

جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی غیرمستقیم و مستقیم در کشت سرشاخه‌های گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill.)

نرجس شریف^۱، عبدالله محمدی^{۲*}، خداداد مصطفوی^۳

چکیده

اسطوخودوس یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و معطر است که به تیره نعنائیان تعلق دارد. در این پژوهش به کمک تکنیک کشت درون شیشه‌ای کالوس‌زایی، باززایی از کالوس و باززایی مستقیم مورد مطالعه قرار گرفت. دو آزمایش جداگانه بهینه‌سازی القای کالوس و باززایی غیر مستقیم و باززایی مستقیم اجرا شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایش‌های القای کالوس و باززایی غیرمستقیم، فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D در سه سطح (۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت‌های مختلف کینیتین (Kin) در سه سطح (۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) با ۴ تکرار بود. آزمایش باززایی مستقیم به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. نتایج آزمایش نشان داد که بیش‌ترین درصد کالوس به همراه حجیم‌ترین کالوس‌ها در محیط MS به اضافه ۰/۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۴ میلی گرم در لیتر Kin حاصل شد. باززایی غیرمستقیم و ظهور گیاه‌چه فقط از کالوس‌های ریزنمونه ساقه و در محیط کشت MS حاوی ۱/۶ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) به همراه ۱ میلی گرم در لیتر Kin که در آن کالوس‌های واکشت شده بعد از مدت زمانی به رنگ سبز درآمده و بعد از حدود ۴۵ روز از واکشت، روی آن اندام هوایی تشکیل شد. در آزمایش باززایی مستقیم ترکیب ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی گرم در لیتر Kin بیش‌ترین درصد باززایی را ایجاد کردند.

واژه‌های کلیدی: اسطوخودوس، کالوس‌زایی، باززایی غیرمستقیم، باززایی مستقیم

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

*۲- نویسنده مسئول: دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران. ایمیل: irabdollah@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران.

مقدمه

اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill.) متعلق به تیره نعنائیان (Lamiaceae) می‌باشد. گونه‌های مختلف اسطوخودوس گیاهان خشبی چندساله و مخصوص مناطق خشک و نیمه خشک هستند (Panizza and Tognoni, 1988; Nobre, 1996). گل‌ها به صورت سنبله دراز است. منشأ آن جنوب اروپا در مناطق مدیترانه‌ای گزارش شده است. گونه *lavandula* (*lavander*) از مهم‌ترین گیاهان معطر است و برای خوشبو کردن پوست و مو استفاده شده و دارویی مفید محسوب می‌شود (Gras and Calvo, 1996). چندین گونه از *lavandula* در سراسر جهان کشت می‌شود. این گیاهان با قسمت‌های رستنی‌شان تکثیر می‌شوند (از جمله برش ساقه) اما به خاطر قدرت ریشه‌دهی ضعیف، ضریب تکثیر پایینی دارند (Gras and Calvo, 1996). اسانس این گیاه خاصیت شدید ضد باکتریایی داشته و یکی از ترکیبات اصلی برخی فراورده‌های بهداشتی و آرایشی را تشکیل داده و در تولید ادکلن، عطر، صابون، شامپو، خوشبوکننده‌های هوا و امثال آن کاربرد فراوان دارد (زرگری، ۱۳۶۹). در روش‌های سنتی معمولاً با ریشه‌دار کردن قلمه یا بذر تکثیر می‌شود. تکثیر با بذر بسیار زمان‌بر است و امکان ایجاد تنوع و تغییر در ویژگی‌های اسانس آن زیاد است. همچنین به دلیل کندی رشد و سخت ریشه‌دار شدن قلمه‌های برخی از ارقام، تکثیر با ریشه‌دار کردن قلمه‌های خشبی، روش کارآمدی نیست (Dias et al., 1999; Andrade et al., 2002). از این‌رو روش کشت درون شیشه‌ای امکان افزایش سرعت تکثیر را فراهم می‌نماید. بازرایی گیاه از طریق کشت بافت در حال حاضر یک فرآیند ضروری و اساسی برای بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات است و به‌طور تجاری برای تکثیر غیرجنسی بسیاری از گیاهان باغی و زراعی استفاده می‌شود (باقری و آزادی، ۱۳۸۱). عامل مهم در کالوس‌زایی و بازرایی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد مختلف است، اگرچه میزان موفقیت در اندام‌زایی به قابلیت طبیعی بازرایی ریزنمونه مورد نظر بستگی دارد (Ilahi et al., 2005). 2,4-D یک اکسین

