مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJRFPBGR.2022.359072.1423
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۳۲۳-۳۰۶ (۱۴۰۱) شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1401.30.2.10.6

تعیین بهترین ترکیب ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر کالوس‌زایی، اندام‌زایی غیرمستقیم، پرآوری و ریشه‌زایی اسطوخودوس (*Lavandula officinalis* L.)

فرخنده عباس‌زاده[۱]، محمدحسین دانشور[۲]، محمدرضا صالحی سلمی[۳*] و امین لطفی جلال آبادی[۴]

۱ـ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۳*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

پست‌الکترونیک: salehi@asnrukh.ac.ir

۴- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۹

چکیده

اسطوخودوس (*Lavandula officinalis* L.) یکی از گیاهان مرتعی در سراسر جهان است که به‌عنوان گیاه دارویی- زینتی نیز پرورش می‌یابد. تکنیک‌های کشت بافت گیاهی روش جایگزینی برای تولید انبوه گیاهان اسطوخودوس می‌باشد و می‌تواند بر مشکلات ناشی از تکثیر زایشی غلبه نماید. به‌منظور تأثیر ترکیب‌ها و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی و همچنین تأثیر نوع ریز نمونه بر فرآیندهای کالوس‌زایی، اندام‌زایی و ریشه‌زایی اسطوخودوس، پژوهشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. در این پژوهش در مراحل مختلف پاسخ‌های متفاوتی نسبت به ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشدی مشاهده شد. ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین تیمار جهت کالوس‌زایی بود. در اندام‌زایی غیرمستقیم، بیشترین تعداد شاخه و درصد اندام‌زایی به‌دست‌آمده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN حاصل شد. همچنین بیشترین تعداد شاخه از تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد. یافته‌ها نشان داد بهترین محیط کشت ریشه‌زایی محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. بیش‌ترین درصد زنده‌مانی در کشت گلدان مربوط به بستر کشت پرلیت توأم با کوکوپیت بود. به‌طورکلی نتایج به‌دست‌آمده یک سیستم کارآمد باززایی کامل برای این گیاه معرفی کرد که می‌تواند در تکثیر سریع رویشی، نگهداری ژرم‌پلاسم، و برنامه‌های اصلاح مولکولی از طریق مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بوته، درون شیشه‌ای، ریزازدیادی، سیتوکنین، ناهمسانی

مقدمه

اسطوخودوس (*Lavandula officinalis* L.) گیاهی چندساله، همیشه‌سبز، متعلق به خانواده Lamiaceae و بومی اروپاست که امروزه در ایران هم کشت می‌شود (Khorasaninejad *et al*., 2016). گل‌ها به‌صورت خوشه‌ای در انتهای ساقه است. گلدهی با توجه به شرایط محیطی و آب و هوایی ایران، از اواخر بهار در مناطق گرم، تا شهریورماه در مناطق سردتر گزارش شده است (Hadipour *et al*., 2013). این گیاه علاوه بر استفاده‌های دارویی از قبیل درمان بیماری‌های پوستی، اختلالات گوارشی و درمان

رماتیسم در زیباسازی فضای سبز، عطرسازی، لوازم بهداشتی و آرایشی، صنایع غذایی، آفت‌کش‌ها و علف‌کش-های سازگار با محیط‌زیست (Tonutti & Liddle, 2010) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اسطوخودوس به دو روش جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شود. بذر اسطوخودوس دارای جوانه‌زنی پایین است (Takano, 1992). علاوه بر این، تکثیر از طریق بذر اغلب کند انجام می‌شود و گیاهان نیز به‌طور قابل توجهی در دوره‌های مختلف رشدی از نظر میزان رشد و ترکیبات اسانس، باهم متفاوت‌اند. تکثیر غیرجنسی این گیاه با استفاده از قلمه و خوابانیدن انجام می‌شود، ولی تکثیر از این طریق کند و ریشه‌زایی نیز اغلب کارآمد نیست. بنابراین برای تولید انبوه اسطوخودوس نیاز به روش سریع و ارزان است، تا جمعیت بالایی که پاسخ‌گوی نیاز بازار مصرف باشد، فراهم گردد، همچنین برای استخراج متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد (Chawla, 2009). تکثیر اسطوخودوس به روش کشت درون شیشه-ای موجب تولید تعداد زیادی گیاه بدون محدودیت فصلی می‌گردد (Zuzarte *et al*., 2010). کشت درون شیشه‌ای می‌تواند این فرصت را برای تولیدکنندگان اسطوخودوس فراهم کند تا کمیت و کیفیت اسانس را بهبود بخشند و ظرفیت اقتصادی اسطوخودوس را بالا ببرند (Dronne *et al*., 1999). یکی از روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای، اندام‌زایی غیرمستقیم است. در این روش پس از تولید کالوس از ریزنمونه، با تغییرات هورمونی محیط کشت می‌توان تولید اندام‌های مانند ریشه و ساقه نابه‌جا نمود. با وجود ایجاد گیاهان ناهمسان در این روش، مزایایی مانند استفاده در فرایند انتقال ژن، ایجاد گیاه جدید در اثر جهش، ذخیره از طریق منجمدسازی کالوس و رویان، تولید اندام مورد نظر و تولید گیاه از اندام‌های بدون مریستم، تنها روش تکثیر درون شیشه‌ای برخی از گیاهان یکساله و دوساله، استفاده از تکنیک اندام‌زایی غیرمستقیم یکی از روش‌های رایج در کشت بافت می‌باشد (Bazrafkan *et al*., 2019). در آزمایشی Wang و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BA در محیط کشت MS، پس از ۲۵ روز از گونه *L. angustifolia* Mill. کالوس‌های زرد رنگ تولید کردند. همچنین پس از ۳ بار بازکشت، کالوس‌های قرمز رنگ تولید شد. در پژوهشی دیگر گزارش شد به کار بردن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D باعث القاء و تولید کالوس‌های ترد و شکننده از ریزنمونه‌های گره در گیاه اسطوخودوس شد (Panizza & Tognoni, 1988). Zuzarte و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که طولانی‌ترین شاخه‌ها از ریزنمونه‌های گره ساقه *L. pedunculata* در محیط کشت MS حاوی BA حاصل شد. همچنین غلظت‌های بالاتر BA تعداد بیشتری شاخه جانبی تولید کرد. Dias و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی ریزازدیادی گیاه *L. viridis* پرداختند. نتایج مشخص کرد بالاترین میزان شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۲/۲ میکرومولار TDZ و ۲ میکرومولار BA به‌دست آمد. در بررسی دیگری استفاده از شیره نارگیل، شاخه‌زایی در دو گونه *L. latifolia* و *L. dentata* را بالا برد (Jordan *et al*., 1998).

با توجه به وضعیت خشک‌سالی کشور، کاشت گیاهان چندساله مقاوم به خشکی مانند اسطوخودوس در مراتع، فضاهای سبز و به‌عنوان گیاه دارویی موضوعی ضروری به نظر می‌رسد. این گیاه بسیار کم‌توقع است و در خاک‌های فقیر، آهکی و کم آب به‌خوبی رشد می‌کند. همچنین پس از مرحله گل‌دهی قادر است خشکی را برای مدت طولانی تحمل کند. از سوی دیگر در بیشتر پژوهش‌های ریزازدیادی انجام شده، اثر محیط‌های کشت مختلف و مقدارهای متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته‌اند و کمتر به اثر متقابل و توأم اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها در باززایی و پرآوری ریزنمونه‌ها توجه شده است. در این بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه اسطوخودوس بررسی شده است، تا ضمن بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای آن، بستر مناسب برای انجام سایر پژوهش‌ها مانند انتقال ژن و افزایش کمیت و کیفیت مواد

مؤثره از طریق دستورزی ژنتیکی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

تهیه، گندزدایی و کشت بذر: برای تهیه بذر اسطوخودوس، در آذرماه سال ۱۳۹۷ به شرکت پاکان بذر اصفهان سفارش داده شد. برای گندزدایی، ابتدا بذرها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس در اتاق کشت و زیر دستگاه لامینار ایرفلو به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ و بی‌درنگ ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵٪ قرار داده شدند. سپس بذرها ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر سترون شست‌وشو و آماده کشت گردیدند. بذرها در لوله‌های آزمایش (۳ عدد در هر لوله) حاوی محیط کشت MS قرار داده شدند و برای جوانه‌زنی در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند. پس از ۲۱ روز دانهال‌های مناسب برای تهیه ریزنمونه آماده شد.

