مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1391)

بررسی اثرات ترکیبات مختلف هورمونی بر میزان باززایی مستقیم شاخساره در شرایط درون شیشه‌ای ریحان (*Osmium basilicum* L.)

فرهاد اصغری*[1]، بهمن حسینی[2]، عباس حسنی[3]، محمد رضا اصغری[2]، جواد فرخی[1]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه
2- استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
3- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: 1390/4/20، تاریخ پذیرش: 1391/5/18

چکیده

ریحان (*Osmium basilicum*) گیاهی علفی، متعلق به خانواده نعناعیان و غنی از اسانس‌های روغنی است که برای اهداف مختلف دارویی، بهداشتی و خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعهٔ حاضر به منظور تعیین مناسبترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد اکسینی و سایتوکینینی و مشخص نمودن بهترین غلظت برای به دست آوردن بیشترین بازده در تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از ریزنمونه‌های گره شاخساره گیاه ریحان در محیط کشت پایه MS انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با 3 تکرار اجرا گردید. در این آزمایش از سطوح مختلف تنظیم کنندهٔ رشد BAP (0، 2/5، 5 و 7/5 میلی-گرم در لیتر) و IAA (0، 0/1 و 0/5 میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید، و صفات درصدباززایی، تعدادباززایی در هر ریزنمونه، درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده و میزان تولید ریشه اندازه‌گیری و بررسی شد. بهترین باززایی از لحاظ درصد و تعداد باززایی در هر ریزنمونه، در محیطMS تکمیل شده با غلظت 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون هورمون IAA به دست آمد. با افزایش غلظت هورمون BAP، میزان شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها افزایش یافت و بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت 0/5 میلی‌گرم در لیتر IAA بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریحان، گره، باززایی، شیشه‌ای شدن، درون شیشه.

* نویسنده مسئول: فرهاد اصغری تلفن: 09143207854 Email: asghari.farhad@yahoo.com

مقدمه

ریحان (*Osmium basilicum*)، یکی از محبوب‌ترین گیاهان دارویی پرورش یافته در جهان، گیاهی علفی، یکساله، همیشه سبز و متعلق به خانواده نعناعیان است. این گیاه بومی ایران، افغانستان و هند می‌باشد و همچنین بعضی از گونه‌های وحشی آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دیده می‌شود. از ریحان به عنوان گیاه دارویی، ادویه‌ای و همچنین به عنوان سبزی تازه استفاده می‌شود (Hassani & Omidbeygi, 2003). ریحان یک محصول مهم اقتصادی در سراسر جهان می‌باشد که تولید سالیانه اسانس آن به 100 تن و ارزش فروش گلدانی آن به 15 میلیون دلار می‌رسد (Begum *et al.*, 2002). اسانس ریحان که حدود 1 درصد است شامل ترکیبات متنوع و پیچیده می‌باشد که رایج‌ترین آنها مونوترپن‌ها و فنیل‌پروپانوئیدها هستند. اسانس ریحان شامل مشتقات فنولی مانند اوژنول، متیل‌اوژنول، متیل‌کاویکول، استراگول و متیل-سینامات و مقادیر مختلفی از لینالول می‌باشد (Makri & Kintzios, 2008). واریته‌های تجاری فعلی ریحان تنوع بسیار زیادی را از لحاظ شکل برگ، رنگ گلها، ارتفاع و ساختار گیاه و اجزای مواد مؤثره نشان می‌دهند. اخیراً مشخص شده است که واریته‌های بنفش ریحان منابع غنی از آنتوسیانین می‌باشند که می‌توانند بعنوان منبعی از آنتی‌اکسیدانت‌ها مطرح باشند. یکی از مشکلات مهم در استفاده از گونه‌های خانواده نعناع برای اهداف داروئی، تفاوت‌های فردی ژنتیکی و بیوشیمیایی آنها می‌باشد (Bicca Dode *et al.*, 2003). اگر چه گیاه ریحان بطور معمول از طریق بذر تکثیر می‌شود اما دانهال‌های حاصله تنوع زیادی را در اثر دگرگرده‌افشانی طبیعی گیاه نشان می‌دهند. ازدیاد درون شیشه‌ای یک روش مؤثر برای تکثیر سریع گونه‌های گیاهی است که باعث تولید نتاجی با یکنواختی بالا می‌شود. اهمیت ریزازدیادی ریحان با روشهای کشت بافت در منابع مختلفی ذکر گردیده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌های Sahoo *et al.*, 1997، Singh & Seghal, 1999، Begum *et al.*, 2000، Phippen & Simon, 2000 و Bicca Dode *et al.*, 2003 اشاره نمود. در کشت بافت گیاهی شرایط متعدد و پیچیده‌ای تأثیر گذار هستند که از آنها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود.

تا کنون گزارش‌های متعددی در زمینه اپتیمم مقدار تنظیم کننده‌های رشد برای باززایی گونه‌های مختلف گیاه ریحان، نظیر ($1mgL^{-1}$ $^1BAP+0.05mgL^{-1}IAA$) (1999) Singh & Shegal، ($0.5mgL^{-1}BAP+1mgL^{-1}IBA$) Makri & Kintzios (1999)، ($0.5mgL^{-1}$) Pattnaik *et al* (1995) ($^1BAP+0.3mgL^{-1}GA_3$)، ($0.25mgL^{-1}BAP+0.5mgL^{-1}GA_3$) Pattnaik & Chand (1996) و ($1mgL^{-1}$) Sahoo *et al* (1997) ($^1BAP+0.4mgL^{-1}GA_3$) ارائه شده است.