مصنوعی شناخته شده است که در کالوس‌زایی نقش دارد (Dudits et al., 1995). سیتوکینین‌ها جزو مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد برای بازرایی محسوب می‌شوند. در بین آن‌ها بنزیل‌آمینوپورین (BAP) مؤثرترین سیتوکینین مورد استفاده می‌باشد. کینیتین (Kin) و 2ip در درجات بعدی قرار دارند (Skala and Wysokinska, 2006). در مطالعه‌ای برای القا کالوس از ریزنمونه برگ اسطوخودوس استفاده شده است که در محیط MS تکمیل شده با ۱ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار Kin جایگزین و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۴۰ روز بعد از کشت بهترین کالوس‌ها به دست آمدند. با مطالعه منابع مختلف در خصوص کشت بافت گیاه اسطوخودوس و تولید کالوس از آن مشخص گردید که در اکثر مطالعات از محیط کشت MS استفاده شده است (Tsuru et al., 2000).

این پژوهش در جهت بهینه‌سازی فرایندهای کالوس‌زایی و بازرایی غیرمستقیم و مستقیم گیاه دارویی اسطوخودوس و زمینه‌سازی برای تولید اقتصادی، بهبود کیفیت و کمیت ترکیبات دارویی در این گیاه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی: ابتدا شاخه‌های جوان گیاه اسطوخودوس قبل از مرحله گلدهی از شهر کاشان جمع‌آوری و به گلخانه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج منتقل شد. برای کشت بافت، سر شاخه‌های ۵ سانتی‌متری رأس گیاه مورد استفاده قرار گرفت. پس از جدا کردن نمونه‌ها، قطعات گیاهی با مقداری مواد شوینده همراه با آب شستشو داده شدند. در انتها، نمونه‌ها با آب مقطر استریل آبکشی و آب اضافی با کاغذ کشت استریل گرفته شد. برگ‌های جوان جدا شده از ساقه نیز به قطعات کوچک حدود ۳×۶ میلی‌متر و نیز قسمت‌هایی از ساقه به قطعات کوچک حدود ۱/۵ سانتی‌متر پس از سترون‌سازی برای کشت بافت به کار رفتند. ابتدا با فرو بردن ریزنمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه، سپس در هیپوکلریت سدیم (۲ درصد کلر فعال) به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند

8. $1.6 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NAA} + 3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ AgNO}_3$
9. $2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IBA} + 0.1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NAA}$
10. $0.5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IBA} + 0.4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NAA}$
11. $1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IAA} + 3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ AgNO}_3$
12. $1.6 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Kin}$
13. $4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Kin}$

ظروف حاوی کالوس برای باززایی در اتاقک رشد با دمای ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی نگهداری گردید.

آزمایش باززایی مستقیم به صورت فاکتوریل 3×3 در قالب طرح کاملاً تصادفی با تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر و Kin با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر، با ۳ تکرار و در مجموع ۲۷ واحد آزمایشی انجام گرفت. جهت بررسی نمونه‌های باززا شده پس از گذشت ۴۵ روز درصد باززایی ثبت شد.

تجزیه آماری: داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد مقایسه شدند. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

کالوس‌زایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که صفت درصد کالوس‌زایی برای تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D و Kin و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. در خصوص اثر متقابل سطوح مختلف کینتین و 2,4-D در صفت درصد کالوس‌زایی، نتایج نشان داد که در چهار گروه هورمونی بالاترین نسبت کالوس‌زایی مشاهده شد و این چهار گروه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند، که شامل محیط MS حاوی 0.2 mg.l^{-1} Kin به همراه 0.2 mg.l^{-1} و 0.4 mg.l^{-1} میلی گرم بر لیتر 2,4-D و همچنین محیط MS با غلظت‌های محتوی 0.4 mg.l^{-1} میلی گرم بر لیتر Kin به همراه 0.2 mg.l^{-1} و 0.4 mg.l^{-1} میلی گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آمد (شکل ۱). تحقیقات در گیاه داوودی نشان داد که افزایش غلظت 2,4-D و Kin در حد ۱ میلی گرم در لیتر کالوس‌زایی را

و در نهایت ۳-۵ بار شستشو نهایی با آب مقطر استریل انجام شد.