محیط کشت و گندزدایی: تمامی ریزنمونه‌ها در محیط‌های پایه Murashige و Skoog (۱۹۶۲) در شیشه‌های شفاف حاوی ساکارز ۱۵ گرم در لیتر، آگار ۷/۵ گرم در لیتر با pH محلول قبل از اتوکلاو ۵/۸ کشت شدند. همچنین برای سترون کردن محیط کشت، آب مقطر و وسایل از اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱/۲ بار و مدت‌زمان ۲۰ دقیقه استفاده شد.

کالوس‌زایی: این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲ عامل نوع محیط کشت کالوس‌زایی در ۱۲ سطح (جدول ۱) و نوع ریزنمونه در دو سطح (کوتیلدون و هیپوکوتیل) با ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ ریزنمونه) انجام گردید. برای القاء و رشد کالوس‌ها، ریزنمونه‌ها در شرایط تاریکی قرار داده شدند. برای فراهم کردن شرایط تاریکی، از پلاستیک‌های غیرقابل نفوذ به نور استفاده شد. شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. پس از ۴ هفته کالوس‌های تولیدشده توزین و برای اندام‌زایی، کالوس‌ها در محیط کشت جدید قرار داده شدند.

اندام‌زایی غیرمستقیم: کالوس به‌دست‌آمده از بهترین محیط کشت کالوس‌زایی، برای انتقال به ۱۲ نوع محیط کشت مختلف اندام‌زایی (جدول ۲) انتقال داده شدند. نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفت. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ قطعه کالوس) انجام شد.

پرآوری شاخساره: به‌منظور تولید شاخه جانبی از شاخه‌های رشد کرده روی کالوس، آزمایشی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۱۳ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ ریزنمونه شاخه) انجام گردید. نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند. در این آزمایش از ۱۳ نوع محیط کشت مختلف برای پرآوری (جدول ۳) استفاده شد.

جدول ۱- تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده در محیط‌های کشت کالوس‌زایی

Table 1- Plant Growth regulators (PGR) used in callus genesis culture media.

شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR	شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR
1	0.25 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP	7	0.25 mg/l NAA + 0.25 mg/l KIN.
2	0.5 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP	8	0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l KIN.
3	1.0 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP	9	1.0 mg/l NAA + 0.25 mg/l KIN.
4	0.25 mg/l IBA + 0.25 mg/l BAP	10	0.25 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN.
5	0.5 mg/l IBA + 0.25 mg/l BAP	11	0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN.
6	1.0 mg/l IBA + 0.25 mg/l BAP	12	1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN.

جدول ۲- تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده در محیط‌های کشت اندام‌زایی غیرمستقیم

Table 2- Plant Growth regulators (PGR) used in indirect organogenesis culture media.

شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR	شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR
1	Control	7	1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA
2	0.25 mg/l TDZ + 0.025 mg/l IBA	8	1.5 mg/l BAP + 0.15 mg/l NAA
3	0.5 mg/l TDZ + 0.05 mg/l IBA	9	2.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA
4	0.75 mg/l TDZ + 0.075 mg/l IBA	10	1.0 mg/l KIN.
5	1.0 mg/l + TDZ + 0.1 mg/l IBA	11	1.5 mg/l KIN.
6	0.5 mg/l BAP + 0.05 mg/l NAA	12	2.0 mg/l KIN.

جدول ۳- تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده در محیط‌های کشت پرآوری شاخساره

Table 3- Plant Growth regulators (PGR) used in shoot proliferation culture media.

شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR	شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR
1	Control	8	0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA
2	0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA	9	0.75 mg/l TDZ + 0.15 mg/l IBA
3	1.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l IBA	10	1.0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l IBA
4	1.5 mg/l BAP + 0.3 mg/l IBA	11	0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l KIN.
5	0.5 mg/1 KIN. + 0.1 mg/l IBA	12	0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l KIN. + 0.1 mg/l TDZ
6	1.0 mg/l KIN. + 0.2 mg/l IBA	13	0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l KIN. + 0.1 mg/l IBA
7	1.5 mg/l KIN. + 0.3 mg/l IBA	-	-

ریشه‌زایی: شاخساره‌های تولیدشده از بهترین محیط کشت پرآوری، برای ریشه‌زایی استفاده شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۸ نوع محیط کشت و هر تیمار شامل ۳ تکرار (هر تکرار ۱۰ شاخساره) انجام گردید. همچنین برای ریشه‌زایی بهتر به تمامی محیط‌های کشت زغال فعال افزوده شد. همه نمونه‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند و پس از ۴ هفته ریشه‌زایی آنها بررسی شد.

سازگاری: در این بخش گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از شیشه‌ها خارج و محیط کشت چسبیده به ریشه‌ها با احتیاط و با آب مقطر سترون شستشو داده شد. سپس گیاهچه‌ها در گلدان شامل ۳ نوع بستر: پرلایت، پرلایت و کوکوپیت (به نسبت برابر) و کوکوپیت کشت و با آب مقطر سترون آبیاری شدند و درون کیسه‌های پلاستیکی که درب آنها با سیم‌های مخصوص بسته‌شده بود، قرار گرفته و به گلخانه منتقل گردیدند. به‌تدریج گره پلاستیک‌ها بازتر گردید و پس از ۱۰ روز گره‌ها به‌طور کامل باز شد و گلدان‌ها با محلول هوگلند رقیق شده (به نسبت ۱۰) آبیاری شدند. پس از ۴ هفته شاخص‌های طول شاخساره و طول ریشه اندازه‌گیری گردید. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار بستر کشت و ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۵ گیاهچه) انجام شد.

جدول ۴- تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد استفاده در محیط‌های کشت ریشه‌زایی

Table 4- Plant Growth regulators (PGR) used in Root genesis culture media.

شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR	شماره محیط کشت Culture medium No.	نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kind and concentration of PGR
1	Control	5	1.0 mg/l IBA
2	0.5 mg/l NAA	6	0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l IBA
3	1.0 mg/l NAA	7	0.25 mg/l NAA + 07.5 mg/l IBA
4	0.5 mg/l IBA	8	0.75 mg/l NAA + 0.25 mg/l IBA

واکاوی داده‌ها: تجزیه‌وتحلیل آماری آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.3 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ انجام شد.

نتایج

کالوس‌زایی: اثر نوع ریزنمونه، تیمارهای تنظیم‌کننده رشد و برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد بر شاخص‌های القاء کالوس در سطح احتمال خطای ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۵). در ارتباط با شاخص وزن کالوس، مشخص شد که تیمارهای تنظیم‌کننده رشد و برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد در سطح احتمال ۱٪ و اثر نوع ریزنمونه در سطح احتمال ۵٪ بر این ویژگی تأثیر معنی‌دار داشت.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده رشد، نوع ریزنمونه و برهم‌کنش آنها بر القاء و وزن کالوس

Table 5 – ANOVA effect of culture medium, explant and their interaction on callus genesis and weight.

منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	MS	
		کالوس‌زایی Callusgenesiss	وزن کالوس Callus weight
محیط کشت Culture medium (A)	11	4723.71 **	1.11 **
ریزنمونه Explant (B)	1	620.51 **	0.04 *
A*B	11	656.62 **	0.13 **
خطا Error	48	38.46	0.007
ضریب تغییرات (%) CV	-	7.99	16.92

** و *: به‌ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪

** and *: significant at 1 and 5 % probability level

نتایج اثر برهم‌کنش نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد بر وزن کالوس پس از ۴ هفته نشان داد تیمار ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت شامل ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (محیط کشت ۲) با میانگین وزن ۱/۷۶ گرم بهترین تیمار برای کالوس‌زایی بود (شکل ۴) که از لحاظ آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. کمترین وزن کالوس با میانگین وزن ۰/۰۵ گرم در ریزنمونه هیپوکوتیل و محیط کشت شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (محیط کشت ۳) مشاهده شد (جدول ۶).

جدول ۶- برهم‌کنش محیط‌های کشت مختلف تولید کالوس و نوع ریزنمونه بر وزن و درصد کالوس‌زایی

Table 6- Interaction of different culture media and type of explants on weight and percentage of callus genesis.

شماره	محیط کشت	Callus weight (gr) وزن کالوس		Callus genesis (%) کالوس‌زایی	
No.	Culture medium	کوتیلدون	هیپوکوتیل	کوتیلدون	هیپوکوتیل
		Cotyledon	Hypocotyl	Cotyledon	Hypocotyl
1	0.25 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP	1.40 b	1.52 b	100 a	100 a
2	0.5 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP	1.76 a	0.85 c	100 a	100 a
3	1.0 mg/l 2,4-D + 0.25 mg/l BAP	0.4 ghi	0.05 m	76.66 cde	26.66 g
4	0.25 mg/l IBA + 0.25 mg/l BAP	0.77 dc	0.65 def	100 a	83.33 bcd
5	0.5 mg/l IBA + 0.25 mg/l BAP	0.26 i-l	0.43 gh	100 a	100 a
6	1.0 mg/l IBA + 0.25 mg/l BAP	0.15 lm	0.24 jkl	83.33 cd	46.66 f
7	0.25 mg/l NAA + 0.25 mg/l KIN	0.21 jkl	0.29 h-l	53.33 f	86.66 bc
8	0.5 mg/l NAA + 0.25 mg/l KIN	0.34 hij	0.34 hij	90 ab	86.66 bc
9	1.0 mg/l NAA + 0.25 mg/l KIN	0.5 fg	0.74 cde	83.33 cd	100 a
10	0.25 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	0.19 klm	0.3 h-k	83.33 cd	73.33 de
11	0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	0.50 fg	0.53 fg	100 a	100 a
12	1.0 mg/l NAA + 0.5 mg/l KIN	0.63 ef	0.58 f	76.66 cde	70.0 e
	Mean	0.55 A	0.50 B	80.51 A	74.78 B

در هر صفت عددهایی با حروف مشابه، بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

In each characteristics, numbers with similar letters have no significant difference at the 5% probability level based on the Duncan test.

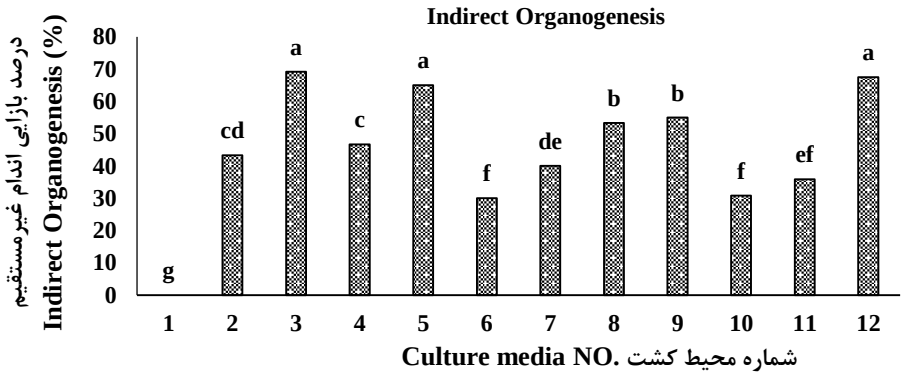
اندام‌زایی غیرمستقیم: اثرهای محیط کشت اندام‌زایی برای شاخص‌های درصد باززایی، تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ۷). نتایج اثر محیط‌های کشت مختلف اندام‌زایی بر درصد باززایی نشان داد که بیشترین درصد باززایی با میانگین ۶۹/۱۶٪ در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۳) مشاهده شد (شکل ۴)، باوجوداین از لحاظ آماری با تیمارهای محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۵) و محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN (محیط کشت ۱۲) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین کمترین درصد باززایی (بدون باززایی) مربوط به کالوس‌های رشد کرده در محیط کشت شماره ۱ (بدون استفاده از تنظیم‌کننده رشد) بود (شکل ۱-الف). نتایج اثر محیط‌های کشت مختلف اندام‌زایی بر تعداد شاخساره نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره با میانگین ۹۱ عدد در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (محیط کشت ۹) مشاهده شد که با تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN (محیط کشت ۱۲) در سطح احتمال خطای ۵٪ اختلاف معنی‌دار نداشت. کمترین تعداد شاخساره با میانگین صفر مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۱-ب). همچنین یافته‌های به‌دست‌آمده از طول شاخه نشان داد که بلندترین طول شاخه مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۳) با میانگین ۰/۸۴ سانتی‌متر بود و کمترین طول شاخه با میانگین صفر عدد مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۱-ج).

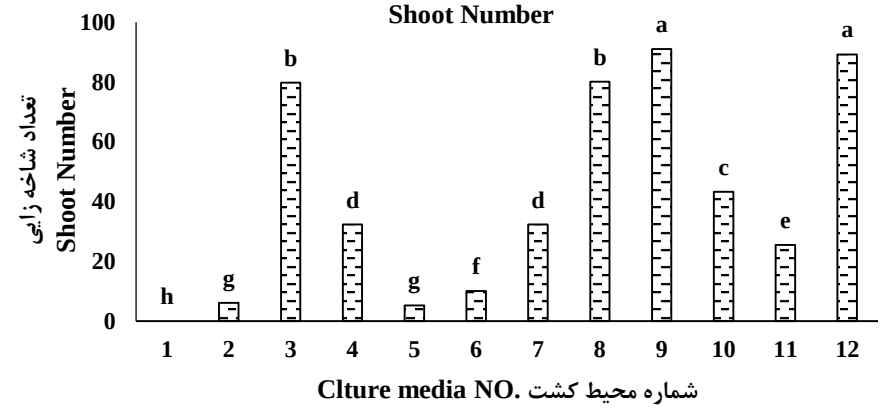
جدول ۷- تجزیه واریانس اثر محیط کشت اندام‌زایی غیرمستقیم بر شاخص‌های درصد باززایی، تعداد شاخساره و طول شاخساره Table 7 – ANOVA effect of culture medium on proliferation, number and length of shoot in indirect organogenesis.

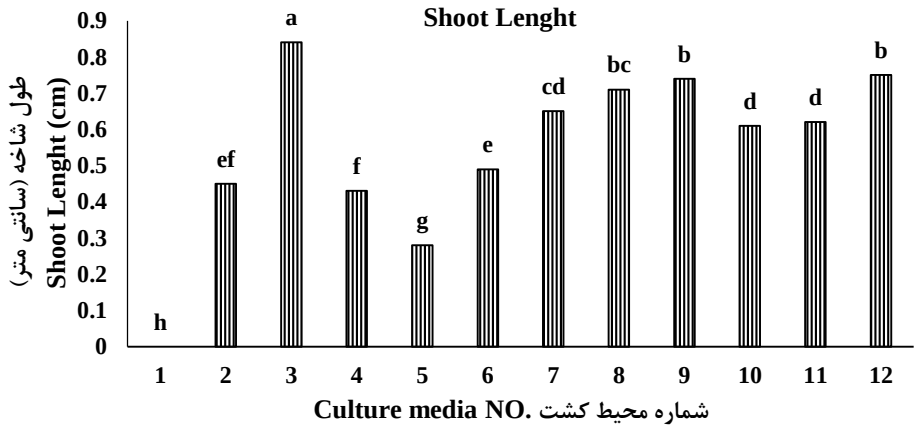
منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	MS		
		Proliferation باززایی	Shoot NO. تعداد شاخه	Shoot length طول شاخه
Culture medium محیط کشت	11	4808.08**	14855.17**	1.54**
Erorr خطا	24	52.08	6.4	0.005
CV (%) ضریب تغییرات	-	16.14	6.25	9.14

** : significant at 1 and probability level

**: تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪







شکل ۱- اثر محیط‌های کشت مختلف (ارائه شده در جدول ۲) بر اندام‌زایی غیرمستقیم اسطوخودوس

Figure 1- Effect of different culture media (Table 2) on indirect organogenesis of Lavender.