این پژوهش به منظور ارزیابی پاسخ ریز نمونه‌های گره گیاه ریحان به ترکیبات مختلف هورمونهای BAP و IAA به تنهایی یا در ترکیب با هم و شناسایی بهترین محیط باززایی حاوی حداکثر گیاه باززا شده در هر ریزنمونه و در هر تیمار اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه و استریل‌کردن بذور: در این آزمایش از بذور رقم کشکنی لؤلؤ که یک رقم اصلاح شده وارداتی از کشور مجارستان است استفاده گردید. این آزمایش در سال 1388 در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه انجام گردید. جهت ضدعفونی از الکل اتانول 70 درصد به مدت 1 دقیقه، هیپوکلریت سدیم در غلظت 5 درصد و زمان 10 دقیقه استفاده شد. بذور در بین مراحل ضدعفونی 3 دفعه با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. همچنین در تمامی تیمارهای ضد عفونی از ماده توئین 20، به مقدار 1 الی 2 قطره، به منظور تماس بهتر ماده ضدعفونی با پوشش بذر استفاده گردید.

کشت بذور: بذور ضدعفونی شده در داخل محیط کشت پایه جوانه‌زنی (Murashige & Skoog, 1962) MS شامل 3 درصد ساکارز، 100 میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و 0/7 درصد آگار کشت گردیدند. pH محیط کشت با KOH یک نرمال در 5/8 تنظیم گردید. در داخل هر فلاسک تعداد 20 عدد بذر کشت گردید. بذرها پس از انتقال به فلاسک حاوی محیط کشت پایه MS در دمای $25\pm1^{\circ}c$ و دوره نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تیمارهای هورمونی: تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (IAA) از گروه اکسین‌ها و بنزیل‌آمینوپورین (BAP) از گروه سایتوکینین‌ها در غلظت‌های مختلف در محیط پایهٔ MS مورد آزمایش قرار گرفتند. در قالب یک آزمایش فاکتوریل ترکیبی از تنظیم کننده‌های رشدی BAP با غلظت‌های (0، 2/5، 5 و 7/5 میلی‌گرم در لیتر) و IAA با غلظت‌های (0، 0/1 و 0/5 میلی‌گرم در لیتر)، در قالب 12 ترکیب تیماری مورد آزمایش قرار گرفتند. در همه محیط کشت‌ها pH محیط کشت روی 5/8 تنظیم گردید. لازم بذکر است بدلیل حساسیت IAA به گرما و تجزیه آن در حین اتوکلاوکردن، از فیلتر سرنگی با قطر منافذ 0/22 میکرون به منظور استریل‌کردن استفاده گردید.

کشت ریزنمونه: بعد از گذشت 2 هفته از رشد گیاهچه‌ها قطعات 8-7 میلی‌متری از اولین گره بالای لپه‌های بذری همراه با جوانه‌های جانبی تهیه شد. در هر ظرف پتری 10 سانتی-متری 10 قطعه ریزنمونه در محیط‌های MS حاوی ترکیبات مختلف هورمونی غنی شده با ساکارز (3 درصدوزنی-حجمی) و میواینوزیتول (100 میلی‌گرم در لیتر وزنی-حجمی) و حاوی ترکیبات مختلف هورمونی کشت گردیدند و درب پتریها توسط پارافیلم بسته شدند. واکشت

ریزنمونه‌ها پس از گذشت 2 هفته انجام و نتایج پس از گذشت 8 هفته یادداشت برداری گردید.

صفات مورد اندازه‌گیری: صفات مورد اندازه‌گیری در این آزمایش شامل درصدباززایی-شاخساره، تعدادباززایی در هر ریزنمونه، درصد-نمونه‌های شیشه‌ای شده و درصد تولید ریشه بودند. برای محاسبه درصد باززایی شاخساره، مجموع شاخساره‌های تولید شده در هر پتری شمارش گردید و با درصد بیان گردید. برای محاسبه تعداد باززایی در هر ریزنمونه، مجموع شاخساره‌های تولید شده در هر پتری شمارش گردید و بر تعداد ریزنمونه‌های هر پتری تقسیم گردید تا میانگین باززایی برای هر ریزنمونه مشخص گردد.

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. همچنین جهت نرمال نمودن داده‌ها از تبدیل داده‌های مناسب استفاده گردید. برای اینکه داده‌های مربوط به صفات درصد باززایی شاخساره، درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده و درصد تولید ریشه دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده زاویه‌ای Arcsin √X استفاده شد.

نتایج

جوانه‌زنی بذور

دو روز پس از کشت‌بذور، جوانه‌زنی شروع گردید و تمامی گیاهچه‌ها دارای ریشه‌ها و شاخساره‌های نرمال بودند. گیاهچه‌ها بعد از گذشت 2 هفته دارای ارتفاع 14 سانتیمتر، و طول ریشهٔ 4 سانتیمتر بودند. درصد جوانه‌زنی بذور 100% بود (شکل A-5).