تهیه محیط کشت: ریزنمونه‌های جدا شده در محیط کشت پایه MS تکمیل شده با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میواینوزیتول کشت گردید. pH محیط‌های کشت معادل ۵/۸ تنظیم گردید و ضدعفونی محیط‌های کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت.

کال‌زایی و باززایی غیرمستقیم و مستقیم: در آزمایش بهینه‌سازی تشکیل کالوس صفات مدت زمان تا القا کالوس، درصد کالوس‌زایی و حجم کالوس (با استفاده از مقیاس رتبه‌ای Hooker و Nabors (۱۹۷۷)) اندازه‌گیری شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل 3×3 در قالب طرح کاملاً تصادفی با تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D در سه سطح (۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت‌های مختلف kin در سه سطح (۰، ۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) با ۴ تکرار و در مجموع ۳۶ واحد آزمایشی اجرا گردید. شرایط نگهداری نمونه‌ها در آزمایش القای کالوس دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی بود.

در باززایی غیرمستقیم از طریق کالوس، آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تنظیم‌کننده‌های رشدی بنزیل آمینو پورین (BAP) با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر و همچنین محیط‌های MS محتوی هورمون‌های زیر در ۴ تکرار و مجموعاً ۴۸ واحد آزمایشی واگشت شدند:

1. $4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP}$
2. $4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ GA}_3$
3. $4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ GA}_3 + 0.2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IBA}$
4. $2 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IBA} + 0.1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ GA}_3$
5. $0.4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 1.9 \text{ mg.l}^{-1} \text{ 2-4-D} + 3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IBA}$
6. $1.9 \text{ mg.l}^{-1} \text{ 2-4-D} + 3 \text{ mg.l}^{-1} \text{ IBA}$
7. $1.6 \text{ mg.l}^{-1} \text{ BAP} + 0.4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NAA}$

افزایش داده است (Shinoyama et al., 2004). با توجه به نتایج بدست آمده حضور تنظیم کننده های رشدی اکسین و سیتوکینین در القا رشد کالوس ضروری بنظر می رسد. این نتیجه با نتایج تحقیق مجتوی و امید (۱۳۹۵) نیز مطابقت دارد. تنظیم کننده های رشدی ذکر شده با اثر متقابلی که روی هم دارند به دو صورت مستقیم و همچنین تأثیر بر میزان تولید هورمون های درونی می توانند پاسخ گیاه را تحت تأثیر قرار دهند.

باززایی غیرمستقیم

در آزمایش باززایی غیرمستقیم (از طریق کالوس) با وجود آزمایش های متعددی که روی محیط های هورمونی مختلف انجام گرفت، تنها در یک محیط هورمونی شاهد فرآیند باززایی بودیم. محیط MS محتوی ۱/۶ میلی گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی گرم بر لیتر Kin محیطی بود که در آن کالوس های واکشت شده بعد از مدت زمانی به رنگ سبز درآمده و بعد از حدود ۴۵ روز از واکشت، روی آن اندام هوایی تشکیل شد (شکل ۵- الف). بعد از حدود ۶۰ روز شاهد تشکیل گیاهچه بودیم (شکل ۵- ب). سیتوکینین ها در تقسیم سلولی و تحریک رشد در جوانه های جانبی، در مهار رشد ریشه و مهار پیری دخالت دارند. اگرچه نوع و غلظت این تنظیم کننده های رشد گیاهی در القا اندام زایی نیز نقش بسزای دارند (پیوندی، ۱۳۹۰؛ Benková et al., 1999). پیوندی و همکاران (۱۳۹۰) محیط واکشت دارای دو هورمون Kin و BAP (۱ میلی گرم بر لیتر) نیز ساقه و برگ تولید نمودند. این نتایج با کال زایی و نمو شاخه های نابجا در گیاه گل ساعتی (*Passiflora edulis*) در مطالعه Bias و همکاران (۲۰۰۰) همخوانی دارد.

