بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی در گیاه دارویی به لیمو (*Lippia citriodora*)

حجت طاهری عزیزآبادی، نادعلی باقری* و نادعلی بابائیان جلودار

[1]گروه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۰۷/۱۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۱۰/۰۹)

چکیده:

این تحقیق به منظور سنجش اثر نوع تنظیم‌کننده‌های رشد و برهمکنش آنها بر کالوس‌زایی و باززایی به لیمو (*Lippia citriodora*)، در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) صورت گرفت. آزمایش کالوس‌زایی با ریز نمونه‌های برگ و ساقه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. آزمایش باززایی نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. برای بررسی کالوس‌زایی، هورمون ۲و ٤- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) در ترکیب با ٦- بنزیل آمینو پورین (BAP) و در ترکیب با هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی باززایی نیز هورمونBAP در ترکیب با کایتین (Kin) و در ترکیب با NAA استفاده گردید. اثرات این هورمون‌ها بر کالوس‌زایی ریز نمونه برگ نشان داد تیمار با سطح صفر میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بالاترین (۹۷ درصد) میزان کالوس‌زایی را داشته‌اند. بیشترین درصد تشکیل کالوس در ریز نمونه ساقه در تیمار با سطح صفر میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۹۷ درصد) مشاهده شد. در محیط کشت MS بدون هورمون، کالوس‌زایی برای ریز نمونه‌های برگ و ساقه مشاهده نشد. بالاترین میزان باززایی جهت تولید اندام هوایی (٤۰ درصد) در تیمار هورمونی BAP به میزان یک میلی‌گرم در لیتر و Kin به میزان ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و بالاترین باززایی جهت ریشه‌زایی (٤۰ درصد) نیز در ترکیب هورمونی NAA به میزان ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان یک میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، با استفاده از محیط کشت حاوی هورمون‌های BAP، 2,4-D، NAA و Kin از کشت درون شیشه‌ای گیاه به لیمو می‌توان جهت تکثیر سریع و آسان این گیاه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، به لیمو، کالوس‌زایی، ریز نمونه، هورمون.

مقدمه:

به لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* درختچه‌ای از خانواده Verbenaceae به ارتفاع حدود ۱/۵ تا ۲/۵ متر با برگ‌های ساده‌ی سرنیزه‌ای به طول ۷ تا ۱۰ سانتی‌متر می‌باشد (راشدی، ۱۳۸۰). این گیاه بومی آمریکای جنوبی و نواحی شیلی، پرو و آرژانتین است و تا ۱۰۰ سال پیش فقط به عنوان یک گونه زینتی شناخته می‌شد ولی امروزه به دلیل اهمیت فراوان اقتصادی آن در صنایع غذایی و عطر سازی در اکثر کشورها از جمله ایران کشت شده و به خوبی پرورش می‌یابد. از این گیاه در درمان عوارض مختلفی همچون طپش قلب، سردرد، سرگیجه، سوء هاضمه، نفخ و نیز به عنوان مسکن در تسکین دردهای عصبی، شل کننده عضلات شکم و تب‌بر استفاده می شود (زرگری، ۱۳۷۱). تکثیر به لیمو به وسیله قلمه زدن شاخه ها و یا خوابانیدن آنها در زمینی قابل نفوذ و مرطوب در فصل بهار صورت می‌گیرد. البته با استفاده از این روش، تعداد محدودی گیاه با توجه به حجم خزانه و همچنین تعداد پایه های مادری اولیه، تولید می‌شود (Gruenwald and Brendler, 2004). تکثیر به لیمو از طریق بذر به دلیل اینکه در طول سال نمی‌توان

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: b_r 5415@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]