درصد باززایی شاخساره

طبق نتایج تجزیهٔ واریانس، اثرات ساده بنزیل آدنین (در سطح احتمال 1 درصد) و اکسین (در سطح احتمال 5 درصد) و نیز اثرات متقابل آنها (در سطح احتمال 1 درصد) بر درصد باززایی معنی‌دار بوده است (جدول 1). نتایج مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید نشان می‌دهد که ترکیبات تیماری مختلف، اثرات متفاوتی داشتند (شکل 1). بهترین درصد باززایی (96/67 درصد) در غلظت 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت صفر میلی-گرم در لیتر IAA بدست آمد. تیمارهای 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP به علاوه 0/1 میلی‌گرم در لیتر IAA و 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP به علاوه 0/5 میلی‌گرم در لیتر IAA به ترتیب با 83/33 و 80 درصد باززایی، از نظر گروهبندی نیز هر دو در گروه b قرار گرفتند. کمترین درصد باززایی شاخساره نیز به تیمارهای بدون کاربرد بنزیل آدنین (شاهد، غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر BAP به علاوه 0/1 میلی‌گرم در لیتر IAA و غلظت

صفر میلی‌گرم در لیتر BAP به علاوه 0/5 میلی-گرم در لیتر IAA) تعلق داشت. همچنین در تیمارهای کاربرد هورمون بنزیل آدنین، صرفنظر از تیمار اکسین با افزایش غلظت بنزیل آدنین درصد باززایی کاهش یافت.

جدول 1- تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی تحت تأثیر تیمارهای ترکیبی بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید.

Table 1- Variance analysis of different traits evaluted under different combination tratments of BAP and IAA.

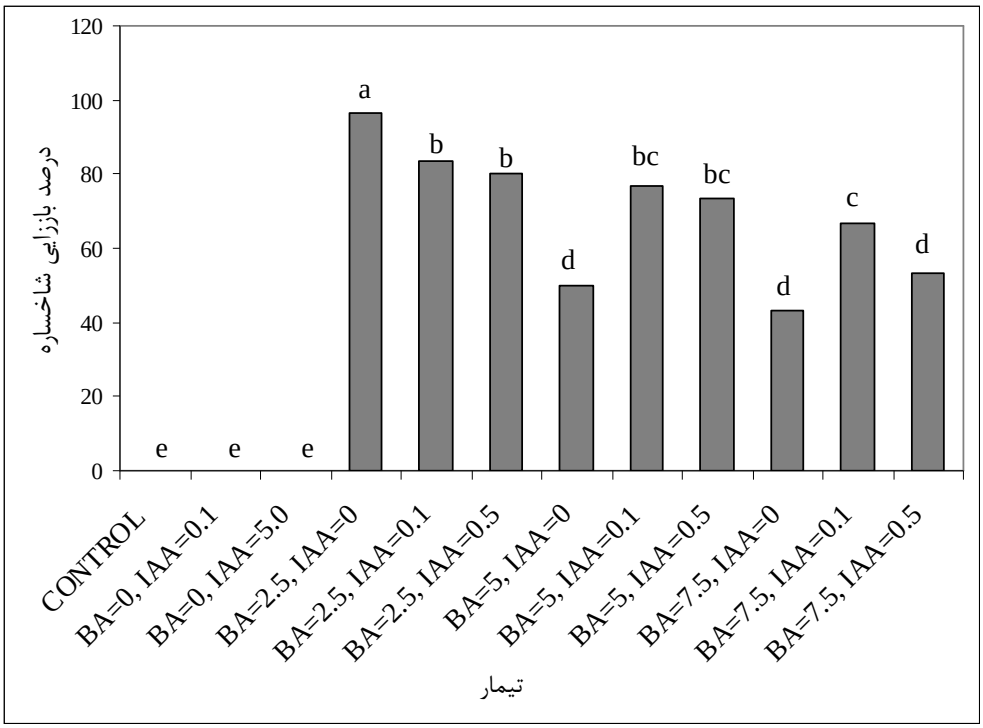
منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی Df	میانگین مربعات (MS) درصد باززایی Regeneration percent	تعداد باززایی در هر ریزنمونه Regeneration per explant	درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده Vitrification percent	درصد تولید ریشه Rooting percent
بنزیل آدنین BAP	3	123.806**	3701.435**	82**	77.111**
اکسین IAA	2	2.528*	33.583 ns	4.083**	16.861**
بنزیل آدنین×اکسین BAP×IAA	6	3.417**	67.991*	1.861**	2.417*
اشتباه آزمایشی Error	24	0.482	25.629	0.386	0.838
ضریب تغییرات (%) (C.V)		13.37	18.53	18.65	15.55