باززایی مستقیم

در آزمایش باززایی مستقیم پس از گذشت مدت زمان لازم (۴۵ روز) تعداد نمونه های باززایی شده و نمونه هایی که تولید کالوس کرده بودند، شمارش و یادداشت برداری شدند. در میان نمونه های جایگزین شده، پروسه باززایی و ظهور گیاهچه فقط از ریزنمونه ساقه و در محیط MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BAP به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر Kin،

همچنین گزارش شده است که جنس داتوره جهت تولید کالوس به حضور همزمان اکسین و سیتوکینین نیازمند است (Dessouky et al., 2001). بنابراین میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون های رشد به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون های اکسین و سیتوکینین یک فاکتور مورفوزنتیکی تعیین کننده و مهم به شمار می رود (Abbasi et al., 2007). همچنین گزارش شده است که ترکیب هورمون 2,4-D و سیتوکینین در تسهیل القای کالوس و حفظ آن مؤثر است (Abd Elaleem et al., 2009).

برای صفت تعداد روز تا کالوس زایی، نتایج نشان داد، نوع تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل آن ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۱). در خصوص مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف کینتین و 2,4-D در صفت تعداد روز تا کالوس دهی، کمترین تعداد روز تا کالوس دهی در محیط MS محتوی ۰/۴ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D می باشد. در واقع با افزایش غلظت تنظیم کننده های رشدی، تعداد روز کمتری تا تولید کالوس نیاز است (شکل ۲). در رابطه با صفت حجم کالوس، نوع تنظیم کننده مورد استفاده و همچنین اثر متقابل آن ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود.

برای صفت حجم کالوس، نوع تنظیم کننده مورد استفاده و همچنین اثر متقابل آن ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱). بر اساس مقایسه میانگین دانکن در خصوص تأثیر سطوح مختلف 2,4-D در تولید کالوس حجمی تر بر اساس مقیاس هوکر و نی برز (۱۹۷۷)، مشخص گردید که بیشترین حجم کالوس در سطح ۰/۴ میلی گرم بر لیتر 2,4-D در شرایطی که ۰/۴ میلی گرم بر لیتر کینتین در محیط موجود باشد، به دست آمد (شکل ۳). با علم به این که هورمون 2,4-D فقط تا میزان خاصی هورمون رشد بوده و از آن میزان بالاتر اثر معکوس دارد. بنابراین نتایج این تحقیق مؤید این مطلب خواهد بود (Fazeli-nasab et al., 2009).

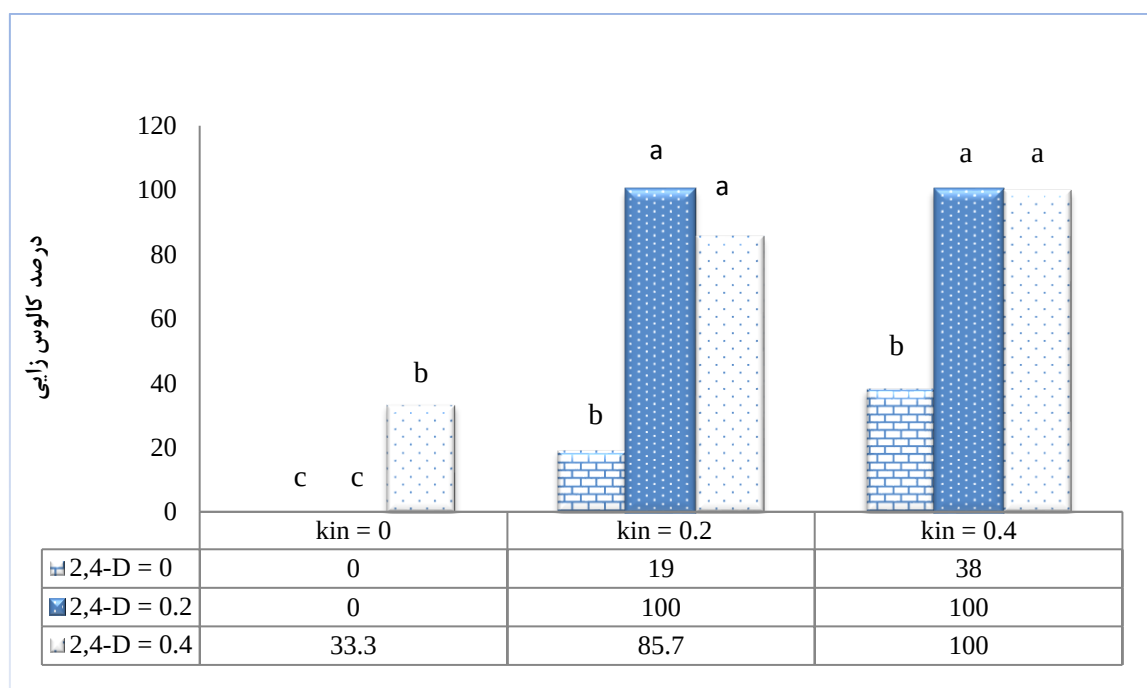
همکاران (۱۳۹۱) در مورد گیاه نوروژک (*Salvia leriifolia*) بیش‌ترین درصد باززایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین به نتایج مشابهی دست یافتند.