در هر نمودار، ستون‌های با حروف مشابه، بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

In each chart, columns with similar letter, there is no significant difference in 5% probability, based on Duncan test.

پرآوری: یافته‌های تجزیه واریانس نشان داد، اثر نوع محیط کشت اندام‌زایی بر تعداد شاخه پرآوری شده در سطح احتمال خطای ۱٪ تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۸). بیشترین تعداد شاخه به‌دست‌آمده با میانگین ۶۱/۵ عدد از تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۱۳) مشاهده شد (شکل ۴)، به‌طوری‌که از لحاظ آماری با همه تیمارها به‌جز تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ (محیط کشت ۱۲) در سطح احتمال خطای ۵٪ تفاوت معنی‌دار داشت. کمترین تعداد شاخساره با میانگین ۰/۶۶ عدد مربوط به محیط کشت شماره ۱ (بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد) بود (شکل ۲).

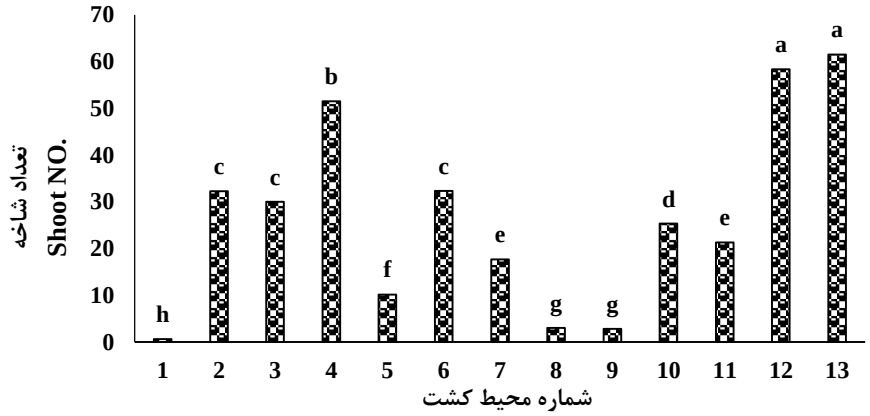
جدول ۸- تجزیه واریانس اثر انواع محیط‌های کشت اندام‌زایی بر ویژگی تعداد شاخه پرآوری شده

Table 8 – ANOVA effect of culture medium on Shoot proliferation.

منابع تغییرات Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
محیط کشت Culture medium	12	2548.83**
خطا Erorr	26	11.26
ضریب تغییرات (%) CV		12.56

** : significant at 1 and probability level

**: تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪



شکل ۲- اثر محیط‌های کشت مختلف (ارائه شده در جدول ۳) بر تعداد شاخه پرآوری شده اسطوخودوس

Figure 2- Effect of different culture media (Table 3) on shoot proliferation of Lavender.

ستون‌های با حروف مشابه، بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

Columns with similar letter, there is no significant difference in the level of 5% probability, based on Duncan test.

ریشه‌زایی: اثر محیط کشت ریشه‌زایی بر شاخص‌های درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه در سطح احتمال خطای ۱٪ تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۹). نتایج اثر محیط‌های کشت مختلف بر درصد ریشه‌زایی نشان داد که بیشترین درصد ریشه‌زایی با میانگین ۹۸/۳۳٪ در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA(محیط کشت ۳) مشاهده شد (شکل ۴)، باوجوداین از لحاظ آماری با تیمار ریشه‌زایی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۸) تفاوت معنی‌دار نداشت. کمترین درصد ریشه‌زایی (میانگین صفر) مربوط به محیط کشت ۱ (بدون تنظیم‌کننده رشد) بود (شکل ۳-الف). یافته‌های به‌دست‌آمده از میانگین داده‌های شاخص تعداد ریشه‌زایی نشان داد، بیشترین تعداد ریشه با میانگین ۲۲/۱۶ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (محیط کشت ۳) مشاهده گردید که از لحاظ آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. کمترین تعداد ریشه با میانگین صفر مربوط به محیط کشت ۱ (بدون تنظیم‌کننده رشد) بود (شکل ۳- ب).

نتایج اثر محیط‌های کشت مختلف بر طول ریشه نشان داد، بیشترین طول ریشه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۵) با میانگین ۸/۶۵ سانتی‌متر مشاهده گردید، ولی از لحاظ آماری در سطح احتمال خطای ۵٪ با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۶) و محیط کشت حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۷۵ میلی-گرم در لیتر IBA (محیط کشت ۷) تفاوت معنی‌دار نداشت. کمترین طول ریشه با میانگین صفر سانتی‌متر مربوط به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد بود (شکل ۳- ج).

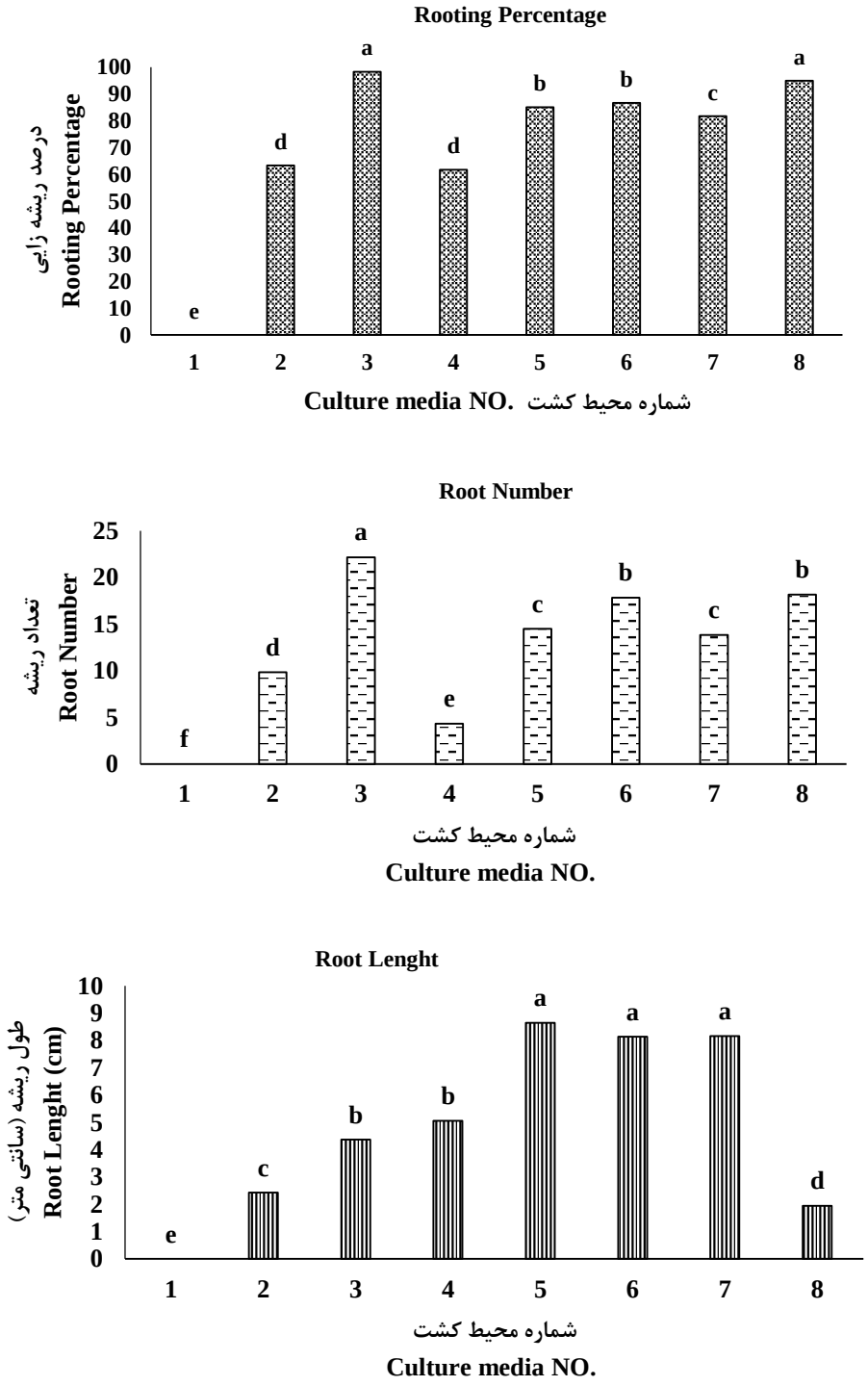
جدول ۹- تجزیه واریانس اثر محیط کشت ریشه‌زایی بر شاخص‌های درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه در ریشه‌زایی