ns ** و * : به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 1% و 5%

تعداد باززایی در هر ریزنمونه

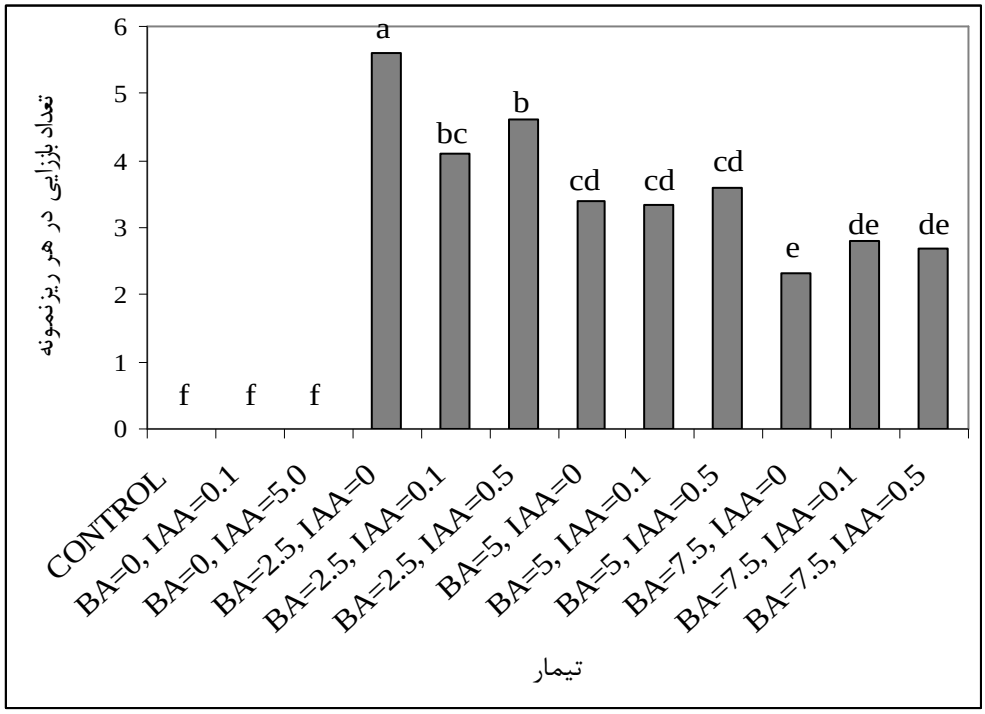
نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات ساده بنزیل آدنین (در سطح احتمال 1 درصد) و اثرات متقابل بنزیل آدنین و اکسین (در سطح احتمال 5 درصد) بر تعداد باززایی در هر ریزنمونه معنی‌دار بوده است در حالی‌که کاربرد اکسین تأثیر معنی‌داری بر این صفت نداشته است (جدول 1). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید می‌توان بیان داشت که بالاترین تعداد باززایی در هر ریزنمونه (5/6 عدد) مربوط به غلظت 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP به علاوه صفر میلی‌گرم در لیتر IAA و پائینترین تعداد باززایی در هر ریزنمونه (صفر عدد) مربوط به تیمارهای

بدون کاربرد هورمون بنزیل آدنین بوده است (شکل 2). همچنین صرفنظر از تیمار اکسین، در تیمارهای کاربرد بنزیل آدنین با افزایش غلظت این هورمون تعداد باززایی در هر ریزنمونه کاهش نشان داد.



شکل 1- اثرات متقابل غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین و ایندول استیک اسید بر درصد باززایی شاخساره. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Figure 1- Interaction between different concentration of BAP and IAA on regeneration percent of shoot. Means that have the letters are shared according to Duncan's multiple range test at 5% level do not have significant difference.

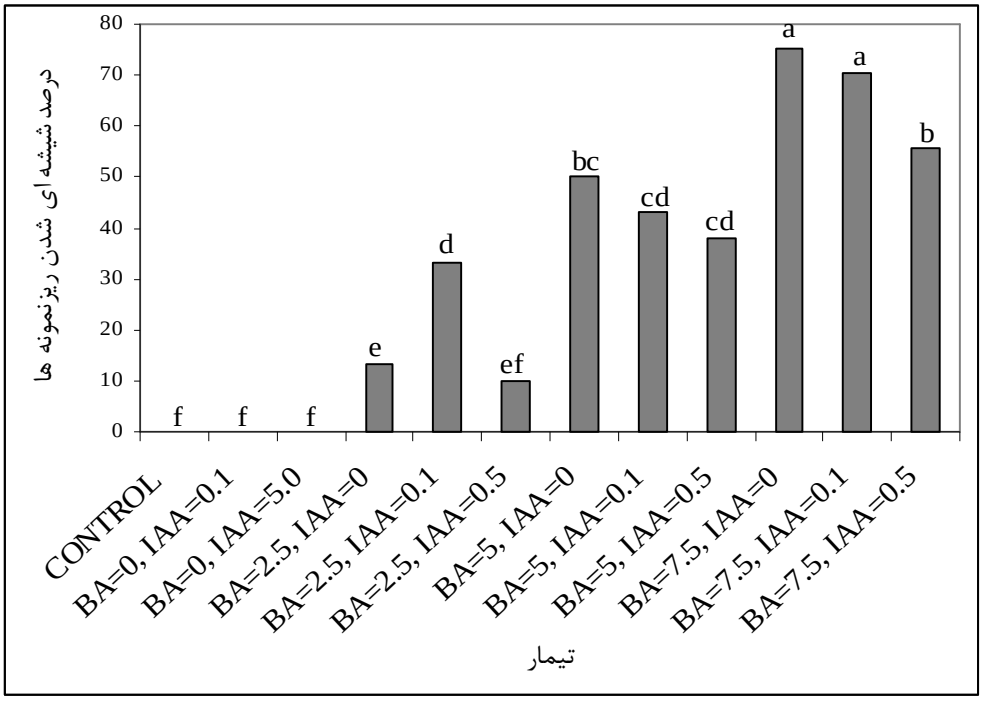


شکل 2- اثرات متقابل غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین و ایندول استیک اسید بر میانگین تعداد باززایی در هر ریزنمونه. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Figure 2- Interaction between different concentration of BAP and IAA on number of shoot regenerated. Means that have the letters are shared according to Duncan's multiple range test at 5% level do not have significant difference.

درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات ساده بنزیل آدنین، اکسین و نیز اثرات متقابل آنها بر درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده معنی‌دار (در سطح احتمال 1 درصد) بوده است (جدول 1). طبق نتایج مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید، بیشترین درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده به تیمارهای (غلظت 7/5 میلی‌گرم در لیتر BAP و صفر میلی‌گرم در لیتر IAA و غلظت 7/5 میلی-گرم در لیتر BAP و 0/1 میلی‌گرم در لیتر IAA) و کمترین درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده به تیمارهای بدون کاربرد هورمون بنزیل آدنین تعلق داشت (شکل 3). صرفنظر از تیمار اکسین، با افزایش غلظت بنزیل آدنین درصد شیشه‌ای شدن نمونه‌ها افزایش نشان داد.

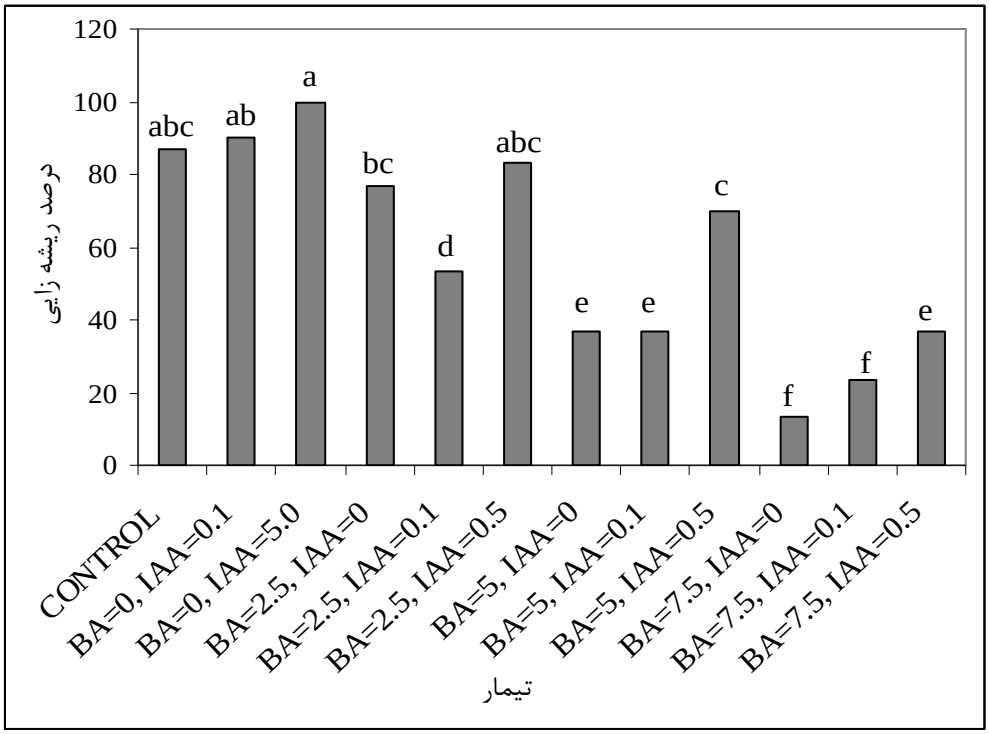


شکل 3- اثر متقابل غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین و ایندول استیک اسید بر درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Figure 3- Interaction between different concentration of BAP and IAA on vitrification. Means that have the letters are shared according to Duncan's multiple range test at 5% level do not have significant difference.

درصد تولید ریشه

نتایج تجزیه واریانس مؤید آن است که اثرات ساده بنزیل آدنین و اکسین (در سطح احتمال 1 درصد) و اثرات متقابل آنها (در سطح احتمال 5 درصد) بر درصد ریشه‌زایی نمونه‌ها معنی‌دار بوده است (جدول 1). نتایج مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید نشان می‌دهد که بالاترین درصد ریشه‌زایی در تیمارهای بدون کاربرد هورمون بنزیل آدنین و پایینترین درصد ریشه‌زایی در تیمارهای کاربرد 7/5 میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین ملاحظه گردید (شکل 4). صرفنظر از تیمار بنزیل آدنین، با افزایش غلظت ایندول استیک اسید، درصد ریشه‌زایی نمونه‌ها افزایش یافت.



شکل 4- اثرات متقابل غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بر درصد ریشه زایی نمونه‌ها. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Figure 4- Interaction between different concentration of BAP and IAA on rooting. Means that have the letters are shared according to Duncan's multiple range test at 5% level do not have significant difference.