همچنین محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌دست آمد (شکل ۵-ج). نتایج حاصل از آزمایش نشان داد (شکل ۴)، بهترین محیط برای درصد باززایی مستقیم، محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin می‌باشد. مدرس و

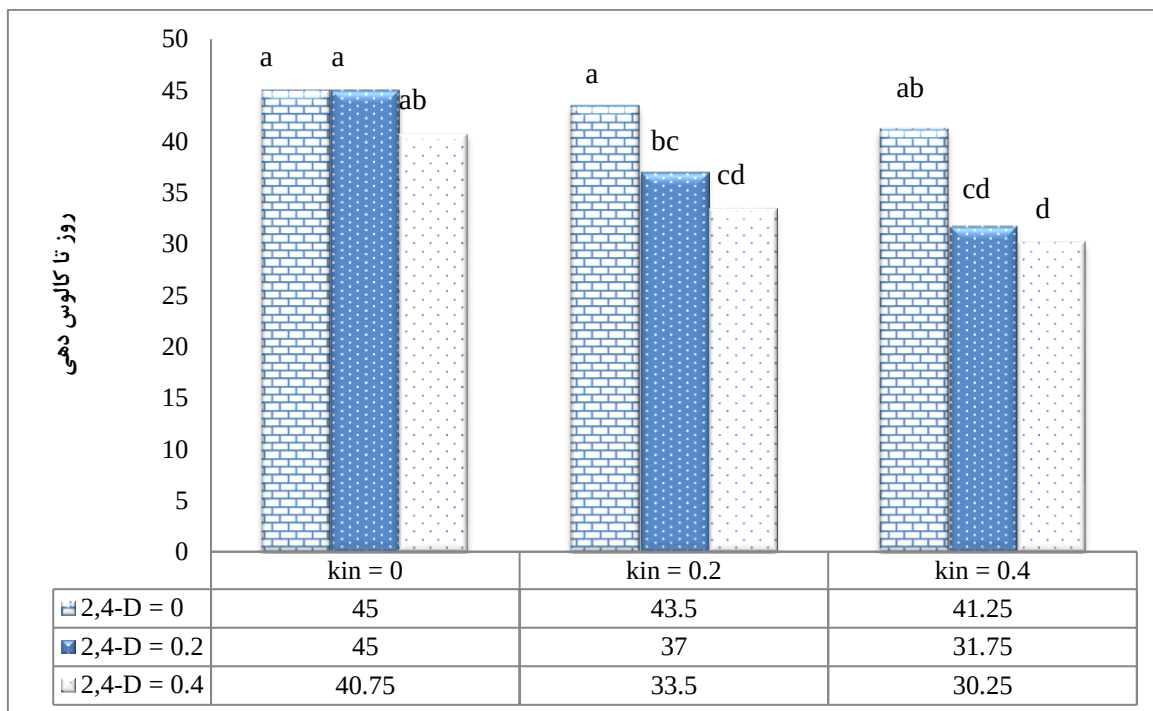
جدول ۱- جدول تجزیه واریانس برای صفات درصد کالوس‌زایی، تعداد روز تا کالوس‌دهی و حجم کالوس در گیاه اسطوخودوس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد کالوس‌زایی	روز تا کالوس‌دهی	حجم کالوس
2,4-D	۲	۱۰۵۶۱/۸۷**	۲۱۷/۵۸۳**	۲۹۳/۲۶۳**
Kinetin	۲	۱۴۶۹۱/۸۷**	۲۵۶/۰۸۳**	۲۸۴/۱۵۲**
2,4-D × kinetin	۴	۱۷۵۶/۶۴**	۲۵/۹۱۶*	۲۴/۷۵۶**
خطا (E)	۲۷	۱۰۵/۴۶	۷/۸۸۸	۳/۳۴۷
درصد ضریب تغییرات (%)	-	۱۹/۳۹۸	۷/۲۶۳	۲۱/۱۳۷