بذرهای زنده زیادی را به دست آورد و بذرها قابلیت جوانه زنی خود را پس از برداشت به سرعت از دست می دهند، نیز مشکل است (Mosavi, 2012). کشت بافت گیاهی روش مؤثری است که می‌تواند جهت تکثیر غیر جنسی گیاه به صورت انبوه و عاری از آلودگی مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهشی کوتیلدون‌های بذرهای جوانه زده به لیمو جدا شد و روی محیط کشت MS حاوی BAP، Kin و ایندول ٣- استیک اسید (IAA) قرار داده شد. بعد از چهار هفته، در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر ایندول ٣- استیک اسید ساقه‌زایی با میانگین طول ٣/٨٥ سانتی‌متر مشاهده شد. ترکیب ٠/٥ میلی گرم در لیتر هورمون IAA با هورمونKin در دو سطح ٠/٥ و یک میلی‌گرم در لیتر، تکثیر ساقه‌ها را افزایش داد و میانگین طول آنها را به ٥/١٨ سانتی‌متر رساند (Mosavi, 2012). در پژوهشی دیگر قطعات گره‌ای حاوی ١ تا ٢ جوانه جانبی به منظور ریز ازدیادی نوساقه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA، ایندول ٣- بوتریک اسید (IBA) و BAP کشت شدند. ریشه‌زایی در محیط‌های کشت حاوی هورمون‌های، NAA و ذغال فعال بررسی گردید. بیشترین تعداد شاخه‌ها در تیمار هورمونی حاوی ٣ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ٠/١ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA و بیشترین فراوانی ریشه در تیمار هورمونی حاوی IBA در غلظت ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ٢ گرم بر لیتر ذغال فعال به دست آمد (اولادزاد و همکاران، ١٣٩١). مطالعات دیگری در زمینه ریز ازدیادی و کشت بافت جنس *Lippia* *L. junelliana*، نیز از کشت بافت برای ریز ازدیادی این گیاه استفاده شد (Juliani and Koroch, 2000). آنها نوک ساقه‌ها و ساقه‌های گره‌دار را در محیط کشت MS حاوی ٤/٤ میکرو مولار بنزیل آدنین (BA) یا ٠/٠٤ میکرو مولار IBA در ترکیب با ٤/٤ میکرو مولار BA قرار دادند. نتایج نشان داد ریشه‌دهی ساقه‌ها در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده‌های رشد بهتر می‌باشد. در این پژوهش جهت معرفی محیط کشت کارآمد و با صرفه اقتصادی بهتر، از تیمارهای هورمونی متفاوت از آنچه که در پژوهش‌های قبلی به کار رفته، استفاده شده است. با توجه به اهمیت تولید انبوه گیاهان به‌لیمو عاری از بیماری، این مطالعه با هدف تعیین مناسب‌ترین نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی جهت کالوس‌زایی و باززایی گیاه به لیمو در شرایط کشت درون شیشه‌ای صورت گرفت.

مواد و روش‌ها:

قلمه‌های گیاه دارویی به لیمو در مهر ماه سال ١٣٩٣ از بوته های موجود در گلخانه گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و به گلدان انتقال داده شدند. سپس رطوبت ٧٠ درصد و دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد برای ریشه دهی قلمه‌ها فراهم شد. پس از ریشه‌دهی و به دنبال آن برگ و ساقه‌دهی قلمه‌ها در گلدان‌ها، ریز نمونه‌های برگ و ساقه تهیه شدند. ساقه‌های نازک به قطعات به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند و به عنوان ریز نمونه ساقه مورد استفاده قرار گرفتند. برگ‌ها نیز از ساقه‌ها جدا شدند و پس از قطعه قطعه کردن آنها به اندازه یک سانتی‌متر مربع، به عنوان ریز نمونه برگی مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور ضدعفونی کردن، ابتدا ریز نمونه‌های برگ و ساقه به مدت ٢٠ دقیقه در زیر آب جاری به همراه مایع ظرفشویی شستشو شدند. ریز نمونه‌های برگ در زیر هود لامینار ایر فلو ابتدا به مدت ٣٠ ثانیه با الکل ٧٠ درصد و ریز نمونه‌های ساقه به مدت یک دقیقه با الکل ٧٠ درصد آغشته شدند سپس ریز نمونه‌های برگ با محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد حجمی حاوی چند قطره توویین به مدت ١٠ دقیقه و ریز نمونه های ساقه به مدت ١٥ دقیقه استریل شدند. از قارچ‌کش پنکونازول ٠/٥ درصد نیز به مدت ٣٠ ثانیه برای هر دو نوع ریز نمونه استفاده شد. در نهایت ریز نمونه‌ها به وسیله آب مقطر دوبار تقطیر استریل سه بار شستشو داده شدند و در آخر خشک شدند (اولادزاد و همکاران، ١٣٩١). آزمایش کالوس‌زایی با کشت ریز نمونه‌های برگ و ساقه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و با فاکتورهای هورمونی BAP در ٤ سطح (صفر، ١، ٢، و ٣ میلی‌گرم در لیتر)، هورمون 2,4-D در سه سطح (صفر، ٢ و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]

۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین هورمون NAA در چهار سطح (صفر، ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS، با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ٦ گرم بر لیتر آگار و pH= ۵/۸ انجام شد به طوری که سطوح مختلف هورمون ۲,٤-Dدر ترکیب با سطوح مختلف هورمون‌های NAA و BAP (در مجموع ٢٤ تیمار هورمونی برای هر نوع ریز نمونه) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور باززایی، بعد از گذشت دو ماه از زمان کشت، کالوس‌ها به محیط کشت جدید انتقال داده شدند. آزمایش باززایی نیز در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد و از تیمارهای هورمونی BAP در سه سطح (۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با هورمون‌های Kin و NAA به ترتیب در سه سطح (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و (۰/۰۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده گردید. شیشه‌های محتوی کالوس‌های کشت شده در ژرمیناتور، تحت شرایط دمایی ۲ ±٢٤ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ١٦ ساعت روشنایی، قرار داده شدند. تجزیه داده‌های کالوس‌زایی و باززایی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث:

ده روز بعد از کشت، کالوس‌زایی در ریز نمونه‌های برگ مشاهده شد. همچنین با گذشت دو هفته از شروع آزمایش کالوس‌زایی ریز نمونه‌های ساقه آغاز شد. کالوس‌ها، بدون شکل منظم و به رنگ سبز روشن و متمایل به زرد ظاهر شدند (شکل۱). باز کشت برای ریز نمونه‌های برگ و ساقه به فاصله زمانی دو هفته یک‌بار انجام شد. بعد از سپری شدن ٤ هفته، با بررسی تمام ریز نمونه‌های کشت شده، صفت درصد کالوس زایی برای هردو ریز نمونه ساقه و برگ اندازه گیری شد.

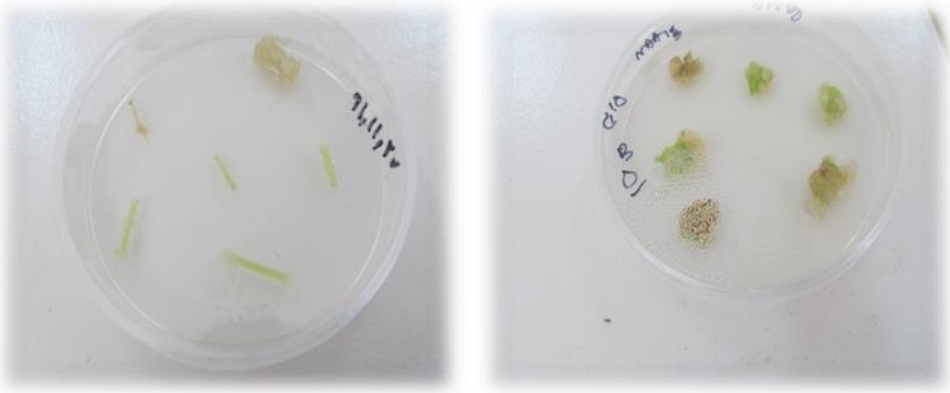
پس از بررسی آماری و تجزیه واریانس (جدول۱)، نتایج نشان داد اثر ساده هورمون‌های NAA و 2,4-D و همچنین برهمکنش آن‌ها برای صفت کالوس‌زایی، بسیار معنی‌دار است (P< ۰/۰ ۱).

همان‌طور که در شکل ۲ آمده است، تیماری که در آن هر دو هورمون در سطح صفر قرار داشتند کالوس‌زایی در هر دو ریز نمونه برگ و ساقه مشاهده نشد. در ریز نمونه برگ بالاترین میزان کالوس‌زایی در تیمار با سطح صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۹۷ درصد) مشاهده شد و همچنین تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر NAAو سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D نیز کالوس‌زایی بالایی (۹٦ درصد) را نشان داد به طوری که با سطح صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در یک کلاس آماری قرار گرفت. کمترین کالوس‌زایی مربوط به تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۲۲/٦٦ درصد) مشاهده گردید (شکل ۲-الف).