بحث کلی

BAP و IAA دو تنظیم کننده رشدی هستند که بیش از سایر سایتوکینین‌ها و اکسین‌ها در کشت بافت گیاه ریحان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sahoo *et al.*, 1997; Begum *et al.*, 2002; Gopi & Ponmurugan, 2006; Banu & Bari, 2007; Siddique & Anis, 2008).

استفاده از ریزنمونه گره جهت باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی ریحان قبلاً توسط Asghari *et al.* (2012) گزارش شده است. ایشان در مطالعه‌ای جهت بررسی قابلیت باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی ریحان از ریزنمونه-های مختلف، مشاهده گردید که ریزنمونه گره و کوتیلدون از پتانسیل بالایی جهت باززایی شاخساره برخوردار می‌باشد. ظرفیت بالای ریزنمونه گره جهت استفاده در شرایط درون شیشه‌ای گیاه ریحان، توسط محققین مختلف نیز مطالعه شده است (Begum *et al.*, 2002; Bicca Dode *et al.*, 2003). در این آزمایش ریزنمونه گره به عنوان ریزنمونه اصلی جهت بررسی اثرات ترکیبات هورمونی مورد استفاده قرار گرفت (شکل 5-B, C). بررسی اثر 12 ترکیب مختلف هورمونی بر روی باززایی از لحاظ (درصد و

میانگین باززایی در هر تیمار) نشان داد که حداکثر باززایی در محیط حاوی 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP به دست می‌آید و حداقل باززایی (صفر) در محیط فاقد هورمون BAP مشاهده گردید که این نتایج ثابت می‌کند هورمون BAP در تحریک شاخه‌زایی در ریزنمونه گره دارای نقش فوق العاده‌ای می‌باشد. استفاده از BAP اثر معنی‌داری بر روی تمام صفات مورد مطالعه در سطح احتمال 1% داشت (جدول 1). گزارش شده است سایتوکینین‌ها نقش اساسی در تقسیم سلولی داشته و باعث رفع غالبیت انتهایی شده و بر القای شاخساره و رشد شاخساره اثر می‌گذارند (Precce, 1995). همچنین نوع سایتوکینین و غلظت آن فاکتورهای مهمی در مؤفقیت پرآوری درون شیشه‌ای هستند (Grattapaglia & Machado, 1998). طبق گزارش Mendoza و Kaeppler (2002)، استفاده از تنظیم کننده رشد اکسین باعث باززایی گیاهچه‌ها و تشکیل کالوس شده و در ترکیب با تنظیم کننده رشد سایتوکینینی باعث سریعتر شدن سرعت تقسیم سلولی و در نهایت باعث تشکیل تعداد زیادی سلول‌های کوچک و تمایز نیافته می‌شود (Mendoza & Kaeppler, 2002). این مطالعه نشان داد که کاربرد غلظت 2/5 میلی‌گرم در لیتر BAP، باعث افزایش باززایی در مقایسه با کاربرد ترکیبی هورمونهای سایتوکینین و اکسین می‌گردد. باززایی یک فرآیند فوق العاده پیچیده است که عوامل متعدد کمی و کیفی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، موقعیت اولیه قلمه روی گیاه، سن قلمه، فصل سال، میزان هورمون‌های درون زا، اندازه قلمه، مقدار مواد تنظیم کننده رشد و غیره بر آن تأثیر می‌گذارند (Bagheri, 1997). همچنین نسبت اکسین به سایتوکینین مهم است. با کاهش اکسین و افزایش سایتوکینین در بعضی گونه‌ها، جوانه‌ها تشکیل می‌شود. بنابراین، با تغییر مقدار دو تنظیم کننده رشد در محیط کشت، می‌توان قدرت ریخت‌زایی در ریزنمونه‌ها را به میزان قابل توجهی کنترل نمود. معلوم شده هورمونها اثر متقابل روی یکدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود بخشند (Del Poza *et al.*, 2005). علت همگرایی سایتوکینن با اکسین در تقسیم سلولی عبارتست از: اولاً برای تقسیم سلول ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیافتد و بدنبال آن تقسیم سلولی انجام بگیرد و تا زمانی که سلول به یک اندازه مشخص نرسیده است تقسیم سلولی صورت نخواهد پذیرفت. ثانیاً مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند به اثر اکسین است (Wang *et al.*, 1981; Bayliss, 1985). پدیده شیشه‌ای شدن (جذب زیاد آب)، باعث ظهور شاخه‌هایی با ظاهر شکننده، شیشه‌ای و آبکی می‌شود. در بسیاری از گونه‌ها شیشه‌ای شدن ممکن است با علائم ظاهری قابل شناسایی و مشخص نباشد. برای مثال اتصال دسته‌های آوندی به صورت ضعیف ایجاد می‌گردد و یا باعث تولید لایه واکسی غیر نرمال شده و همچنین باعث اختلال در وظایف روزنه‌ای می‌شود (شکل F-5). شیشه‌ای شدن در نتیجه عدم تعادل فاکتورهای مؤثر بر رشد (تجمع