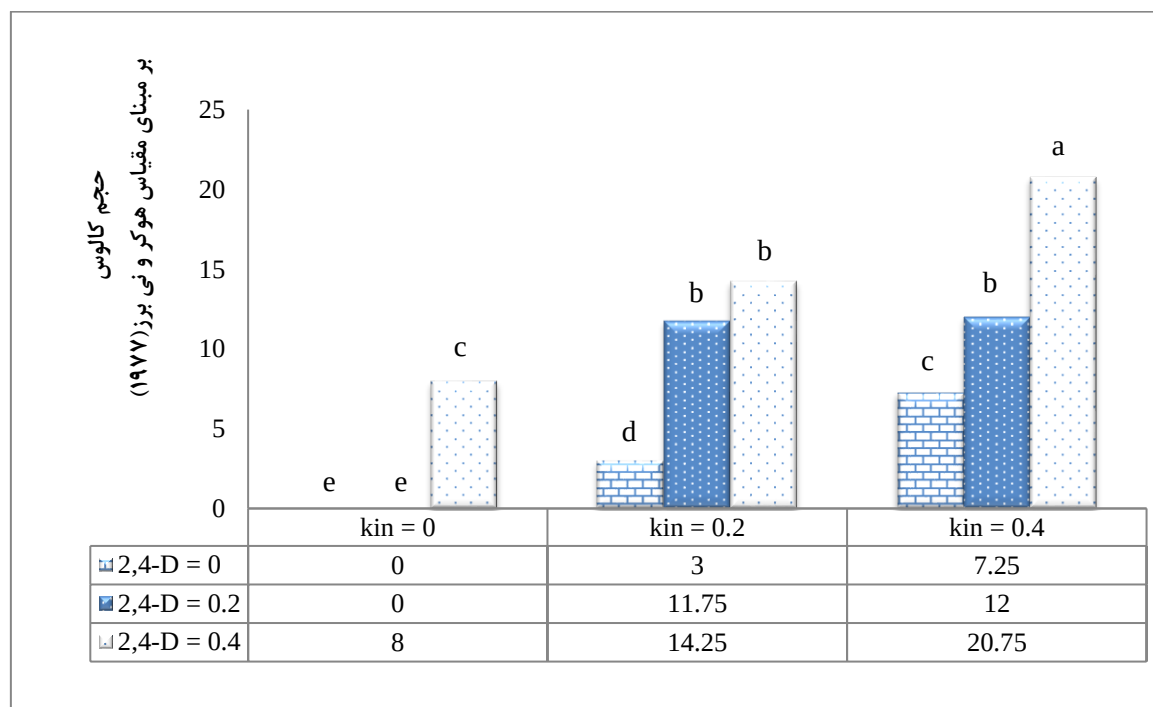
ns، * و **: به ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱



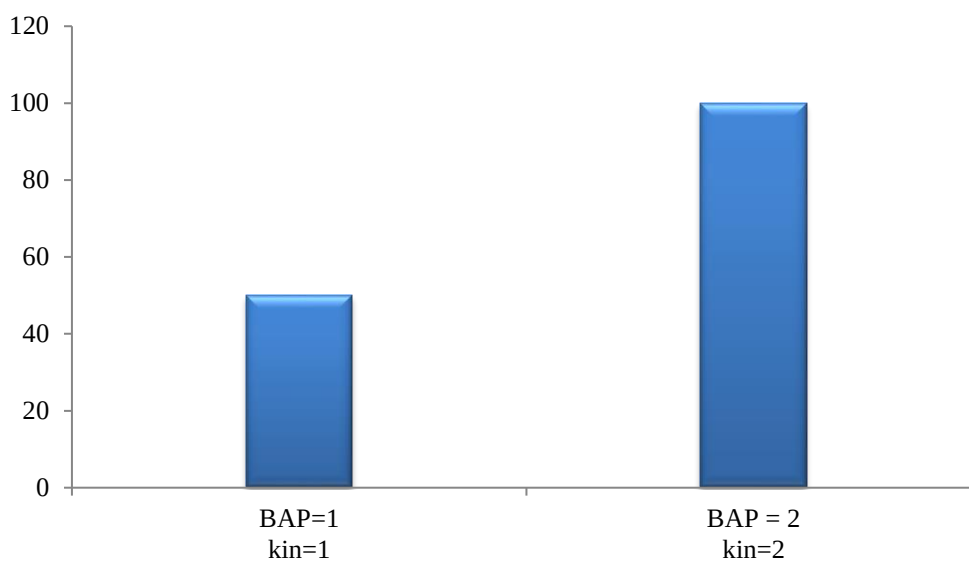
شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف Kin و 2,4-D در صفت درصد کالوس‌زایی



