فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا (س)
دوره ۳۶، شماره ۲، پیاپی ۷۶، تابستان ۱۴۰۲، ص ۱۲۵-۱۱۳
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۵
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

The Quarterly Scientific Journal Of Applied Biology
Vol.36, No.2, Sering. 76, Summer 2024, p. 119-131.
Article type: Research Paper

https://doi.org/10.22051/jab.2023.41521.1507

نقش تنظیم کننده‌های رشد در بهینه‌سازی تشکیل کالوس در گیاه دارویی ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)

مهدی کاکایی*[۱]، فاطمه حاج مرادی[۲]، محسن منصوری[۳]، محمدعلی ابراهیمی[۴]

چکیده

مقدمه و هدف: *امروزه تکنیک‌های کشت بافت گیاهی به عنوان ابزاری ارزشمند جهت ایجاد تنوع‌ژنتیکی با هدف به‌نژادی گیاهان و همچنین تولید گیاهان عاری از ویروس کاربرد دارند. هدف از این تحقیق ارائه یک روش مؤثر بر کالوس‌زایی در گیاه ریحان بنفش است؛ لذا در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط کشت بافت گیاه ریحان بنفش به منظور تولید کالوس، شناسایی درصد القای کالوس، نرخ رشد، سرعت رشد و محتوای آب نسبی کالوس از طریق کشت بافت انجام شد.* ***مواد و روش‌ها:*** *آزمایش بهینه‌سازی القای کالوس بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار عامل، ریز نمونه و سه سطح هورمون‌های بنزیل آدنین (BA)، اندول استیک اسید (IAA) و اندول بوتیریک اسید IBA اجرا گردید.* ***یافته‌ها:*** *نتایج نشان داد بالاترین درصد القای کالوس (۸۸ درصد) مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بود. اثر ترکیبات هورمونی بر چهار ویژگی مورد بررسی شامل، درصد کال‌زایی، سرعت رشد، محتوای آب نسبی و نرخ رشد (وزن خشک)، معنی‌دار بوده است که می‌توان در جهت انتخاب بهترین ترکیب در کالوس‌زائی و بهینه‌سازی کشت بافت و نهایتاً اهداف آتی به‌نژادی از آن استفاده نمود. همچنین اثر متقابل دو فاکتور ریزنمونه و ترکیبات هورمونی تنها بر شاخص نرخ رشد اثر معنی‌داری ($P\leq 1\%$) داشته است.* ***نتیجه‌گیری:*** *کیفیت کالوس‌های القا شده نشان‌دهنده انتخاب صحیح ریزنمونه و ترکیبات هورمونی مناسب است. بنابراین بین تولید کالوس و تنظیم کننده‌های رشد ارتباط مستقیم وجود دارد و با توجه به نوع گیاه مورد مطالعه و مقدار هورمون موجود در آن میزان استفاده از تنظیم کننده‌های رشد در القای کالوس متفاوت خواهد بود.*

واژه های کلیدی: کالوس‌زائی، ریز نمونه، فیتوهورمون‌ها، کشت بافت.

۱. دانشیار گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران. (*نویسنده مسئول: M.Kakaei@pnu.ac.ir)
۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران.
۳. کارشناس ارشد، گروه طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.
۴. استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران.

مقدمه

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)، گیاهی علفی، یکساله و متعلق به تیره نعناعیان (*Lamiaceae*) و جنس *Ocimum* شامل ۳۰ گونه است و منشأ آن کشورهای ایران، هند و افغانستان گزارش شده است (Gohari *et al*., 2018). از ریحان به صورت گیاه ادویه‌ای، دارویی و سبزی تازه استفاده می‌شود. اسانس این گیاه به طور ویژه شامل فنیل پروپانوئیدها است که در درمان بیماری‌هایی چون سردرد، اسهال، سرفه، زگیل، کرم روده و نارسایی‌های کلیوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مهم‌ترین ترکیبات فنیل پروپانوئیدی آن شامل اوژنول، چاویکول، متیل اوژنول، متیل چاویکول، مرسیتین، فنیل سینامات و المیسین است (Azizi & Abdollahi Mandoulakani., 2019). گیاهان دارویی به عنوان منبع مهمی جهت تولید دارو، نقش مهمی در سلامت انسان‌ها دارند و بسیاری از مواد دارویی با اهمیت جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند (Constabel, 1990). گیاهان دارویی از جمله ارزشمندترین منابع جهت درمان بیماری‌ها بوده و هستند و حتی در گذشته هم مورد توجه بوده‌اند. در ایران و سایر کشورهای جهان، گیاهان دارویی، در طب سنتی نقش خاصی داشته‌اند و بر اساس شواهد تاریخی، ایران در این زمینه پیشتاز بوده است و از جمله کشورهای مطرح به شمار می‌آید (Khanfar *et al*., 2003).

گیاه ریحان دگرگشن بوده و در اثر تکثیر بوسیله بذر تنوع زیادی در آن ایجاد شده است بنابراین برای مصارف صنعتی به گیاهان همگن نیاز است. لذا تکنیک کشت بافت بعنوان روشی مطلوب به منظور تولید گیاهان یکنواخت قابل استفاده است (Sadeghian tehrani *et al*., 2010). از این جهت استفاده از روش‌های نوین کشت درون شیشه‌ای ضرورتی اجتناب ناپذیر است (Ziaei *et al*. 2014). یکی دیگر از کارکردهای کشت بافت و متعاقب آن کشت سلول تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد گاهی اوقات تولید مصنوعی این مواد دشوار بوده و یا از لحاظ اقتصادی مطلوب نیست، در این شرایط استفاده از کشت بافت و کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مفید است (Haghighat Hour *et al*., 2011; Kahrizi *et al*., 2022; Peyvandi *et al*. 2009; Ravishankar & Venkataraman 1998; Zarei *et al*., 2020).