رطوبت ناشی از پوشش پارافیلم که مانع از تبادلات گازی می‌شود، تجمع اتیلن، غلظت پایین آگار در محیط کشت، دزهای بالای سایتوکینین برون زا و ...) ایجاد می‌شود و منجر به کاهش تولید گیاهچه‌های باززایی شده می‌شود (Leshem, 1983; Meira *et al*., 1983). به نظر می‌رسد که در بین تنظیم کننده‌های رشد، گروه سایتوکینین‌ها و در بین سایتوکینین‌ها، BAP در عارضه شیشه‌ای شدن عامل بسیار مهمی باشد و هر اندازه غلظت آن افزایش یابد به همان اندازه نیز شیشه‌ای شدن بیشتر می‌شود (Keverse *et al*., 1987). در پژوهشی Keverse *et al*. (2002)، دریافتند که وجود تنظیم کننده رشد BAP در محیط کشت باعث القای پدیده شیشه‌ای شدن در کشت بافت سیب می‌گردد.

نتایج این آزمایش در مورد تأثیر BAP در القای پدیده شیشه‌ای شدن، نتایج Genkov & Ivanova (1995)، در مورد مؤثر بودن اثرات سایتوکینین‌های مختلف در القای پدیده شیشه‌ای شدن در کشت بافت میخک رقم وایت سیم را تایید می‌کند. آنها در آزمایشات خود به منظور بررسی اثرات سایتوکینین‌های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیداز در کشت درون شیشه‌ای گیاه میخک، گزارش کردند کاربرد[1] 4-PU-30 و TDZ باعث ایجاد تغییرات در تمامی اجزای پراکسیدازها مخصوصاً پراکسیدازهای محلول می‌شوند. بر اساس پژوهش مذکور، سایتوکینین‌ها با افزایش فعالیت پراکسیدازهای محلول و اختلال در فعالیت طبیعی غشاهای سلولی، باعث از دست رفتن خاصیت جذب انتخابی غشاء سلول و جذب بدون کنترل مولکولهای آب به داخل سلول و در نتیجه آبکی شدن بافت‌ها می‌گردند. Kadota & Niimi (2003) نیز همبستگی مثبت بین غلظت بالای سایتوکینین‌ها در محیط کشت گلابی با افزایش پدیده شیشه‌ای شدن را گزارش نمودند.

در این آزمایش مشخص گردید که کاربرد هورمون اکسین در محیط کشت در القای باززایی مؤثر ریشه بر روی کشت‌ها مؤثر می‌باشد. هر چند از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین کاربرد 0/5 میلی‌گرم در لیتر، 0/1 میلی‌گرم در لیتر و صفر میلی‌گرم در لیتر IAA، بر روی ریشه‌زایی وجود نداشت و هر سه در یک گروه قرار داشتند، ولی کاربرد 0/5 میلی‌گرم در لیتر IAA، باعث القای 100 درصد ریشه‌زایی بر روی نمونه‌ها گردید. اکثر گیاهان برای باززایی مؤثر ریشه، به اکسین نیازمندند. هورمون اکسین تنها برای القای ریشه ضروری است و پس از آن از رشد ریشه جلوگیری می‌کند. در آزمایشات مختلف از اکسین‌های مختلف و غلظت‌های مختلف برای ریشه زایی ریحان استفاده شده است. Bicca Dode (2003) غلظت 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA، Siddique و Anis (2008) غلظت 1 میکرومولار IBA، Gopi & Ponmurugan (2008) غلظت 0/5 میلی‌گرم در لیتر IAA را گزارش کرده‌اند.

1- N-phenyl-N- (2-chloro-4-pyridyl) urea

در آزمایش‌هایی Singh & Shegal (1999) به منظور ریزازدیادی ریحان *Ocimum sanctum* گزارش کردند تقریباً 92 درصد از شاخساره‌های باززا شده در محیط درون شیشه‌ای قادر به ریشه‌زایی در محیط بدون هورمون MS طی دو تا سه هفته پس از کشت بودند. بنا به گزارش Barcelo Coll (1988)، نوک شاخساره‌ها محل تولید و سنتز اکسین بوده که وقتی به سمت قسمت قاعده ساقه حرکت می‌کند باعث ریزوژنز و تحریک تولید ریشه می‌شود. با این وجود، کیفیت شاخساره در مرحله ازدیاد هم عامل تعیین کننده در مؤفقیت ریشه‌دهی است.

شکل 5- اثرات تنظیم کننده‌های رشد بر روی باززایی شاخساره، شیشه‌ای شدن و القای ریشه در *Ocimum basilicum*. A) گیاهچه‌های ریحان پس از گذشت دو هفته از کشت بذور. B,C) ریزنمونه‌های گره بعد از گذشت 3 هفته. D وE) باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های گره بعد از 4 هفته.F) شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS تکمیل شده با 7/5 میلی‌گرم در لیتر BAP.

Figure 5- Effect of PGRs on shoot formation, Vitrification and Root induction of *Ocimum basilicum* L. A) Seedling of *ocimum basilicum* after three weeks. (B,C) Nodal segment of basil after three weeks. D,E) Early shoot regeneration from nodal explants after 4 weeks. F) Vitrificated shoots on (7.5 mg/L^{-1}) BAP medium.