مطابق شکل ۲-b، بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریز نمونه ساقه در تیمار با سطح صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D (۹۷ درصد) مشاهده گردید و تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA نیز کالوس‌زایی بالایی (۹۲ درصد) را نشان داد به طوری که با سطح صفر میلی‌گرم در لیتر NAA و سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D در یک کلاس آماری قرار گرفت. کمترین میزان کالوس‌زایی نیز در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (٤٥/۳۳ درصد) مشاهده شد و با تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA(٤٦/۳۳ درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفت.

این نتایج نشان دهنده تأثیر زیاد هورمون 2,4-D در کالوس‌زایی گیاه به لیمو در هر دو نوع ریز نمونه برگ و ساقه می‌باشد که این نتیجه با نتایج دیگر محققان نیز مشابه است. Binh و همکاران (۱۹۸٦) مشخص کردند که در بین اکسین‌ها 2,4-D نسبت به NAA از نظر تولید کالوس در گیاه به لیمو، اثر بیشتری داشته است. هورمون‌هایی که باعث القاء و رشد کالوس می‌شوند، از طریق فاکتورهای مخصوصی، باعث رشد قطعات جدا کشت تحت الگوی منظمی می‌شوند. بنابراین بافت‌های گیاهی دارای گیرنده‌های مخصوص در غشاء و یا

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]



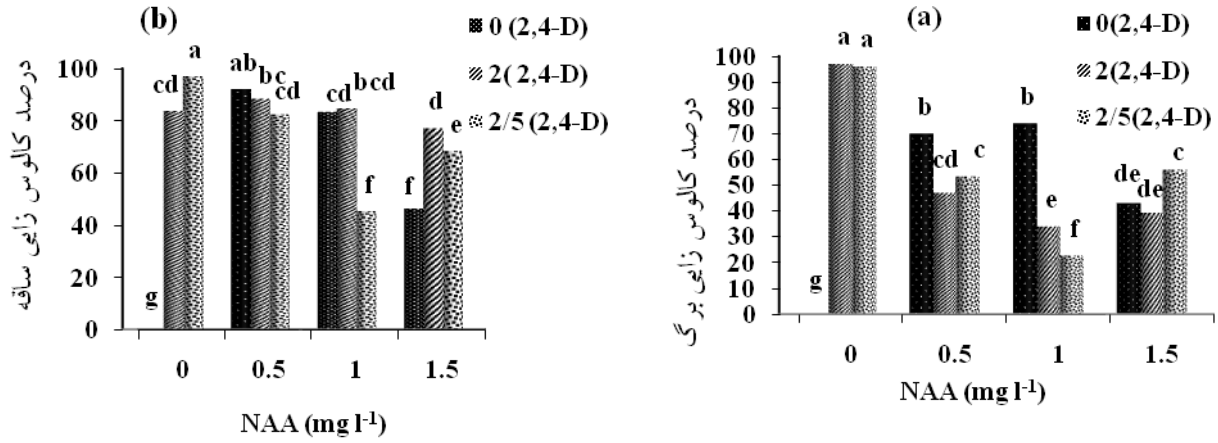
(b) (a)

شکل ١- کالوس‌های حاصل از کشت ریز نمونه‌های برگ(a) و ساقه (b)

جدول ١- تجزیه واریانس صفت کالوس‌زایی در کشت ریز نمونه های برگ و ساقه در غلظت‌های مختلف NAA و 2,4 -D.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کالوس‌زایی برگ (٠/٠)	کالوس‌زایی ساقه (٠/٠)
2,4-D	٢	٠/١٢٤**	٠/٣٧٧**
NAA	٣	٠/١٣٢**	٠/١٩١ **
NAA × 2,4-D	٦	٠/٦٦٣**	٠/٤٨٤**
خطا	٢٤	٠/٠٠٥	٠/٠٠٥
CV	-	١٣/٥	١٠/١

؛ معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد.



شکل ٢- مقایسه میانگین برهمکنش غلظت‌های مختلف هورمون NAA و 2,4-D برای کالوس‌زایی ریز نمونه‌های برگ (a) و ساقه (b) گیاه به لیمو

درون سیتوپلاسم برای هورمون هستند. هورمون‌ها با این جایگاه‌ها بر هم کنش کرده و تعداد گیرنده‌ها در سطح بافت هدف، نوع پاسخ را تعیین می‌کند (Binh *et al.*, 1986). به نظر می‌رسد تعداد زیاد گیرنده‌های هورمون ٢و٤- دی کلروفنوکسی استیک اسید در ریز نمونه‌های برگ و ساقه گیاه به لیمو، موجب کالوس‌زایی بیشتر در این ریز نمونه‌ها نسبت به تیمارهای هورمونی دیگر شده است.