در مطالعه‌ای Zinhari و همکاران (2016) در پژوهشی تحت عنوان القای کالوس و باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های مختلف گیاه دارویی ازمک (*Lepidium draba* L.) بیان نمودند که درصد کالوس‌زایی و آغازش کالوس ریزنمونه ساقه بیشتر از دیگر ریزنمونه‌ها بود، در حالی که درصد باززایی کالوس در سه ریزنمونه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نداشت. کشت سلول و بافت گیاهی که کشت استریل یا کشت درون شیشه‌ای نیز نام‌گذاری می‌شود ابزاری ارزشمند و مفید در مطالعات کاربردی و پایه‌ای است که با وجود محاسن بی شمار آن امروز کاربرد ویژه و زیادی در تمامی دنیا پیدا کرده است (Razavi *et al*., 2016). استفاده از تکنیک کشت بافت به‌عنوان روشی بسیار مؤثر و ارزشمند جهت ازدیاد، اصلاح عملکرد و بهبود کیفیت و تولید گیاهان یکنواخت و عاری از بیماری گزارش گردیده است (Barcelo *et al*., 2001; Zarei *et al*., 2020). کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی بی شکل با دیواره سلولی نازک است که در شرایط طبیعی و یا در محیط درون شیشه‌ای به صورت سازمان نیافته رشد می‌کنند. بافت

کالوس بسته به گونه گیاهی ممکن است از نظر ساختمانی و چگونگی رشد با یکدیگر متفاوت باشد برخی کالوس‌ها ترد و شکننده و برخی به علت وجود لیگنین زیاد، سفت و سخت هستند (Elyasi *et al.*, 2017). کشت کالوس از روش‌های پرکاربرد کشت بافت به منظور تولید گیاهان دارویی، تولید مثل غیرجنسی، دستکاری ژنتیکی و افزایش تنوع‌ژنتیکی است (Zarei *et al.*, 2020). در تحقیقی Fahmideh و همکاران (2019)، کالوس‌زائی و اندام‌زائی از ریزنمونه‌های مختلف گیاه علف مار (از جنس *Cleome* L. و تیره Capparidaceae)، تحت شرایط درون شیشه‌ای بررسی کردند و بهترین ریزنمونه و تنظیم کننده رشد جهت به دست آوردن بیشترین میزان کالوس برای تولید گیاهچه را شناسایی نمودند و بیان کردند که تهیه ریزنمونه از پرچم و تمامی ترکیبات هورمونی مورد استفاده در مطالعه آن‌ها برای کالوس‌زایی مناسب است (Bigdeli *et al.*, 2004). محققین بسیاری جهت کالوس‌زائی در محیط کشت از ریزنمونه‌های مختلف گیاهی استفاده کرده‌اند (Abbasi *et al.*, 2016 & Abdirad *et al.*, 2011 & Baravardi *et al.*, 2015 & Ghotbzadeh Kermani *et al*., 2015 & Kahrizi and Kakaei., 2010 & Sadatnoori *et al.*, 2012 & Zarei *et al*., 2020 & Zebarjadi *et al.*, 2014). در همه این تحقیقات، فیتوهورمون‌های اکسین و سیتوکینین در کنترل فرآیندهای مختلف حیاتی از جمله رشد، نمو و تنظیم پاسخ به محرک‌های محیطی نقش ویژه‌ای دارند. مطالعه حاضر با هدف دستیابی به دانش فنی تکثیر و بهینه‌سازی شرایط ریزازدیادی گیاه ریحان بنفش از ریزنمونه‌های برگ و ساقه این گیاه و همچنین انتخاب بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و انتخاب ریزنمونه مناسب طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه ریز نمونه

بذر گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.) مورد تحقیق از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. این آزمایش در آزمایشگاه گروه طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی آجا در تهران و بخشی از آن نیز در دانشگاه پیام‌نور اسدآباد به شرح زیر انجام پذیرفت. در ابتدا با استفاده از کشت بذر در گلدان‌های حاوی کوکوپیت، پرلیت و کمپوست، گیاهان مناسب و مطلوب از نظر مورفولوژیکی جهت تهیه ریزنمونه‌های گیاهی فراهم شد. برگ‌ها و ساقه‌های سالم و بدون آسیب از گیاهان گلدانی جداشده و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا برگ‌ها و ساقه‌های جدا شده به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری آبشویی شدند. سپس به مدت ۷۰ ثانیه تا ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها در مرحله بعد به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند. بعد از این مرحله، ریزنمونه‌ها دو بار به مدت سه دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

تولید کالوس

قطعاتی از ساقه و برگ به طول حدود ۰/۵ تا ۱ سانتیمتر از بخش رأسی گیاه که دارای ۱ یا ۲ برگ نسبتاً کوچک و جوانه انتهایی بود جدا نموده، ابتدا توسط آب حاوی ماده شوینده (مایع ظرفشویی) و پس توسط آب مقطر شستشوی آن‌ها

صورت پذیرفت. بعد از این مرحله قطعات جدا شده به مدت ۱۵ دقیقه به محلول ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد منتقل گردیدند. سپس قطعات با آب مقطر استریل به طور کامل شستشو داده شدند و در نهایتاً قطعات ریزنمونه به مدت ۱ دقیقه به محلول قارچ‌کش ویتاواکس ۲ درصد منتقل شدند و نهایتاً قطعات جدا شده با آب مقطر استریل به طور کامل شستشو داده شدند و سپس ریزنمونه‌های برگ و ساقه در محیط‌کشت پایه شامل نمک‌های MS (Murashige & Skooge 1962) و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد به همراه ویتامین و ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن و آگار با غلظت g/l ۷ و با pH= ۵/۸ کشت شدند. ترکیبات هورمونی مورد استفاده در محیط‌های کشت شامل دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به عنوان منبع سیتوکینین و دو هورمون IBA و IAA، هر کدام در دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند. برای هر سنجش، تیمارها با چهار تکرار انجام شد. نمونه‌های موجود در پتری‌دیش‌ها پس از کشت در اتاق رشد به مدت ۲۵ روز با دمای ۲±۲۵ و روشنایی ۱۶ ساعت قرار گرفتند. ظروف کشت هر روز بررسی و تغییرات ایجاد شده یادداشت گردید. پس از ۳۰ روز از تاریخ کشت، جمع‌آوری داده‌ها از رشد کالوس‌های تشکیل شده انجام شد که صفات شامل درصد القای کالوس، نرخ رشد، سرعت رشد و محتوای آب نسبی کالوس بود.