Table 9 – ANOVA effect of culture medium on rooting percentage, number and length of root in root genesis.

منابع تغییرات	درجه آزادی	MS		
Source	df	Rooting percentage درصد ریشه‌زایی	Root NO. تعداد ریشه	Root length طول ریشه
Culture medium محیط کشت	7	6054.46**	334.09**	70.78**
Erorr خطا	16	33.33	4.93	0.24
CV (%) ضریب تغییرات	-	8.08	17.66	10.28

** and *: significant at 1 and 5 % probability level

**: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

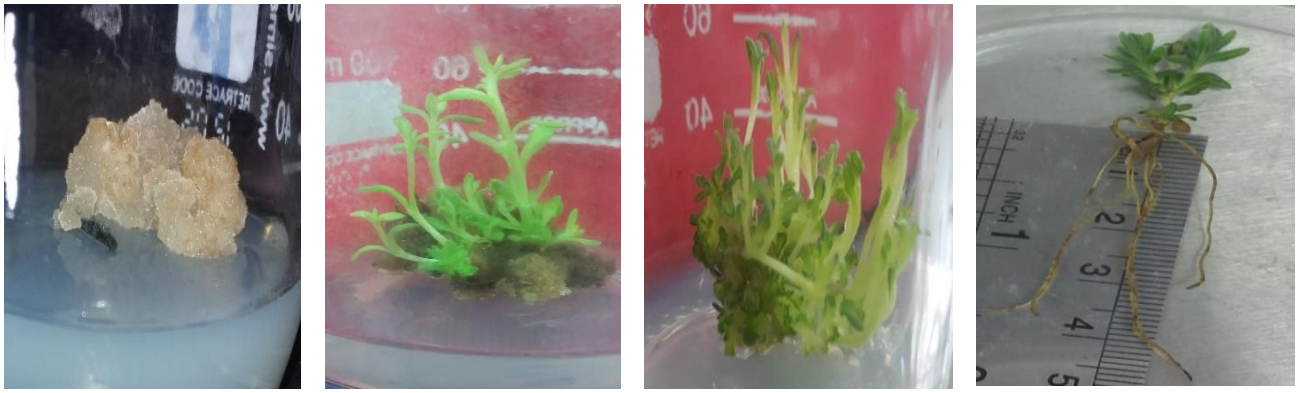


شکل ۳- اثر محیط‌های کشت مختلف (ارائه شده در جدول ۴) بر ریشه‌زایی اسطوخودوس

Figure 3- Effect of different culture media (Table 4) on rooting of Lavender.

در هر نمودار، ستون‌های با حروف مشابه، بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

In each chart, columns with similar letter, there is no significant difference in 5% probability, based on Duncan test.



شکل ۴- از چپ به راست: مرحله کالوس‌زایی، اندام‌زایی غیرمستقیم، پرآوری و ریشه‌زایی اسطوخودوس

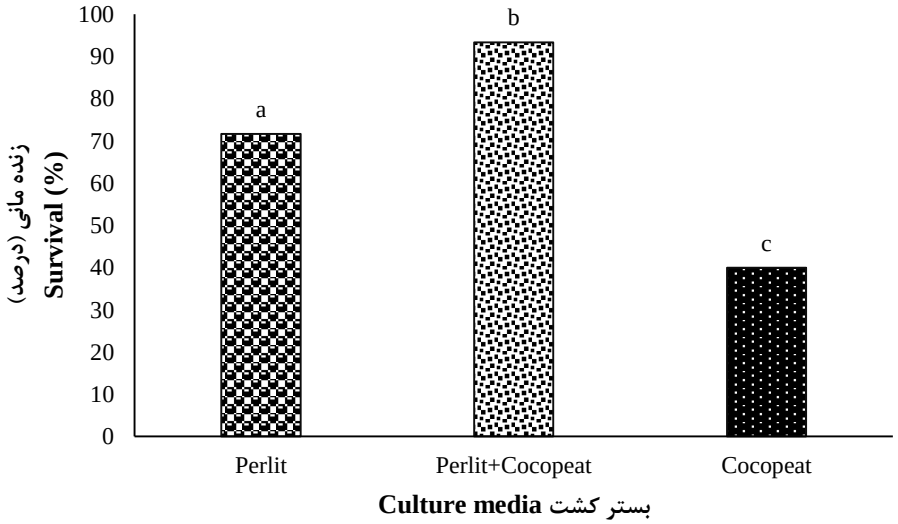
Figure 5- From left to right: Callusgenesis, Indirect Organogenesis, Proliferation and Rooting of Lavender

جدول ۱۰- تجزیه واریانس اثر بسترهای کشت مختلف بر شاخص درصد زنده‌مانی گیاهک‌های ریشه‌دار شده اسطوخودوس

Table 8 – ANOVA effect of different culture media on survival rate of rooted plantlets in Lavender.

منابع تغییرات	درجه آزادی	MS
Source	df	Survival Rate درصد زنده‌مانی
Culture medium محیط کشت	2	4316.66**
Error خطا	6	61.11
CV (%) ضریب تغییرات	-	11.44

** : significant at 1 and probability level **: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۵- اثر بسترهای کشت بر شاخص درصد زندمانی در آزمایش سازگاری

Figure 4- Effect of different culture media on survival rate of rooted plantlets in acclimatization test.

ستون‌های با حروف مشابه، بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال خطای ۵٪ تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

Columns with similar letter, there is no significant difference in the level of 5% probability, based on Duncan test.

سازگاری: اثر بسترهای کشت گلدانی بر میزان زندمانی گیاهچه‌های اسطوخودوس در سطح احتمال خطای ۱٪

معنی‌دار شد (جدول ۱۰). بیشترین درصد زنده‌مانی با میانگین ۹۳/۳۳٪ مربوط به بستر کشت پرلایت توأم با کوکوپیت (به نسبت مساوی) بود که با سایر بسترهای کشت اختلاف معنی‌دار داشت. همچنین کمترین درصد زنده‌مانی با میانگین ۴۰٪ مربوط به بستر کشت کوکوپیت بود (شکل ۵ و ۶).