پس از بررسی آماری و تجزیه واریانس (جدول٢)، نتایج

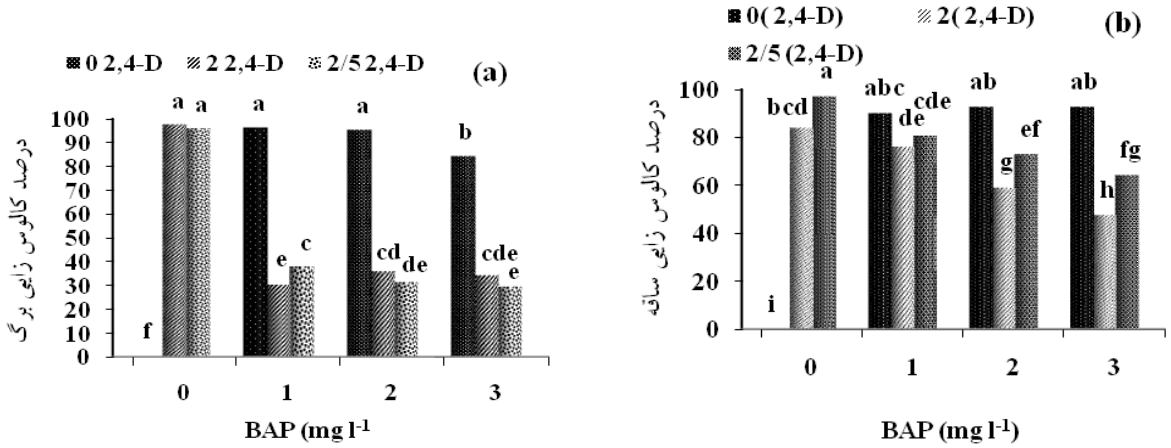
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]

جدول ۲- تجزیه واریانس صفت کالوس‌زایی در کشت ریز نمونه های برگ و ساقه در غلظت‌های مختلفBAP و 2,4 -D.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کالوس‌زایی برگ (۰/۰)	کالوس‌زایی ساقه (۰/۰)
2,4-D	۲	۰/۱٦٤**	۰/۰۸۹**
BAP	۳	۰/۰۵۷ **	۰/۰۹٦**
BAP × 2,4-D	٦	۱/۰۷۳**	۰/٦۳۹**
خطا	۲٤	۰/۰۰٤	۰/۰۰۸
CV	-	۱۱/٤	۱۲/۵

****؛ معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.**



شکل ۳- مقایسه میانگین برهمکنش غلظت‌های مختلف هورمون BAP و 2,4-D برای ریز نمونه‌های برگ (a) و ساقه (b) گیاه به لیمو

نـشـان داد اثر سـاده هورمون‌های BAP و 2,4-D و همچنین برهمکنش آن‌ها برای صفت کالوس‌زایی، بسیار معنی‌دار است (P< ۰/۰ ۱).

مطابق شکل (۳-a)، اثرات این هورمون‌ها بر کالوس‌زایی ریز نمونه برگ نشان داد تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر BAP و سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بالاترین (۹۷ درصد) کالوس‌زایی را داشته است و با تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر BAP و سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۹٦ درصد) و همچنین با تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سطح یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و تیمار در سطح صفر میلی گرم در لیتر 2,4-D و سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (به ترتیب با ۹٦/۳۳ درصد و ۹۵/۳۳ درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفته است. کمترین کالوس‌زایی در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۳۰/۳۳ درصد) مشاهده شد و با تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۳۱/٤ درصد)، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (به ترتیب با ۳٤/۲۳ درصد و ۲۹/٤ درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفت.

با توجه به شکل ۳-b، بالاترین میزان کالوس‌زایی در ریز نمونه ساقه در تیمار با سطح صفر میلی‌گرم در لیتر BAP و سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۹۷ درصد) مشاهده شد و با تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سطح یک میلی‌گرم در لیتر BAP (۹۰ درصد)، تیمار در سطح صفر میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۹۲/٦٦ درصد) و تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP (۹۲/٦٦ درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفت و کمترین میزان کالوس‌زایی در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی BAP+Kin و BAP+NAA بر درصد باززایی گیاه به لیمو.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۱۷	۰/۱۶۵**
خطا	۱۸	۰/۰۰۸
CV	-	٤٦

****؛ معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.**



شکل ٤- تولید اندام هوایی گیاه به لیمو از کالوس در محیط MS حاوی تیمار هورمونی BAP در ترکیب با Kin.

ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (٤٧/٥٦ درصد) مشاهده شد.

غلظتی که در آن بیشترین کالوس‌زایی صورت می‌گیرد، بسته به نوع گونه گیاهی و نوع ریز نمونه متفاوت است (Tang and Zhou, 2003) ضمن اینکه افزایش هورمون تا غلظتی مشخص، موجب افزایش کالوس‌زایی می‌شود و افزایش آن از یک حد بهینه در محیط کشت اثر ممانعت کننده‌ای بر روی هورمون‌های داخلی ریز نمونه می‌گذارد و باعث کاهش تولید کالوس می‌گردد (Dixon and Gonzales, 2004) که نتیجه این پژوهش با آن، در مورد تیمار در سطح صفر میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و همچنین با تیمار در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریز نمونه برگ مطابقت دارد.

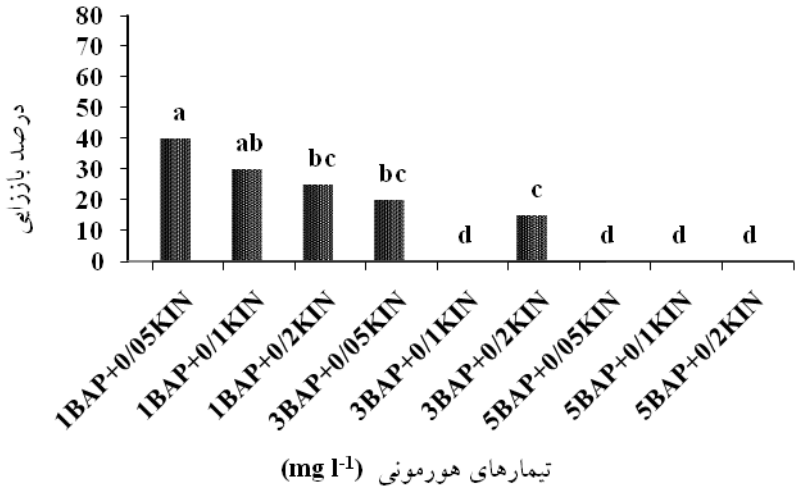
پس از کالوس‌زایی، محیط کشت حاوی ترکیب‌های مختلف هورمونی تهیه شد، بخشی از کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌های برگ و ساقه جهت باززایی به این محیط‌ها منتقل و بخش دیگر کالوس‌ها برای ادامه پژوهش، واکشت شدند. پس از گذشت ٤ هفته از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، اولین علائم تولید اندام هوایی و ریشه‌دهی مشاهده شد.

جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد، اثر ترکیب هورمونی BAP و Kin و همچنین ترکیب هورمونی BAP و NAAبر باززایی گیاه به لیمو در سطح یک درصد معنی‌دار است. در ترکیب هورمونی BAP و کاینتین، تنها اندام هوایی به وجود آمد (شکل ٤).

بیشترین درصد باززایی (٤٠ درصد) در تیمار هورمونی BAP با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin مشاهده شد و با تیمار هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ۳۰Kin (درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفت و از میان تیمارهای باززایی شده، کمترین درصد باززایی در تیمار هورمونی BAP با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر و Kin با غلظت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]



شکل ۵- مقایسه میانگین برهمکنش غلظت‌های مختلف هورمون BAP و Kin از نظر میزان باززایی گیاه دارویی به لیمو.

۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید (۱۵ درصد) و با تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در ترکیب با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin و همچنین تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر Kin (به ترتیب با ۲۰ و ۲۵ درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفتند (شکل۵).

محققان نشان دادند کاربرد هم زمان سیتوکینین‌ها در باززایی اوکالیپتوس موثر است به نحوی که محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین رشد طولی و شاخه‌زایی را داشت و همچنین بیان کردند که با کاهش غلظت BAP درصد باززایی افزایش یافت (عصاره و قربانلی، ۱۳۸۳) که با نتایج این پژوهش مشابه است به طوری که در غلظت‌های ثابت و مشابه از هورمون کایتین، بیشترین میزان تولید اندام هوایی مربوط به غلظت‌های کمتر از هورمون BAP مشاهده شد.