میزان (نرخ) رشد نسبی کالوس (RGR) بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (Lokhande *et al.*, 2010).

$$RGR\ \% = (Wf-Wi)/Wi\times 100\%$$

Wi = وزن اولیه کالوس، Wf= وزن نهایی کالوس‌ها

محتوای آب نسبی کالوس‌ها (RWC) با فرمول زیر محاسبه گردید (Sun *et al.*, 2010).

$$RWC=(FW-DW)\times 100\%/FW$$

FW= وزن تر کالوس، DW= وزن خشک کالوس

درصد القای کالوس (درصد کالوس‌زایی): برای این منظور در هر پتری دیش تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس نموده بودند بر تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده تقسیم شد و نهایتاً در عدد ۱۰۰ ضرب گردید (Esfandiar *et al.*, 2017).

سرعت رشد پینه با اندازه‌گیری قطر پینه‌ها در بازه‌های زمانی مساوی ۱۰ روزه و سپس مقایسه آن در تیمارهای مختلف بررسی گردید. برای محاسبه قطر پینه از کاغذ شطرنجی میلیمتری استفاده شد و طول و عرض پینه‌ها اندازه‌گیری و سپس با روش Compton قطر پینه تعیین شد (Compton, 1994).

آنالیز آماری

این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام پذیرفت و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودار با نرم‌افزار Excel، و برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نوع ریز نمونه‌های استفاده شده در این تحقیق، تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف هورمونی در کالوس‌زائی مشاهده گردید (با چند غلظت حداقلی بررسی انجام شد و به دلیل پاسخ مناسب دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، از سایر غلظت‌های دیگر استفاده نشد) (جدول ۱). القای کالوس‌زائی در ریزنمونه‌های مختلف گیاهان، تنوع بسیاری نشان داده است و بر اساس پژوهش حاضر احتمالاً غلظت‌های هورمونی در حد زیادی وابسته به ریزنمونه است. شکل ۱، مراحل مختلف القای کالوس‌زائی با شاخساره نابجا در گیاه ریحان بنفش را نشان می‌دهد.

کیفیت کالوس‌های القا شده نشان‌دهنده انتخاب صحیح ریزنمونه و ترکیبات هورمونی مناسب است. نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نوع ریزنمونه و اثر ترکیبات هورمونی بر برخی صفات کالوس‌زائی در گیاه ریحان بنفش، نشان داد نوع ریزنمونه تنها بر محتوای آب نسبی کالوس مؤثر بوده و بر سایر صفات اثر معنی‌داری نداشته است (جدول ۱) و این احتمالاً به تفاوت ذاتی محتوای آب نسبی موجود در برگ و ساقه مرتبط است.

اثر ترکیبات هورمونی بر سه صفت مورد بررسی سرعت رشد، محتوای آب نسبی و نرخ رشد (وزن خشک) معنی‌داری بوده است که می‌توان در جهت انتخاب بهترین ترکیب در کالوس‌زائی و بهینه‌سازی کشت بافت و نهایتاً اهداف به‌نژادی از آن در ارتباط با صفات مذکور بهره‌مند شد.

همچنین اثر متقابل دو فاکتور ریزنمونه و ترکیبات هورمونی تنها بر شاخص نرخ رشد اثر معنی‌داری ($P\leq \%1$) داشته و بر سایر شاخص‌های مورد مطالعه اثر معنی‌داری نداشته است. این اثر معنی‌داری بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه به صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر هستند. تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف هورمونی در کالوس‌زائی این مطالعه با نتایج طاها و همکاران (۲۰۰۸) همسو است، طاها و همکاران با تحقیق روی گیاه *gyptian* *Catharanthus roseus* (L.) بیان کردند که بر روی محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر کینتین، کشت‌های سوسپانسیونی از ریزنمونه‌های برگ C. roseus تحت شرایط نور القا شده است (Taha *et al.*, 2008).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، جهت تولید کالوس وجود هورمون ضروری است و در محیط کشت فاقد هورمون کالوس تولید نشد. نتایج مشابه در گزارشات دیگر نیز وجود دارد (Khotaie & Karimi 2010). در این تحقیق ترکیبات مختلف هورمونی (شامل اکسین و سیتوکینین) در ارتباط با شاخص‌های مختلف وابسته به کالوس، واکنش‌های مختلفی نشان داد. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها اصلی‌ترین فاکتور رشد در روش کشت بافت می‌باشند که نوع و غلظت موثر آنها در ریزنمونه‌های مختلف، متفاوت است (Hsia & Korban 1996; Abdirad *et al.*, 2011).

