in Daucus Carota L, Subsp. Halophilus M. Journal of Cell and Tissue Research. 12(3) 3337-3342.

20. Razeghi, L., Azizi, M., Ziaratnia, S.M., Bagheri, A.R. and Nemati, S.H., (2015). Impact of hormonal combination on callus induction of Kelussia odoratissimia Mozaff. and evaluating its growth in broth. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 6(30), PP: 943- 953

21. Sadeghian, S., Ranjbar, G.A. and Kazemitabar, S.K., (2014). Consideration and Selection of Suitable Hormonal Composition for in vitro Shoot Regeneration and Propagation of Ocimum basilicum L. Journal of Crop Breeding. 6(13), PP: 40- 48.

22. Sanaei, F., Kazemitbar, S.K. and Chalous, V., (2020). The effect of plant growth regulators on callus formation of leaf specimen of Persian echium amoenum. Third International Conference on Agricultural Sciences, Medicinal Plants and Traditional Medicine.

23. Saremirad, A., Azarkish, R. and Abbasi, S., (2021). Optimization callus induction in fennel (Foeniculum vulgare M.). Journal of Medicinal Plants Biotechnolog. 2(14), PP: 1- 18.

24. Shakoori, Y. and Kashefi, B., (2019). Effects of culture medium and growth regulators on growth traits and secondary metabolites of Artemisia dracunculus L. under in vitro conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 3(35), PP: 437- 455.

25. Soumare, A., Abdala, G., Diedhiou, A G., Thuita, M., Hafidi, M. and Ouhdouch, Y., (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. Plants.9, 1011

26. Sparjanbabu, D.S., Kumar, P.N., Motukuri, S.R.K., Ramajayam, D., Susanthi, B. and Prasanna H.S., (2021). Effect of culture media, auxins and genotypes on plantlet regeneration from oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) zygotic embryos through somatic embryogenesis. Article

in Journal of Environmental Biology.42.1232-1238.

27. Teymourian, H., Ebrahimi, M.A., Tohidfar, M., Farsaloon, N. and Zarinpanjeh, N., (2017). In vitro Plantlet Regeneration from Callus Culture of Trachyspermum copticum. Plant Tissue Cult. & Biotech. 27(1): 13-20.
28. Zarei, B., Taghipour, Z. and Kahrizi, D., (2020). Effect of Growth regulators on in vitro callogenesis and regeneration of atropa belladonna. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 2(27) PP: 231- 239.
29. Vatandoost, S.H. and Zebarjadi, A.R., (2020). Effect of explant types and different levels of plant growth regulators on callogenesis and regeneration in medicinal plant, Matricaria aurea. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 1(33), PP: 364-375.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

2022 Vol 7, No 2, Autumn & Winter

The effects of growth regulators on regeneration of *Smyrnium cordifolium* Boiss under *in vitro* conditions.

Azadeh Rajabi [1], Mohammad Gerdakaneh [2*]

Authors Address:

1. Graduated from Group Medicinal Plants, Department of Kermanshah ACECR Institute of Higher Education, Kermanshah, Iran.
2. Crops and Horticultural Science Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran

*Corresponding author: E-mail address: Mgerdakaneh@gmail.com

Abstract

Avondol (*Smyrnium cordifolium*) is one of the most valuable medicinal plants and its use has a long history in the world. The aim of this study was to investigate the effect of growth regulators on the regeneration of various organs of the avondol in in vitro conditions. This study was conducted in tissue culture laboratory of Research Center of Agricultural and Natural Resources of Kermanshah as a factorial experiment in a completely randomized design with 3 replications. Factors of explant (leaf and stem) plant growth regulators of 2,4-D (0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/l) and BA (0, 0.25, 0.5 and 1, mg/l) were examined. Six weeks after planting, callus color, callus formation rate, percentage of callus regeneration, callus diameter and callus fresh weight were recorded. The results showed that the highest callus formation rate in 2 mg/l 2,4-D alone, the highest percentage of callus formation of explants in 1 and 2 mg/l 2,4-D alone was obtained in stem explants. The highest callus diameter in the treatment of 2 mg/l 2,4-D alone and the highest weight in 1 and 2 mg/l 2,4-D alone and 2 mg/l 2,4-D with 0.25 mg/l BAwas obtained.

In order to direct regeneration, same calli were cultured on growth regulators BA (0.25, 0.5 and 1 mg/l) and IBA (0, 0.25, 0.5 mg/l) in MS medium with 3 replications. Six weeks after replanting the calli grew and did not regenerate. The results of the second experiment showed that the highest callus formation rate and callus diameter were obtained in combination of 0.5 mg/l BA alone. The highest

percentage of callus formation was observed in two hormonal compounds: 0.5 mg/l BA alone and 1 mg/l BA with 0.25 mg/l IBA. The highest callus weight was obtained in 1 mg/l BA alone.

Keywords: Avondol, Plant growth regulators, Regeneration, Tissue culture.