بر اساس برخی گزارش‌ها BAP به عنوان موثرترین سیتوکینین مورد استفاده در شاخه‌زایی بسیاری از گیاهان معرفی شده و Kin از نظر اهمیت در درجه دوم قرار دارد (Coumans *et al*., 1982). از آنجا که در این پژوهش هورمون‌های BAP و Kin در غلظت‌های کم‌تر (تیمار هورمونی BAP با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کایتین)، موجب بالاترین میزان تولید اندام هوایی شد، بنابراین استفاده از غلظت‌های پایین آن‌ها جهت صرفه‌جویی در هزینه به منظور باززایی باززایی نیز توصیه می‌شود. در ترکیب هورمونی BAP و NAA علاوه بر تولید اندام هوایی، ریشه‌زایی نیز مشاهده شد (شکل ٦).

بیشترین درصد باززایی (٤٠ درصد) در تیمار هورمونی BAP به میزان یک میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با NAA به میزان ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر ثبت گردید و با تیمار BAP به میزان یک میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA(۳۰ درصد) در یک کلاس آماری قرار گرفت (شکل ۷).

در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر NAA تنها ریشه‌زایی مشاهده شد. اما در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۰۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اندام هوایی به همراه ریشه مشاهده شد. سیتوکینین‌ها به منظور تحریک شاخه‌زایی، در ترکیب با اکسین ها به کار می‌روند. توازن بین اکسین و سیتوکینین به طور نرمال، بیشترین میزان اندام‌زایی را ایجاد می‌کند (George and Hall., 2008).

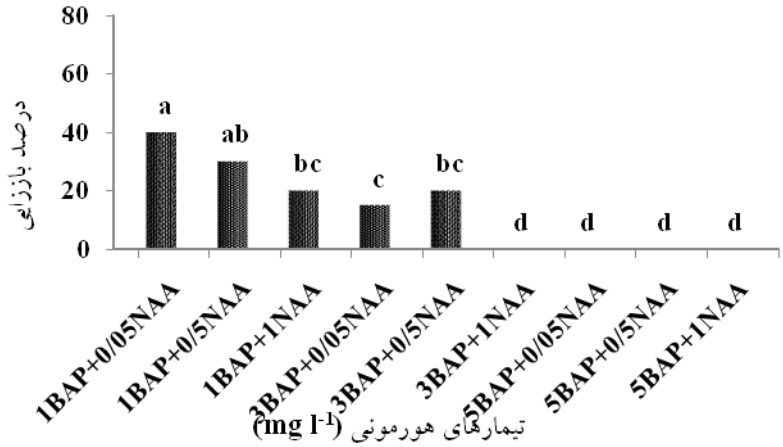
در پژوهشی بیشترین تولید شاخساره در آرتمیزیا با استفاده از ترکیب BAP به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA به میزان یک میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (Chensho *et al*., 2003) اما نسبت بالاتر از هورمون سیتوکینین نسبت به اکسین در پژوهش ما بیشترین میزان اندام هوایی را تولید کرد.

در این پژوهش، با افزایش غلظت BAP به میزان شیشه‌ای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]



شکل ٦- تولید اندام هوایی و ریشه گیاه به لیمو از کالوس در محیط MS حاوی تیمار هورمونی BAP در ترکیب با NAA.



شکل ۷- مقایسه میانگین برهمکنش غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA از نظر میزان باززایی گیاه دارویی به لیمو.

شدن گیاهچه‌ها و بافت کالوس‌های کشت شده در محیط باززایی افزوده شد که با نتایج محققان دیگر (Keverse and Gaspar, 1987) مشابه بود.

نتیجه‌گیری کلی:

یافته‌های این پژوهش نشان داد، ریز ازدیادی گیاه به لیمو در شرایط کشت درون شیشه‌ای امکان پذیر است. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، می‌توان با استفاده از مناسب‌ترین تیمارهای تعیین شده برای کالوس‌زایی و باززایی، از آنها جهت ادامه تحقیقات در رابطه با کشت بافت گیاه به لیمو از جمله دست‌یابی به ترکیبات مختلف موجود در اسانس برگ‌ها و کالوس‌های این گیاه و نیز تنوع سوماکلونال حاصل از کشت بافت، جهت گزینش گیاهان با عملکرد بالای ماده مؤثره مورد استفاده قرار داد.