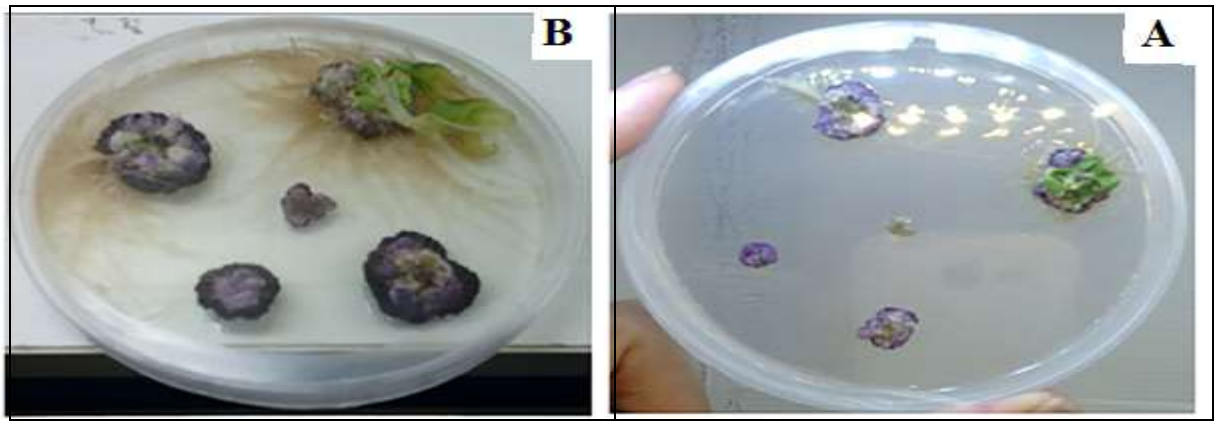
جدول ۱- تجزیه واریانس ترکیبات هورمونی و ریزنمونه بر صفات درصد کالوس‌زائی، سرعت رشد، محتوای آب نسبی و نرخ رشد

Table 1. Analysis of variance of hormonal compounds and explants on callus percentage, growth rate, relative water content and growth rate

Growth Rate (Dry weight) (mg per day)	Relative Water content (mg)	Growth Rate (mm diameter per day)	Percent of Callus Formation	df.	Source of variations
0.007 ^{ns}	0.001**	0.0001 ^{ns}	897.005 ^{ns}	1	Explant
0.085**	0.003**	0.004**	2401.172 ^{ns}	7	Growth Regulator
0.042**	0.001 ^{ns}	0.00012 ^{ns}	441.350 ^{ns}	7	× Growth regulator
0.006	0.0001	0.0001	441.885	32	Error
13.37	1.99	28.77	37.17		CV (%)

** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

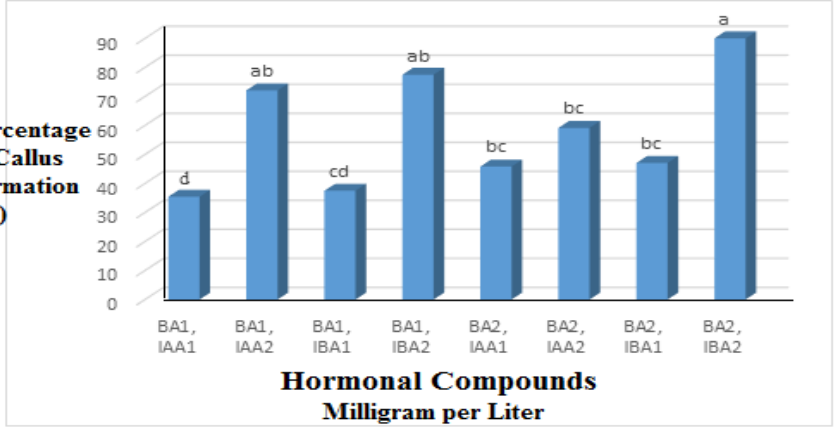
$^{ns, **}$ non-significant and significant at 1% level.



شکل ۱- مراحل مختلف القای کالوس‌زائی در گیاه ریحان بنفش با شاخساره نابجا مربوط به محیط کشت IAA. A) ابتدای تشکیل القای کالوس در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.) و مشاهده رشد اولیه، B) تشکیل کامل کالوس.

Figure 1. Different stages of callus induction in purple basil plant. a) The beginning of callus induction formation in purple basil plant and observing the initial growth, b) complete callus formation.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد بهترین ترکیب از نظر شاخص درصد کالوس‌زائی شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA است (شکل ۲). کمترین درصد کالوس‌زائی مربوط به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم BA به اضافه ۱ میلی‌گرم اندول‌استیک‌اسید (IAA) بوده است که بیشترین درصد کالوس‌زایی آن ۸۸ درصد و کمترین میزان برای صفت درصد کالوس‌زایی ۳۱ درصد است. در مطالعه ختایی و کریمی (۲۰۱۰)، اثر اکسین و سیتوکینین بر تولید کالوس در تاتوره را بررسی کردند و نشان دادند در حضور اندول استیک اسید (IAA) تولید کالوس افزایش یافته ولی اندام‌زایی مشاهده نشده که با نتایج آزمایش حاضر در خصوص گیاه دارویی ریحان بنفش هم‌سو است (Khotaie & Karime 2010).

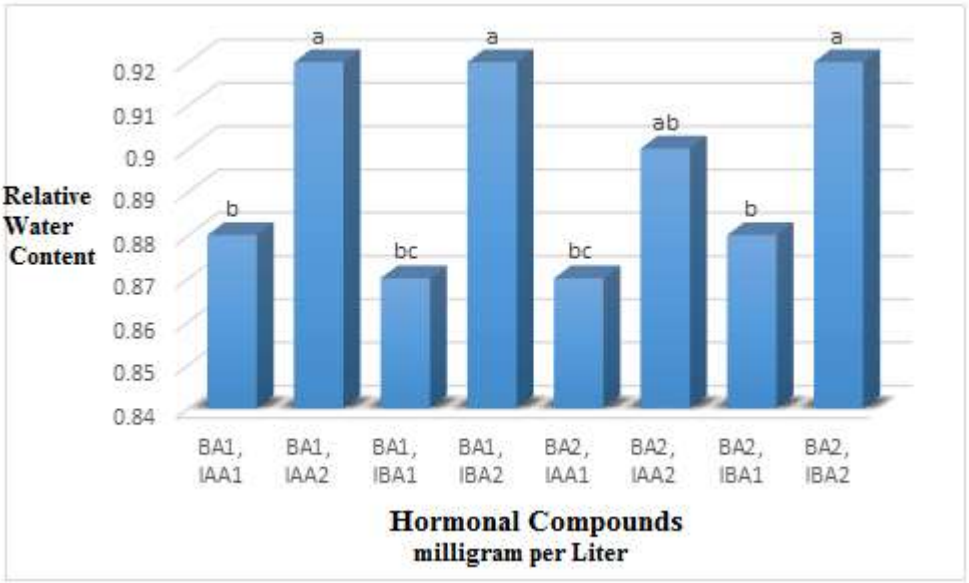


شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف BA، IBA و IAA بر درصد کالوس‌زائی گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)