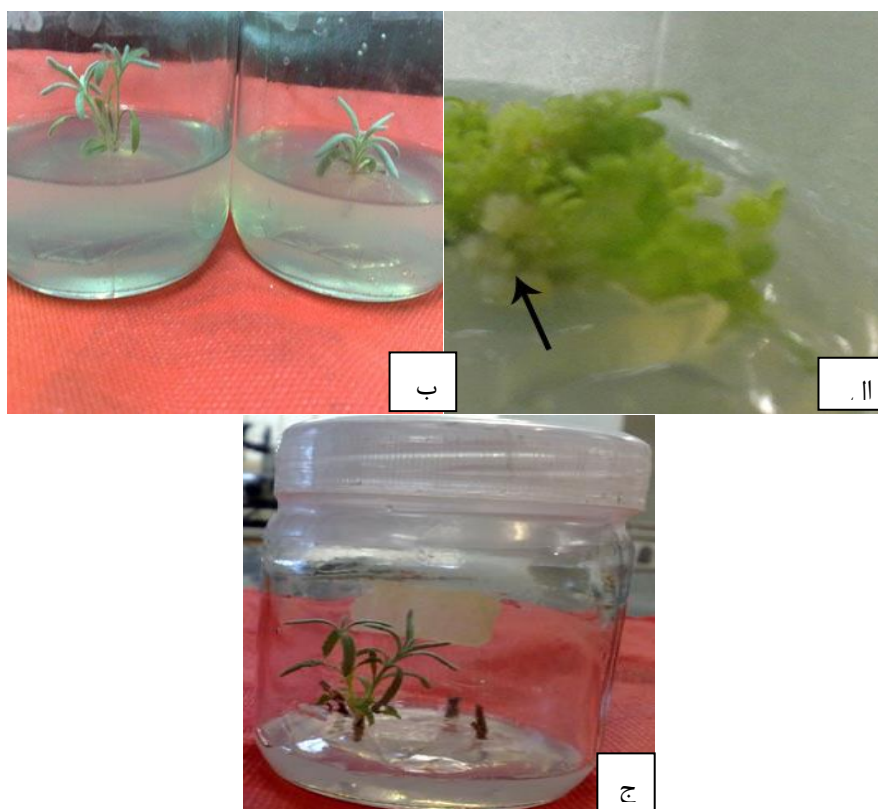
شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف Kin و 2,4-D در صفت روز تا کالوس دهی



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف Kin و 2,4-D در صفت حجم کالوس



شکل ۴- نمودار مقایسه درصد باززایی مستقیم در ۲ محیط تنظیم‌کننده رشدی باززایی شده



شکل ۵- الف) تشکیل اندام هوایی، ب) تشکیل گیاهچه، ج) باززایی گیاهچه از ریزنمونه ساقه در محیط کشت درون شیشه‌ای پس از گذشت ۴۵ روز

بیش‌ترین درصد کالوس به همراه حجیم‌ترین کالوس تولید شد. ترکیب دو تنظیم‌کننده رشدی اکسین و سیتوکنین میزان تولید کالوس را افزایش داد. باززایی غیرمستقیم فقط

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصله بیانگر این مطلب است که در محیط MS تکمیل شده با ۰/۴ میلی گرم 2,4-D و ۰/۴ میلی گرم Kin

لیتر Kin به دست آمد. بنابراین نتیجه گیری می شود که بهترین محیط کشت جهت باززایی این گیاه محیط فاقد اکسین بوده و ریزنمونه نشان دهنده باززایی نیز ساقه می باشد در حالیکه ریزنمونه سرشاخه جوان این پاسخ را نشان نداد.