منابع:

اولادزاد، ا.، قادری، ا.، نقدی‌آبادی، ح. و زارع کاریزی، ا. (۱۳۹۱) تکثیر سریع گیاه دارویی به‌لیمو از طریق کشت درون شیشه‌ای.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]

فصلنامه گیاهان دارویی ٤٢: ١٥٣-١٤٥.

راشدی، ل. (١٣٨٠) داروخانه سنتی. انتشارات نبوغ، تهران.

زرگری، ع. (١٣٧١) گیاهان دارویی. مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه تهران.

عصاره، م.، قربانلی، م.، اکبری خباز، م.، قمری زارع، ع. و امام، م. (١٣٨٦) ریزازدیادی، ارگانزایی و استفاده از روش‌های نوین شبه فتواتوتوروفیک در اوکالیپتوس. مجله پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی ٧٥: ١٣٥- ١٤٥.

Binh, D. Q., Gyulai, L. E., and Csillage, A. (1989) Plant regeneration from callus culture of Puccinella distance Plant cell. Journal of Tissue and Organ Culture 18: 195-200.

Chensho, A., Wang, X., Yuan, X. and Zhao, B. (2003) Optimization of cryopreservation of *Artemisia annua*. Journal of Biotechnology 25: 35-38.

Coumans, M., Coumans-Gilles, M. F., Menard, D. and Kevers, C. (1982) Micropropagation of sugarbeet. Intl Cong Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo.

Dixon, R. A. and Gonzales, R. A. (1994) Plant cell Culture. Oxford Unversity Press, UK.

George, E. F. and Hall, M. (2008) Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics, Basingstoke, UK.

Gruenwald, J. and Brendler, T. (2004) PDR for Herbal Medicines. Thompson PDR, Montvale.

Juliani, H. and Koroch, A. (2000) Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold) Tronc. Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59: 175–179.

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

Mosavi, A. (2012) The optimization of lemon verbena (*Lippia citriodora*) medicinal plant tissue culture. International journal of Agronomy and Plant Production 3: 561-565.

Tang, G. X. and Zhou, W. J. (2003) Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oil seed Brassica Spp. Journal of Agronomy and Crop Sciences 189: 351-358.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]

The optimization of callus induction and regeneration in medicinal lemon verbena (*Lippia citriodora*) plant

Hojat Taheri Aziz Abadi, Nad Ali Bagheri* and Nad Ali Babaeian Jelodar

Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Received: 11 October 2015, Accepted: 30 December 2015)

Abstract

This study was conducted to evaluate the effects of different types of growth regulators and their interaction on callus induction and lemon regeneration in *Lippia citriodora*, using Murashige and Skoog (MS) medium. The callus induction experiment with leaf and stem explants was arranged in a factorial layout based on a completely randomized design. The experiment of lemon regeneration was performed in a completely randomized design as well. To evaluate of callus induction, combination of *2*, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) with 6-Benzylaminopurin (BAP) and with Naphthalene Acetic Acid (NAA) were applied. In regeneration study, combination of BAP with Kinetin (Kin) and with NAA were used. The effects of these plant growth regulators on callus induction of leaf explant showed that treatment of 0 mg L^{-1} NAA and 2.0 mg L^{-1} 2, 4-D had the highest (97%) rate of callus induction. The highest percentage of callus formation was observed in stem explant at 0 mg L^{-1} NAA and 2.5 mg L^{-1} 2, 4-D (97%) treatment. Callus induction in MS medium without plant growth regulator was not observed for leaf and stem explants. The highest percentage of shoot production (40%) occurred in 1.0 mg L^{-1} BAP + 0.05 mg L^{-1} Kin and the highest percentage of root production (40%) occurred when combined plant growth regulator of 1.0 mg L^{-1} BAP + 0.05 mg L^{-1} NAA was used.

According to these results, by using the medium containing the hormones BAP, 2,4-D, NAA and Kin, in vitro culture of the *L. citriodora* can be used to fast and easy propagation of lemon.

Key words: Regeneration, Lemon verbena, Callus induction, Explant, Plant growth regulator.

*corresponding author, Email: b_r5415@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.20.7]