Figure 2. Effect of different concentrations of BA, IBA and IAA on the Percentage of calluses Purple Basil

حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقایسه میانگین‌ها برای شاخص محتوای آب نسبی (شکل ۳) نشان داد بیشترین میانگین مربوط به ترکیبات هورمونی BA ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه IBA ۲ میلی‌گرم در لیتر و اندول‌استیک‌اسید (IAA) ۲ میلی‌گرم در لیتر و همچنین محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است و کمترین میانگین محتوای آب نسبی نیز مربوط به ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و نیز ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر IAA است. که بیشترین درصد برای صفت محتوای آب نسبی ۹۰ درصد و کمترین آن نیز ۸۶/۵ درصد است.

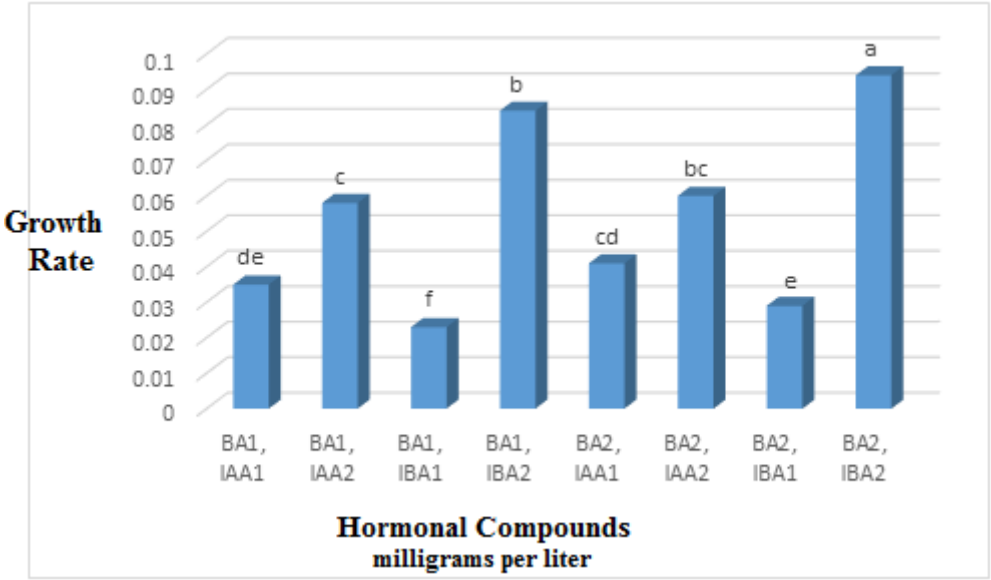


شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA، BA و IAA بر محتوای آب نسبی

Figure 3. Effect of different concentration of indole butyric acid (IBA), Benzyl adenine (BA) and indole acetic acid (IAA) on the Relative water content

حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقایسه میانگین‌ها برای شاخص سرعت رشد (شکل ۴) نشان داد بیشترین سرعت رشد مربوط به ترکیب هورمونی شامل ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است و گیاه در ترکیبات دارای IAA دارای سرعت رشد کمتری بوده‌است. بیشترین و کمترین میانگین مربوط به میزان BA1 و IBA1، به ترتیب ۹۰ درصد و دو درصد است. مطالعات علمی بسیاری گزارش کرده‌اند که همانند سایر تنظیم‌کننده‌های رشد غلظت‌های مناسب اکسین‌ها مانند IBA در گیاهان مختلف، متفاوت است. در ابتدای کشت ریزنمونه‌ها استفاده از اکسین کمتر ولیکن در مراحل بعد اکسین‌ها نقش ضروری دارند که این موضوع به اهمیت نقش اکسین در القای ریشه زایی و جذب مواد غذایی نسبت داده می‌شود (Filipecki *et al.*, 2005).

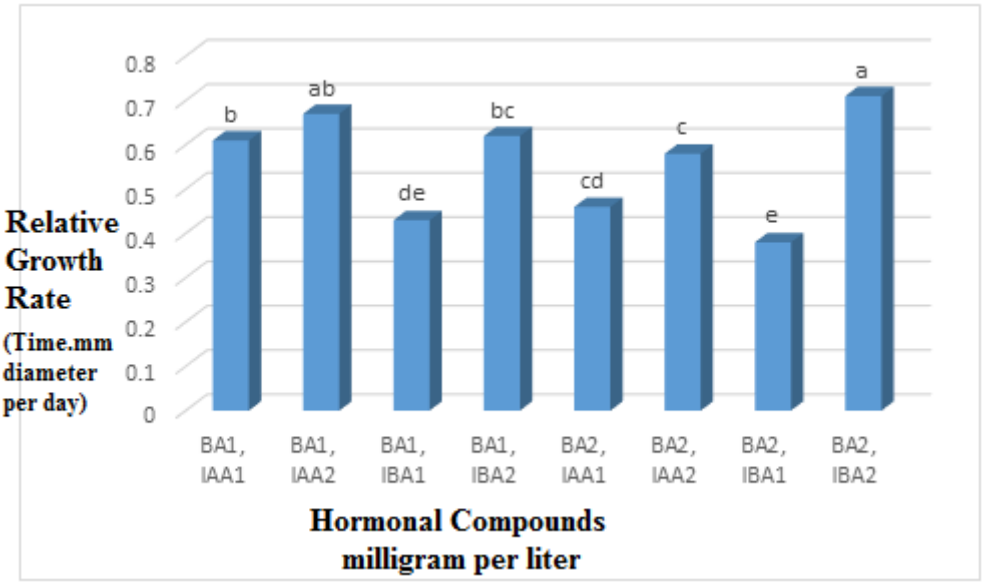


شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA، BA و IAA بر سرعت رشد در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)

Figure 4. Effect of different concentration of indole butyric acid (IBA), Benzyl adenine (BA) and indole acetic acid (IAA) on the Growth rate in (*Ocimum basilicum* L.)

حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفت شاخص نرخ رشد نسبی (شکل ۵) نشان داد بیشترین نرخ رشد مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است و کمترین نرخ رشد مربوط به ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است. همانطوری که گفته شد بیشترین میانگین مربوط به ترکیب BA2 و IBA1 با میزان ۳۵٪ بود.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA، BA و IAA بر نرخ رشد نسبی در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)

Figure 5. Effect of different concentration of indole butyric acid (IBA) on the Relative growth rate in purple basil

حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقایسه میانگین اثرمتقابل نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی نیز انجام شد (جدول ۲) و نتایج نشان داد که بیشترین میانگین مربوط به ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به اضافه ۲ میلی‌گرم IBA بوده است. همچنین در مجموع میانگین‌های ریزنمونه ساقه در اکثر ترکیبات هورمونی بیش از ریزنمونه برگ بوده است. رامندی و همکاران در مطالعه بهینه‌سازی کالوس‌زائی و کشت سوسپانسیون سلولی در زعفران بیان کردند که بیشترین درصد کالوس‌زائی و وزن تازه کالوس‌ها در تیمار حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP به دست آمد (Ramandi *et al*., 2023).

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف BA، IBA و IAA بر برگ و ساقه (مقایسه میانگین اثرمتقابل نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی) برای صفت نرخ رشد نسبی

Table 2. Effect of different concentration of BA, IBA and IAA on Leaves and stems (Comparison of the average effect of explant type and hormonal compounds) for the trait of relative growth rate

BA2, IBA2	BA2, IBA1	BA2, IAA2	BA2, IAA1	BA1, IBA2	BA1, IBA1	BA1, IAA2	BA1, IAA1	Regulator
0.35 fg	0.42 ef	0.24 g	0.61 bcd	0.42 ef	0.50 de	0.62 bcd	0.62 bcd	**Leaf**
0.77 a	0.60 bcd	0.70 ab	0.69 ab	0.65 abc	0.56 bcd	0.54 cde	0.66 abc	**Stem**

هورمون‌های بنزیل آدنین (BA)، اندول استیک اسید (IAA) و اندول بوتیریک اسید IBA

Benzyl adenine (BA), indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) hormones

ریزازدیادی به روش کشت بافت، امکان تولید سریع از گیاهان یکنواخت برای بسیاری از گونه را ایجاد کرده است. اثر سیتوکینین‌ها در کشت بافت بسیار قابل توجه است و معمولاً همراه با اکسین برای بهبود تقسیم سلولی و کنترل اندام‌زائی

استفاده می‌شود (Del-Poza *et al.*, 2005). اثبات گردیده است که تنظیم‌کننده‌های رشدی با یکدیگر برهمکنش داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را ارتقا بخشند. کلاً تشکیل شاخساره چه به طور مستقیم از بافت ریزنمونه یا غیرمستقیم از کالوس، بوسیله تعادل مواد تنظیم‌کننده رشد بین اکسین و سیتوکنین تنظیم می‌گردد (Ghasemi *et al.*, 2017). در تحقیقات مشابه سعی بر آن شده تا بهترین ترکیب با مطلوب‌ترین غلظت از هورمون‌ها مورد بررسی قرار گیرد (Seydi *et al.*, 2016). تنظیم‌کنندگان رشد تأثیر زیادی بر فرآیندهای اصلی سلول ازجمله شروع تقسیم سلولی و انبساط سلولی، اسیدی شدن دیواره سلول و سازمان‌دهی سلول به‌منظور ایجاد بافت کالوس و یا بافت تمایزیافته نظیر (ساقه و ریشه) ایفا می‌کنند (Gaspr *et al.*, 1996).

در مطالعه ای، بهینه‌سازی کشت کالوس گیاه دارویی اسطوخودوس بررسی شد، کالوس‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگ کشت شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم برلیتر 2, 4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP که در شرایط روشنایی اتاق رشد نگهداری شدند، بالاترین درصد کالوس‌زائی و وزن تر و خشک را در میان سایر تیمارها به خود اختصاص دادند و به عنوان بهترین کالوس‌های القا شده شناخته شدند (Kikha Akhar *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای Sadat noori و همکاران (Sadat noori *et al.*, 2012) در مورد کالوس‌زائی در گیاه زیره سیاه بیان نمودند که بیشترین درصد کالوس‌زائی (۹۳ درصد) مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینیتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA است که دارای تفاوت معنی‌دار با سایر تیمارها بود. در تحقیقی Abdi rad و همکاران (Abdi rad *et al.*, 2011)، با مطالعه صفات مربوط به کالوس در گل‌محمدی و گل‌سرخ مینیاتوری، ابراز نمودند که کالوس‌های ۲۰ روزه (۲۰ روز پس از بنیان‌گذاری)، بهترین نمونه‌ها برای تشخیص بهتر نرخ رشد در دو گونه بودند و کالوس‌های ۲۰ روزه‌ی گل‌سرخ مینیاتور نسبت به گل‌محمدی حجم بیشتر و در نتیجه نرح رشد بالاتری داشتند. در پژوهشی Peyvandi و همکاران (Peyvandi *et al.*, 2009) در مطالعه کالوس‌زائی و اندام‌زایی اسطوخودوس ابراز نمودند که در هیچکدام از محیط‌های واکشت ریشه‌زائی مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد نوع ریزنمونه، بالغ بودن یا جوان بودن و همچنین موقعیت ریزنمونه در گیاه، که نشان از هورمون داخلی است و نیز ترکیب محیط کشت می‌تواند در فرآیندهای تقسیم سلولی و تشکیل جنین و اندام تأثیرگذار باشد.