از کالوس های ریزنمونه ساقه و در محیط MS حاوی ۱/۶ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی گرم در لیتر کینتین رخ داد. بنابراین نتیجه گیری می شود که بهترین محیط کشت جهت باززایی این گیاه محیط فاقد اکسین می باشد. باززایی مستقیم با بیشترین درصد باززایی از ترکیب ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی گرم در

منابع

- due to light/dark treatment. Plant Physiology, 121(1), 245-252.
- Bias, L.A., Falco, M.C., Rodriguez, A.P.M., and Mendes, M.J. (2000). Organogenesis from internodal segments of yellow Passion fruit. Scientia Agricola, 57(4), 661-665.
- Dessouky, M., Taha, H. and El-Bahr, M. (2001). Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L. Biotechnology, 4, 23-30.
- Dias, M.C., Almeida, R. and Romano, A. (2002). Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through in vitro axillary shoot proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68(1), 99-102.
- Dudits, D., Gyorgyey, J., Bogle L. and Bako, L. (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. In: In vitro embryogenesis in plants. (Ed.): Thorpe, T.A. Kluwer Academic, Dordrecht, Boston, London. 267-308.
- Fazeli-nasab, B., Omid, M. and Amirtokehdani, M. (2004). Effects of abscisic acid on callus induction and regeneration of different wheat cultivars to mature embryo culture. The 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26 Sep - 1 Oct ISBN 1920842209.
- Gras, M.C.S. and Calvo, M.C. (1996). Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45, 259-261.
- Gras, M.C.S. and Calvo, M.C. (1996). Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 45, 259-261.
- Hooker, M.P. and Nabors, M.W. (1977). Callus initiation, growth and organogenesis in Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). ZPflanzen Physiology, 84, 237-246.
- Ilahi, I.S., Bano, M.J. and Rahim, F. (2005). Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. cv
- باقری، ه. و آزادی، پ. (۱۳۸۱). کشت بافت گیاهی تکنیک ها و آزمایش ها. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- پیوندی، م.، مراد تهرانی، م.، و مجد، ا. (۱۳۹۰). ریزازدیادی گیاه داوودی (*Chrysanthemum morifolium* Ramat L.). مجله زیست شناسی ایران، ۲۴(۲)، ۲۳۹-۲۴۴.
- زرگری، ع. (۱۳۶۹). گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران.
- مجتوی، س.ش. و امید، م. (۱۳۹۵). تأثیر غلظت های هورمونی و نوع ریزنمونه بر کالوس زایی گیاه شقایق ایرانی (*Papaver bracteatum*). مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی ایران)، ۱، ۱۹۸-۱۹۱.
- مدرس، م. (۱۳۹۱). مطالعه ریزازدیادی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) با استفاده از کشت جوانه انتهایی. فصلنامه زیست شناسی گیاهی ایران. ۴(۱۴): ۸۹-۱۰۰.
- Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z. (2007). Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 43, 481-492.
- Abd Elaleem, K.G., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M. (2009). Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8(11), 2529-2534.
- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F. and Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common Lavender (*Lavandula vera* DC). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56, 79-83.
- Benková, E., Witters, E., Van Dongen, W., Kolá, J., Motyka, V., Brzobohatý, B., Van Onckelen, H.A. and Macháková, I. (1999). Cytokinins in Tobacco and Wheat chloroplasts: Occurrence and changes

for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Chrysanthemum (dendranthema × grandiflorum)* (Ramat.) Kitamura). Plant Biotechnology, 21(1), 25-33.

Skala, A. and Wysokinska, A. (2006). In viro regeneration of (*Salvia nemorosa* L.) from shoot tips and leaf explants. Department of Biology and Pharmaceutical Botany. 1, 90-151.

Tsuro, M., Koda, M. and Inoue, M. (2000). Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the "open culture system". Scientia Horticulture, 86, 81-88.

SWAT-II) through somatic embryogenesis. Pakistan Journal of Botany, 37(2), 237-242.

Nobre, J. (1996). In vitro cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 46, 151-155.

Panizza, M. and Tognoni, F. (1988). Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of *Lavandin*. Scientia Horticulturae, 37, 157-163.

Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T. (2004). A simple and efficient method