شکل ۶- از چپ به راست: مرحله سازگاری و مرحله انتقال به محیط کشت اصلی

Figure 6- From left to right: Acclimatization and transfer to final root media

بحث

در قسمت کالوس‌زایی مشخص شد که نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد می‌تواند بر درصد و وزن کالوس اثر بگذارد. برای تولید کالوس وجود هورمون‌ها ضروری است، در این پژوهش دیده شد که تیمار هورمونی همزمان اکسین و سیتوکینین در کالوس‌زایی اسطوخودوس بسیار مؤثر بود. به‌طوری‌که ترکیب‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه 2,4-D یا IBA در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN بهترین ترکیب هورمونی برای کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون (۱۰۰٪) شناخته شدند. همچنین بالاترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکتیل در تیمار ترکیب‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه 2,4-D در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، ترکیب‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر KIN، ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAAو ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN یافت شد. بهینه‌سازی القای کالوس اولین گام در شرایط کشت بافت است، زیرا کالوس می‌تواند در تهیه پروتوپلاست، تولید جنین سوماتیکی، تولید اندام‌های ریشه و ساقه و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد (Hassandokht & Ebrahimi, 2006). عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ مورد استفاده، نوع ریزنمونه، شرایط محیطی، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌تواند بر القای کالوس تأثیر بگذارد (Han *et al*., 2011). در این مطالعه نتایج نشان داد که کالوس‌زایی در این گیاه علاوه بر تحت تأثیر قرار دادن تیمارهای هورمونی مختلف، تحت تأثیر ریزنمونه نیز قرار می‌گیرد. میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کاررفته و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین دارد (Abbasi *et al*., 2007). زیرا این تنظیم‌کننده‌ها باعث تنظیم رشد و تقسیم سلولی و همچنین

رشد بهتر اندام‌های گیاهی می‌شوند. از آنجا که نیاز گونه‌های گیاهی و بافت‌های مختلف به این مواد متفاوت بوده، انتخاب تنظیم‌کننده رشد مناسب و تعیین غلظت بهینه آن مهم است (Chan *et al*., 2008). Zebarjadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز کالوس‌زایی گیاه سرخارگل را در غلظت‌های مختلف NAA و BAP مورد بررسی قرار دادند. آنان بیشترین میزان تولید کالوس را در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به میزان ۹۷ درصد و در ریزنمونه هیپوکتیل در تیمار BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) به میزان ۹۱ درصد بیان کردند که با نتایج این آزمایش همخوانی دارد. همچنین بیشترین تولید کالوس در ریزنمونه کوتیلدون در ترکیب تیماری ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید و با استفاده از این تیمار هورمونی می‌توان تقریباً حجم نسبتاً زیادی کالوس را در مدت زمان کمی به دست آورد. Sayadi و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN بیشترین کالوس از ریزنمونه‌های بابونه با میانگین زمان ۱۱ روز را به خود اختصاص داد. Shinoyama و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقی روی گیاه داوودی نشان دادند که افزایش غلظت KIN و 2,4-D در حد ۱ میلی‌گرم در لیتر تولید کالوس را افزایش داده است. در گیاه *Allium chinense* نیز مشخص شد که بیشترین میزان تولید کالوس در محیط کشت همراه با هورمون‌های ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بوده و با افزایش میزان اکسین یا سیتوکینین اثرهای کاهشی دیده شد (Yan *et al*., 2009). Movafeghi و همکاران (۲۰۰۸) نیز بیشترین مقدار شاخص کالوس را در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در گیاه کهور مشاهده کردند. Motamedi و همکاران (۲۰۱۰) در آزمایش خود نشان دادند که بیشترین میزان کالوس‌زایی گیاه گلرنگ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAAو ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به میزان ۹۷ درصد بود. همچنین مقایسه ریزنمونه‌ها نشان داد که ریزنمونه کوتیلدون نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل کالوس‌زایی بیشتری داشت و میزان کالوس تولیدی نیز بالاتر بود. در پژوهش Taheri و همکاران (۲۰۲۱) مشخص شد که تفاوت‌هایی در نوع ریزنمونه برای تولید کالوس وجود دارد. آنان بیان کردند که تیمار ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین وزن ۴/۸۶ گرم برای هر ریزنمونه، بهترین تیمار در کالوس‌زایی بود.

نتایج آزمایش باززایی غیرمستقیم نشان داد که وجود هورمون سیتوکنین در تولید شاخه نابه‌جا ضروریست، به گونه‌ای که در محیط فاقد هورمون، باززایی انجام نشده است. سیتوکینین‌ها نقش بسیار مؤثری در پیشرفت و القای قسمت‌های هوایی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم دارند. برای تحریک رشد جوانه‌های جانبی و کاهش چیرگی جوانه انتهایی، معمولاً یک یا چند سیتوکینین در مرحله تکثیر در محیط استفاده می‌شود (George *et al*., 2008). براساس برخی گزارش‌ها TDZ به‌عنوان مؤثرترین سیتوکینین مورد استفاده در شاخه‌زایی بسیاری از گیاهان معرفی شده است. اثرهای محرک TDZ برای القاء و تشکیل قسمت‌های هوایی برای گیاهانی مانند همیشه‌بهار نیز گزارش شده است (Taheri *et al*., 2021). در این پژوهش نیز با اضافه کردن هورمون TDZ به محیط MS، باززایی غیرمستقیم در کالوس اتفاق افتاد، اما بیشترین باززایی غیرمستقیم با کاربرد همزمان TDZ با ترکیب اکسینی IBA انجام شد. George و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند در باززایی نسبت سیتوکینین به اکسین نقش مهمی ایفا می‌کند و نسبت پایین اکسین به سیتوکینین را برای شاخه‌زایی لازم دانستند، که مطابقت آن با نتایج این تحقیق آشکار است. در این تحقیق بیشترین باززایی غیرمستقیم در محیط ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP دیده شد. Reichling و Beiderbeck (۲۰۰۹) بیشترین باززایی غیرمستقیم گیاه بابونه را در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN مشاهده کردند. Kazem (۲۰۱۲) در آزمایش خود نشان داد که ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP

بیشترین درصد باززایی غیرمستقیم (۶۵ ٪) را در گیاه باباآدم دارد، باوجوداین، Mohamadi (۲۰۱۰) نشان داد که سیتوکینین به تنهایی و بدون حضور اکسین روی شاخه‌زایی کالوس‌های بابونه تأثیر داشت. در پژوهش Taheri و همکاران (۲۰۲۱) بیان شد که بیشترین میانگین طول شاخساره در اندام‌زایی غیرمستقیم همیشه‌بهار مربوط به تیمار ریزنمونه کالوس برگ کشت شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین بود. افزایش تدریجی غلظت سیتوکینین‌ها (BAP و TDZ) از ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش تدریجی در تعداد شاخساره نابه‌جا گردید.

کاربرد برون‌زای بنزیل آدنین از طریق تأثیر بر سلول‌های گیاهی یا به وسیله کنترل تجمع یکسری ترکیبات سیتوکینینی تأثیر خود را بر رشد گیاه می‌گذارد. در نتیجه استفاده از سیتوکینین‌ها در محیط کشت در شرایط کشت درون شیشه‌ای به‌منظور القا و افزایش تقسیم سلولی ضروریست (Taghizade & Solgi, 2015). در باززایی شاخساره، ژنوتیپ گیاهی بر مقدار بهینه تنظیم‌کننده رشد گیاهی تأثیرگذار است (Asghari *et al*., 2013). وجود غلظت مناسب سیتوکینین در محیط کشت، شروع شاخه‌زایی در ریزنمونه را در شرایط کشت درون شیشه‌ای القا می‌کند (Mok *et al*., 2000). افزون بر این، تسهیل جذب و انتقال مواد غذایی از دیگر مزایای کاربرد سیتوکینین‌ها در محیط کشت است، که در پی آن سوخت‌وساز گیاهی افزایش یافته و در نهایت زیست توده گیاهچه‌های باززایی شده نیز افزایش می‌یابد (Kafi *et al*., 2006). کاهش ارتفاع شاخساره در پی افزایش تعداد آن، به دلیل توزیع مواد غذایی جذب شده بین شاخساره‌ها است (Huy & Xuan-Mai, 2014). استفاده از BA در محیط کشت، سبب کاهش اثرهای غالبیت انتهایی شده و تحریک رشد شاخه جدید را در پی دارد. علاوه بر این استفاده از این نوع سیتوکینین در محیط کشت، رشد ریشه را نیز کاهش می‌دهد (Narimani *et al*., 2017). همچنین در پژوهشی دیگر کاربرد BA در محیط کشت، مؤثرترین تنظیم کننده در پرآوری دو گونه مرزه بیان شد. در این بررسی کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بیشترین تأثیر را در افزایش پرآوری در گیاه داشت (Afzalifar, 2012).