نتیجه گیری

در این آزمایش اثرات غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (صفر، 2/5، 5 و 7/5 میلی‌گرم در لیتر) و ایندول استیک اسید (صفر، 0/1 و 0/5 میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که بیشترین باززایی از لحاظ درصد و تعداد باززایی، در محیط کشت غنی شده با غلظت 2/5 میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و صفر میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید بدست آمد. بر اساس نتایج این آزمایش با افزایش غلظت بنزیل آدنین درصد شیشه‌ای شدن نمونه‌ها افزایش یافت و بیشترین ریشه‌زایی در محیط حاوی 0/5 میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید مشاهده گردید.

منابع

Asghari F, Hossieni B, Hassani A, Shirzad H (2012). Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). Australian Journal of Agricultural Engineering 3: 12-17.

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

Banu LA, Bari MA (2007). Protocol establishment for multiplication and regeneration of *Ocimum Sanctum* Linn. An important medicinal plant with higher religious value in bangladesh. Journal of Plant Science 2: 530-537.

Barcelo CJ, Nicolas RG, Sabater GB and Sanchez TR (1988). Fisiologia Vegetal. Piramide, Madri. Boufleuher LM, Schuelter AR, da Luz CL, Antes VA, *et al*. (2008). In vitro propagation of Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) with different auxin and cytokinin types and concentrarions. Asian Journal of Plant Science 12: 639-646.

Begum F, Amin MN, Azad M (2002). In vitro rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. Plant Tissue Culture 12: 27-35.

Bicca Dode L, Bobrowski VL, Braga EJB, Seixas FK, Schuch MW (2003). In vitro propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Acta Scientiarum 2: 435-437.

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, pp 157-178.

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

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

Gopi C, Ponmurugan P (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. Journal of Biotechnology 126: 260-264.

Grattapaglia D, Machado MA (1998). Micropropagation. In: Cultura de Tecidos e Transformacao Genetica de Plantas(Torres AC, Caldas LS and Buso JA, eds.). Embrapa-cnph, Brasilia 183-247.

Hassani A, Omidbeygi (2003). Effect of drought stress on some morphological and metabolical charectristics of basil. Journal of Agricultural Science 12: 47-59 (In Farsi).

Kadota M, Niimi Y (2003). Effects of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72: 261-265.

Keverse C, Prat R, Gaspar Th (1987). Vitrification of carnation in vitro: Changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content. Plant Growth Regulation 5: 59-66.

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

Makri O, Kintzios S (1999). Protein changes associated with in vitro plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. Poster P11, ISHS Working Group Quality Management in Micropropagation 'Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation.' University College, Cork, Ireland.

Makri O, Kintzios S (2008). Ocimum sp. (Basil): Botany, Cultivation, Pharmaceutical Properties, and Biotechnology. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 13: 123-150.

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

Mendoza MG, Kaeppler HF (2002). Auxin and suger effects on callus induction and plant regeneration Frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In vitro cell Development and Biology of Plant 38: 39-45.

Pattnaik S, Chand PK (1996). In vitro propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). Plant Cell Report 15: 846-850.

Pattnaik SK, Sahoo Y, Chand PK (1995). Clonal propagation of four medicinal plants, *Ocimum americanum* L. (hoary basil), *O. basilicum* L. (sweet basil), *O. gratissimum* L. (shrubby basil) and *O. sanctum* L. (sacred basil) through in vitro culture of axillary vegetative buds. In vitro Cellular and Developmental Biology 31: 79-81.

Preece JE (1995) Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? Plant Tissue Culture Biotechnology 1: 26-37.

Sahoo Y, Pattnaik SK, Chand PK (1997). In vitro clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. In vitro Plant Breeding 33: 293-296.

Siddique I, Anis M (2008). An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. Acta Physiologiae Plantarum 30: 493-499.

Singh NK, Sehgal CB (1999). Micropropagation of 'Holy Basil' (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescences of mature plants. Plant Growth Regulation 29: 161-166.

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.

Effect of different hormonal combination on *In vitro* direct shoot regeneration of basil (*Ocimum basilicum*)

Asghari F.[*1], Hossieni B.[2], Hassani A.[3], Asghari M.R.[2], Farrokhi J.[1]

1- MSc Student, Department of Horticulture, Faculty of agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Basil (*Ocimum basilicum*) is an annual, herbaceous plants belonging to the family of lamiaceae. Basil is used to as a herb, a spice as well as fresh vegetables. The present study aimed to investigate the effects of different concentrations of growth regulators such as auxin and cytokinin to identify the best hormonal concentration to obtain the highest yield of *in vitro* produced plantlets using nodal explants. Experiment was performed in factorial completely randomized design, using the basic MS. In this experiment the effects of different concentrations of BAP(0, 2/5, 5 and 7/5 mg/l) and indol acetic acid (0, 0/1 and 0/5 mg/l) was studied alone or together. Regenetaion percent, number of regeneration, vitrification and rooting evaluated. The results showed that the highest percentage and number of regeneration obtained in the medium included 2/5 mg/l BAP concentration and 0 mg/l IAA, respectively. Vitrification was increased with increasing BAP concentration, maximum rooting was observed in the medium containing 0/5 mg/l IAA.

Key words: Basil, Nodal, Regeneration, Vitrification, In vitro.

[*] Corresponding Author: Asghari F. Tel: 09143207854 Email: asghari.farhad@yahoo.com