نتیجه‌گیری کلی

گیاه دارویی ریحان بنفش حاوی روغن‌های ضروری و اسانس بازیلیک است و جهت بهبود بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بطورکلی نتایج این تحقیق نشان داد بالاترین درصد کالوس‌زائی مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در BA بود و در مجموع میانگین‌های ریزنمونه ساقه در اکثر ترکیبات هورمونی بیشتر از سایر ریزنمونه‌ها

بود. در حقیقت این پژوهش پایه‌ای، راه را برای گام بعدی فعالیت‌های به‌نژادی محققین گیاه ریحان بنفش هموار نمود و به عبارت دیگر نتایج بررسی پاسخ این گیاه به کالوس‌زائی در خصوص انتخاب سطوح ترکیبات هورمونی و نوع ریزنمونه مفید خواهد بود و می‌تواند نویدبخش امکان سایر فعالیت‌هایی نظیر باززایی، تکثیر، جنین‌زایی سوماتیکی، تولید بذر مصنوعی و انتقال ژن هدفمند به این گیاه ارزشمند باشد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سپاسگزاری

از همه‌ی عزیزانی که در کلیه مراحل این کار پژوهشی همکاری نمودند مراتب قدردانی و سپاسگزاری را داریم.

References

Abbasi H.A. Tasaodi S. Mirsoleimani M.A. and Masoudi M. 2016. Study of milkweed (*Calotropis procera*) regeneration potential *in vitro* culture conditions. J. Plant Res. 49 (4): 833-842.

Azizi M. and Abdollahi Mandoulakani, B. 2019. Identification of SNPs in exonic regions of eugenol o-methyl transferase and chavicol omethyl transferase genes in basil. J. of Agri. Bio. 10 (1): 105-117.

Abdirad S. Rezanejad F. and Kalantari K.F. 2011. The effect of different light Intensities on callogenesis and calli pigments content of shoot and floral explants of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa miniature*. A. B. J. 3 (1): 43-65.

Baravardi H. Ranjbar Gh.A. Kamali F. and Abadi S. 2015. Comparison of amount of callus induction in *juniperus excelsa* on MS and WPM culture media using different concentration of NAA, 2, 4-D and Kin. J. Crop Breed.7 (16): 149-157.

Bigdeli M., Hashkavaii A., Rustaiyan A. 2004. A review on biological effect of Cleome L. and identification the compositions of cleome coluteoides essential Oil. J. Med. Plants, 3 (12): 9-14.

Barcelo P. Gaunt S.R. Thorpe C. and Lazzeri P. 2001. Transformation and gene expression. In: Advances in Botanical Research, vol. 34: Biotechnology of Cereals. Shewry P.R. Lazzeri P.A. Edwards K.J. (Eds). Academic Press, London. pp. 59-126.

Compton M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 217-242.

Constabel F. 1990. Medicinal plant biotechnology. Planta Med. 56: 421-425.

Del-Poza J.C. Lopeza-Matas M.A. Ramireza-Parra E. and Gutierrez C. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. Physiol. Plant. 123: 173-183.

Elyasi L. Mehrabi A. Seyedi M. and Safari Z. 2017. Optimization of callus culture of *Satureja Bachtiarica* L. using different explants and concentrations of growth regulators. J. Crop Breed. 8 (20): 132-124.

Esfandiar A. Kazemitabar S.K. and Kiani, Gh. 2017. Investigation of callus induction and indirect shoot regeneration in *Chelidonium majus* L. affected by plant growth regulators. Plant Research Journal. 30 (3): 488-497.

Fahmideh L. Sheikhi Sh. Benakashani F. and Solouk M. 2019. Callus induction and organogenesis from various explants of plant *Capparis spinosa* L. under *in vitro* conditions. J. Plant Prod. Sci. 26 (1): 75-88.

Filipecki M. Wisniewska A. Yin Z. and Malepszy S. 2005. The heritable changes in metabolic profiles of plants regenerated in different types of *in vitro* culture. Plant Cell, Tiss. and Org. Cul. (PCTOC). 82: 349-356.

Gaspr T. Kevers C. Penel C. Greppin H. Reid D. and Thorpe T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 32: 272-289.

Ghasemi Z. Masoumiasl A. and Amiri-Fahliani R. 2017. Study of direct plantlet regeneration in two populations of medicinal bitter melon (*Citrulus colosynthis* L.) using types of explants and plant growth regulators. Cell. Mol. J. (Iranian J. of Bio.). 30: 409-414.

Ghotbzadeh Kermani S. Pourseyedi Sh. Mohamadi Gh.A. Moieni A. and Baghizadeh A. 2015. Regeneration of white top (*Cardaria draba* L.) using tissue culture. Agri. Bio. J. 7 (1): 133-154.

Gohari Gh. Rasouli F. and Zahedi S.M. 2018. Evaluation of some growth characteristics, essential oil content and yield of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in salinity stress condition and humic acid. appli. J. of agricultural knowledge and sustainable production. 27 (2): 160-168.

Haghighat Hour M. Asghari Z. Rasool N.Z. 2011. Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver pseudo-orientale* under in vitro conditions. J. Plant Biol. 3 (10): 11-22.

Hsia C. and Korban S.S. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cul. (PCTOC). 44: 1-6.

Khanfar M.A. Sabri S.S. Zarga M.H. and Zeller K.P. 2003. The chemical constituents of *Capparis spinosa* of Jordanian origin. Nat. Prod. Res. 17: 9-14.

Kahrizi D. and Kakaei, M. 2010. Effect of 6-Benzylaminopurine, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Indole-3-Butyric Acid on Micropropagation Stages of *Achillea biebersteinii.* Asian J. OF Che.22 (3): 283-2386.