در آزمایش ریشه‌زایی مشخص شد که هر دو هورمون NAA و IBA سبب افزایش ریشه‌زایی و طول آن شدند. باوجوداین محیط‌های کشت حاوی IBA در شرایط کشت درون شیشه‌ای برای ریشه‌زایی از سایر تنظیم‌کننده‌ها بهتر بود. Pandey و Sushma (۲۰۱۲) در گیاه *Quercus leucotrichophora* ریشه‌های زیادی با استفاده از IBA به‌دست آوردند. در این پژوهش، با وجود اینکه تیمار حاوی NAA میزان ریشه‌زایی بالایی داشت، ولی ریشه‌های ضعیفی ایجاد کرد. نتایج مشابه در پژوهش‌های Shriram و همکاران (۲۰۰۸) در گیاه *Helicteres isora* L. و Jafari و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه مریم گلی به‌دست آمد. باوجوداین، برای ریشه‌زایی گونه‌ای از بگونیا (*B. fallax*) ترکیب تنظیم‌کننده رشدی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مناسب‌تر بود (Shobi & Viswanathan, 2017). در پژوهش دیگری برای ریشه‌زایی گیاهچه‌های ژربرا اکسین‌های مختلفی بررسی و گزارش شد، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی بهتر بود (Kharrazi *et al*., 2018). Parsamanesh و همکاران (۲۰۱۸) نیز برای ریشه‌زایی گیاهچه‌های گل راعی سطوح مختلف IBA را بررسی و گزارش کردند که سطوح مختلف این تنظیم‌کننده اثری روی تعداد ریشه تولیدی نداشت، اما روی طول ریشه مؤثر بود. نتایج این پژوهش با این بررسی همسو بود.

آخرین مرحله و یکی از عوامل اصلی موفقیت در کشت بافت، تولید گیاهچه‌هایی با ریشه مناسب و سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار به شرایط برون شیشه‌ای است. شاخساره‌های پرورش یافته در شرایط درون شیشه‌ای به‌علت تابش کم و تبادل محدود گاز، فعالیت‌های فتوسنتزی پایینی دارند. این موضوع ممکن است منجر به رشد کند و نرخ بقای کم پس از سازگاری با شرایط محیط بیرون شود. داشتن سیستم ریشه قوی اجازه می‌دهد تا گیاهان سازگاری آسان‌تر و سریعتری به شرایط برون شیشه‌ای داشته باشند

(Mousavi *et al*., 2017). سازگاری گیاهچه‌ها تحت تأثیر مستقیم شرایط مرحله ریشه‌دهی بوده و قرار گرفتن طولانی‌مدت گیاهچه‌ها در محیط ریشه‌زایی موجب قهوه‌ای شدن و طویل شدن بیش از حد ریشه‌ها شده و انتقال گیاهچه‌ها را با مشکل مواجه می‌کرد. Bazrafkan و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند برای سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی نخود شیرین، ابتدا گیاهان را از لوله‌آزمایش خارج کرده و ریشه آنها را با آب شست‌وشو داده، تا آگار از روی ریشه پاک شود. سپس گیاهان را در گلدان‌های حاوی پرلایت و خاک (۱:۱) و کمپوست کاشتند و در محیط گلخانه‌ای نگهداری کردند تا کم‌کم با شرایط طبیعی سازگار شود. پس از گذشت ۱۰ روز، زمان سازگاری به‌طور کامل طی شد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که کوتیلدون و هیپوکوتیلدون هر دو ریزنمونه مناسب برای تولید کالوس است. برای القای مؤثر کالوس لازم است از تیمار همزمان اکسین و سیتوکینین استفاده شود. همچنین وجود هورمون سیتوکنین به‌همراه اکسین برای القاء و تشکیل قسمت‌های هوایی مؤثرتر بود، به‌طوری‌که بیشترین درصد باززایی در تیمار حاوی TDZ و IBA بود. نتایج ریشه‌زایی نشان داد هورمون اکسین به‌ویژه IBA در شرایط کشت درون شیشه‌ای برای ریشه‌زایی اسطوخودوس مناسب‌تر از سایر تنظیم‌کننده-ها بود. با توجه به ویژگی نفوذپذیری پرلایت و ویژگی جذب آب و تأمین مواد غذایی محیط کشت کوکوپیت، مشخص شد که تیمار پرلایت توأم با کوکوپیت بهترین ترکیب محیط رشد ریشه اسطوخودوس بود.

به‌طورکلی نتایج به‌دست‌آمده، علاوه بر دادن اطلاعات مناسب در مورد تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی و نوع ریزنمونه روی ظرفیت کالوس‌زایی و اندام‌زایی از گیاه اسطوخودوس، یک سیستم کارآمد باززایی کامل برای این گیاه معرفی می-کند که می‌تواند در تکثیر سریع رویشی، نگهداری ژرم‌پلاسم و برنامه‌های اصلاح مولکولی از طریق مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شده است، بنابراین از همکاری این ارگان برای پیشبرد اهداف این پژوهش سپاسگزاری می‌شود. همچنین از همکاران گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بدلیل حمایت‌های علمی و معنوی قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده:

– Abbasi, B., Saxena, P. K., Murch, S. J. and Liu, C. Z., 2007. Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. *In Vitro* Cellular and Development Biology- Plant, 43: 481-492.
– Afzalifar, M., 2012. Evaluation of different propagation and androgenesis in *Satureja khuzistanica* and *S. rechingeri*. M.Sc. thesis. Medicinal Plants and Drug Research Institute. Shahid Beheshti University, Iran. 46-73. (In Persian).
– Asghari, F., Hasani, A., Hosseini, B. and Farokhi, J., 2013. Effect of different hormonal combination on *in vitro* direct shoot regeneration of basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Horticultural Science 26(4): 434-439. (In Persian).
– Bazrafkan, M., Daneshvar, M. H. and Salehi Salmi, M. R., 2019. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Pant Breeding and Genetics Research, 27: 98-107. (In Persian).
– Chan, L. K., Koay, S. S., Low, P. H. and Boey, P. L., 2008. Effect of plant growth regulators and subculture frequency on callus culture and the establishment of *Melastomamala bathricum* cell suspension cultures for the production of pigments. Biotechnology, 7 (4): 678-685.
– Chawla, H. S., 2009. Introduction to plant biotechnology. 3rd ed. Enfield: Science Publishers 710p.
– Dias, M. C., Almeida, R. and Romano, A., 2002. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Her through *in vitro* axillary shoot proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68: 99-102.
– Dronne, S., Colson, M., Moja, S. and Faure, O., 1999. Plant regeneration and transient GUS expression in a

Hadian, J. and Atashi, S., 2016. The effect of drought stress on the growth, essential oil yield and chemical composition of Lavender. Journal of Crops Improvement, 17: 979-988. (In Persian).
– Mohamadi, Z., 2010. Study of callus, regeneration and suspension cultures of different genotypes of chamomile (*Matricaria chamomilla*). Master's Thesis in Plant Breeding, Agronomy and Plant Breeding Dept, Faculty of Agriculture, Ilam University. (In Persian).
– Mok, M. C., Martin, R. C. and Mok, D. W. C., 2000. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology, 36: 102-107.
– Motamedi, J., Zebarjadi, A. R., Kahrizi, D., Salmanian, A. H. and Soheilikhah, Z. H., 2010. Study of callus induction and shoot regeneration of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.,) using hypocotyl and cotyledon explants culture, Journal of Agricultural Biotechnology, 1: 99-111.
– Movafeghi, A., Habibi, G. H. and Aliasgarpoor, M., 2008. Plant regeneration of *Capparis spinosa* L. using hypocotyl explant, Iranian Journal of Plant Biology, 21 (2): 289-297. (In Persian).
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
– Narimani, R., moghadam, M. and Mojarab, S., 2017. Evaluation of the micropropagation of hairless catmint (*Nepeta nuda* L.), an endangered medicinal plant. Journal of Cell & Tissue, 7(4): 387-397.
– Parsamanesh, Z., Bayat, F. and Hedaya, M., 2018. Optimizing *in vitro* regeneration of Hypericum (*Hypericum erforatum* L.). Plant Productions, 40: 103-115. (In Persian).
– Pandey, A. and Sushma, T., 2012. Influence of kinetin on in vitro rooting and survival of banj oak (*Quercus leucotrichophora* L.). African Journal of Biotechnology, 62: 12538-12545.
– Reichling, J. and Beiderbeck, R., 2009. *Chamomilla recutita* L., Rauschert (Camomile): *In vitro* culture and the production of secondary metabolites, Medicinal and Aromatic Plants III. Springer, Berlin Heidelberg New York, Pp: 156-175.
– Sayadi, V., Mehrabi, A. A., Saidi, M. and Nourollahi, K. H., 2014. In vitro culture and callus induction of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) explants under different concentrations of plant growth regulators, International Journal of Biosciences, 4 (10): 206-211.
– Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T., 2004. A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration range of lavender (*Lavandula intermedia* Emeric ex Loiseleur) cultivars. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 55: 193-198.
– George, E. F., Hall, M. A. and. Klerk, G. J. D., 2008. Plant propagation by tissue culture, Volume 1. The Background. Springer, 502 p.
– Hadipour, A., Hoseini Mazinani, M. and Mehrafarin, A., 2013. Changes in essential oil content/composition and shoot aerial yield of lavender (*Lavandula officinalis* L.) affected by different treatments of nitrogen. Journal of Medicinal Plants, 12: 156-169. (In Persian).
– Panizza, M. and Tognoni, F., 1988. Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavender. Scientia horticulturae, 37: 157-163.
– Han, Y., Jin, X., Wu, F. and Zhang, G., 2011. Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.), Journal of Zhejiang University Science, 12 (5), PP: 399-407.
– Hassandokht, M. R. and Ebrahimi, R., 2006. Principles of plant tissue culture. Marz Danesh, 328 p.
– Huy, N. and Xuan-Mai, T., 2014. Investigation of effective *in vitro* propagation media for *Stevia rebaudiana* Bertoni. Asia-Pacific Journal Science Technology, 19: 172-180.
– Jafari, S., Daneshvar, M. H., Salehi Salmi, M. R. and Lotfi, A., 2017. Influence of putrescine and thidiazuron on *in vitro* organogenesis in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Pant Breeding and Genetics Research, 25: 201-211. (In Persian).
– Jordan, A. M., Calvo, M. C. and Segura, J., 1998. Micropropagation of adult *Lavandula dentata* plants. Journal of Horticulture Science and Biotechnology, 73:93-96.
– Kafi, M., Zand, A., Kamkar, B., Sharifi, H. and Goldani, M., 2006. Plant Physiology (Taiz and Zeiger). University Jihad Publications. Sixth edition. Vol 2. 379 Pp. (In Persian).
– Kazem, S., 2012. Optimization of tissue culture and gene transformation in (*Arctium lappa*), Biotechnology, Master of Science Thesis, Dept., of Agronomy and Plant Breeding, Razi University, Kermanshah. Iran. (In Persian).
– Kharrazi, M., Sharifi, A., Keykha Akhar, F., Bagheri, A. and Moradian, M., 2018. Effect of hormonal compositions on micropropagation of fifteen cultivars of gerbera (*Gerbera Jamesonii* bolus ex hooker f.). Plant Productions, 40: 91-102. (In Persian).
– Khorasaninejad, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S.S.,

from leaves of Chrysanthemum (*dendranthema ×grandiflorum* (Ramat.) Kitamura), Journal Plant Biotechnology, 21 (1): 25-33.
– Shobi, T. M. and Viswanathan, M. B. G., 2017. Micropropagation of an important medicinal plant, *Begonia fallax* (Begoniaceae). International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology, 12: 94-99.
– Shriram, V., Kumar, V. and Shitole, M.G., 2008. Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 44: 186-193.
– Taghizade, M. and Solgi, M., 2015. Introduction of commercial protocol for *in vitro* proliferation of *Brassica oleracea* var. acephala. Iranian Journal of Horticaltural Sciences 45(4): 475-484. (In Persian).
– Takano, T., 1992. Germination characteristics of herbs in Labiatae. In WOCMAP I-Medicinal and Aromatic Plants Conference, 275-286.
– Tonutti, I. and Liddle, P., 2010. Aromatic plants in alcoholic beverages. Flavour and Fragrance Journal, 25: 341-350.
– Wang, X., Jin, L., Li, M., Zhao, M. and Zhao, H., 2007. Bioreactor culture and plant regeneration from cell clusters of the aromatic plant, *Lavandula angustifolia* 'Munstead'. Journal Horticultural Science Biotechnology, 82: 781-785.
– Yan, M. M., Xu, C., Kim, C. H. and Um, Y. C., 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chines jiaotou (*Allium chinense*), Scientia Horticulturae, 123: 124-128.
– Zebarjadi, A. R., Motamedi, M. J., Taravat, E. and Ismaili, A., 2013. Micropropagation of medicinal purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) using cotyledon and hypocotyl segments, Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology), 3(26): 311-319.
– Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro L. R. and Canhoto, J. M., 2010. Trichomes essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). Industrial Crops and products, 32: 580-587.

Determining the best combination of explant and plant growth regulators on callogenesis, indirect organogenesis, proliferation, and rooting of *Lavandula officinalis* L.

F. Abbaszadeh[1], M. H. Daneshvar[2], M. Salehi Salmi[3], A. Lotfi Jalal Abadi [4]

[1]M.Sc. Graduated, Dept. Horticultural Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, I.R. Iran.

[2] Prof. Dept. Horticultural Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, I.R. Iran.

[3*] Corresponding Author, Assoc. Prof. Dept. Horticultural Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, I.R. Iran. Email: salehi@asnrukh.ac.ir

[4] Assist. Prof. Dept. Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, I.R. Iran.

Received: 18.06.2022 Accepted: 30.11.2022

Abstract

Lavender (*Lavandula officinalis* L.) is one of the rangeland species in the many parts of the world, which is cultivated as a medicinal and ornamental plant. Plant tissue culture techniques are an alternative method for the mass production of lavender colons and can overcome the problems caused by reproductive propagation. To determine the effect of different combinations and concentrations of growth regulators, and also explant type in the process of callogenesis, organogenesis, and rooting of lavender, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications. In this research, different responses to growth regulatory compounds were assessed at different stages. The best treatment for callogenesis was cotyledon explants in culture medium containing 0.5 mg/l 2.4-D along with 0.25 mg/l BAP. In indirect organogenesis, the highest number of branches and the rate of organogenesis were obtained in the medium containing 2 mg/l of KIN. Also, the highest number of branches was obtained from using 0.5 mg/l BAP treatment with 0.5 mg/l of KIN along with 0.1 mg/l IBA. The results showed that the best culture medium for rooting was the medium containing 1 mg/l IBA. The highest explants survival rate was related to using perlite and coco peat as a bed of cultivation. The finding of this research introduced an efficient regeneration system for this plant that can be used in rapid vegetative propagation, germplasm maintenance, and molecular modification programs through genetic engineering.

Keywords: Subshrub, *in vitro*, micropropagation, cytokinin, heterogeneity