Kahrizi, D. Kakaei, M and Sourni J. 2022. Asexual (vegetative) plant embryogenesis.

Kikha Akhar F. Khadem A. Bagheri A. and Sharifi A. 2012. Optimization of callus cultivation of *Lavandula angustifolia* Mill. Third National Conference on Agricultural Biotechnology of Iran Mashhad.

Khotaie E. and Karimi F. 2010. Auxin and cytokinin effects on callus and organ production and total alkaloid contents in *Datura innoxia* calli. IJPB. 2 (2): 55-66. (In Persian)

Lokhande V.H. Nikam T.D. and Penna S. 2010. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 102: 17-25.

Murashige T. and Skoog F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473-497.

Peyvandi M. Kazemi L. and Majd A. 2009. Callogenesis and organogenesis of *Lavandula vera* DC. J Plant Sci Res. 15 (3): 54-67.

Ravishankar G.A. and Venkataraman L.V. 1998. Rapid multiplication of plants from cultured axillary buds of mentha piperita. Philipp. J. Sci. 117(2): 121-129.

Ramandi A. Qolizadegan Ehsanabad A. and Saifi A. 2023. Optimization of callus formation and cell suspension culture in saffron. Saffron Research Journal. 10 (2): 276-284.

Razavi S.M. Ghasemian A. Mousavi Samarin S. and Arsh Neshin H. 2016. Callus induction and analysis of active Constituents Essential Oil (*Dracocephalum moldavica* L). Eco-phy. J. of Med. Plant (EJMP). 2: 88-94. (In Persian)

Sadatnoori S.A. Mortazavian S.M.M. Ghamari Zare A. Omidi M. and Hoori M. 2012. Evaluation of callus induction and somatic embryogenesis in black cumin (*Bunium persicum* Boiss.). J. Agri. Biotech. 5 (2): 69-85.

Seydi S. Negahdar N. Taghizadeh R. Ansari M. and Kaviani B. 2016. Effect of BAP and NAA on micropropagation of *Caladium bicolor* (Aiton) Vent, an Ornamental Plant. J. Ornam. Hortic. 6: 59-66.

Sadeghian tehrani S. Kazemi tabar S.K. Ranjbar G. A. and Golchobian S. 2010. Investigation and selection of suitable culture medium for in vitro reproduction and reproduction of basil plant. National Conference of Medicinal Plants. http://sid.ir/paper/820711/fa.

Sun Y.L. and Hong S.K. 2010. Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). Plant Cell Tissue and Org. Cul. 100: 317-328.

Taha H.S. El-Bahr M.K. and Seif-El-Nasr M.M. 2008. *In vitro* studies on egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.:1- calli production and direct shootlets regeneration and alkaloids determination. J. Appl. Sci. 4: 1017-1022.

Zarei A. Salajeghe F. and Kamalizadeh M. 2020. Effect of different plant growth regulators, explant types and light on callogenesis traits of medicinal plant nettle (*Urtica dioica* L.). Plant Prod. 43 (2): 255-266.

Zebarjadi A.R. Motamedi M. Taravat E. and Ismaili A. 2014. Micropropagation of medicinal purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) using cotyledon and hypocotyl segments. J. Plant Res. 26 (3): 311-319.

Zinhari Z. Pour seyyedi Sh. and Zolala J. 2016. Callus induction and direct shoot regeneration in *Lepidium draba* L. Explants. J. of Agri. Bio. 8 (2): 31-52.

Ziaei M. Sharifi M. Naghdi Badi H. Tahsili J. and Ghorbani Nohooji M. 2014. A Review on *Ocimum basilicum* L. medicinal plant with a focus on the most important secondary compounds and its medicinal and agronomic properties. J. Med. Plant. 13 (52): 26-40.

The Role of Growth Regulators in Optimization of Callus Production in Medicinal Plant of Red Rubin Basil (*Ocimum basilicum* L.*)*

***Mehdi Kakaei[1], Fatemeh Hajmoradi[2], Mohsen Mansori [3], Mohamad Ali Ebrahimi [4]**

Received: 2022.09.04
Accepted: 2023.05.15

Abstract

Background and purpose: Today, plant tissue culture techniques are used as a valuable tool to create genetic diversity with the aim of breeding plants and also producing virus-free plants. The aim of this research is to present an effective method on callus formation in red rubin basil plant; therefore, in this research, optimization of tissue culture conditions of purple basil plant for callus production, identification of callus induction percentage, growth rate, growth speed and relative water content of callus was conducted through tissue culture. **Materials and Methods**: The callus induction optimization experiment was carried out as a factorial in the form of a completely randomized design with 4 factors, micro samples and three levels of Benzyl adenine (BA), indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) hormones**. Findings:** The results showed that the highest percentage of callus induction (88%) was related to the culture medium containing 2 mg/L IBA and 2 mg/L BA. The effect of hormonal compounds on the four investigated characteristics of callus generation percentage, growth speed, relative water content and growth rate (dry weight) had a significant effect, which can be used to select the best combination in callus formation and tissue culture optimization, and finally the future goals of the breed. Also, the interaction effect of two explant factors and hormonal compounds only had a very significant effect on the growth rate index (P≤1%). **Conclusion:** The quality of the induced calluse indicates the correct selection of explants and suitable hormonal compounds. Therefore, there is a direct relationship between callus production and growth regulators, and also according to the type of plant studied and the amount of hormone present in it, the amount of growth regulators used in callus induction will be different.

Keyword: Callus formation, Explant, Phytohormones, Tissue Culture.

1. Associate Professor Plant Breeding, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, Tehran-Iran. (*Corresponding Author: M.Kakaei@pnu.ac.ir)

2. Assistant Professor biology, Department of Biology, Payame-Noor University, Tehran, Iran

3- Department of Persian Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Professor Biotechnology, Department of Agricultural biotechnology, Payame Noor University, Tehran-Iran.