تعیین بهترین ترکیب ضد میکروبی و بهترین هورمون جهت استقرار ریز نمونه‌های آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)

زینب محکمی[1*]، علی میرشکار[2]، فهیمه محمدی[3]

۱- مربی پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳- مربی دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور زابل

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش:۹۴/۰۹/۲۹

چکیده

در کشت بافت گیاهان دارویی، موفقیت در بهینه‌سازی محیط کشت در مرحله‌ی استقرار، ادامه‌ی کشت برای پرآوری نمونه‌ها را تضمین می‌کند و حضور هورمون جهت استقرار ریز نمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آن‌ها ضروری است. این تحقیق با هدف تعیین بهترین ترکیب ضدعفونی‌کننده‌ی ریزنمونه‌ها و بهترین هورمون، جهت استقرار ریزنمونه‌های آویشن دنایی در محیط درون شیشه‌ای در سال ۱۳۹۲ انجام شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای آب مقطر استریل، نانوسیلور (۱۰۰٪ غلظت تجاری)، اسانس آویشن دنایی (۲۵٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪) و هیپوکلریت سدیم ۲٪ جهت ضدعفونی ریزنمونه‌ها و محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ $mg.l^{-1}$) و ۲ و ۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ $mg.l^{-1}$) برای تعین بهترین ترکیب هورمونی جهت استقرار و رشد ریزنمونه‌ها در چهار تکرار اجرا گردید. نتایج این آزمایش نشان داد، بیشترین آلودگی و کمترین رشد ریزنمونه آویشن دنایی مربوط به آب مقطر استریل (شاهد) و کمترین آلودگی و بیشترین رشد مربوط به هیپوکلریت سدیم ۲٪ بود و تیمارهای ۲۵٪ و ۵۰٪ اسانس آویشن دنایی باعث رشد ۷۰ درصدی ریزنمونه‌ها شدند. کاربرد توأم ۰/۵ بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲ و ۴- دی‌کلروفنوکسی-استیک اسید منجر به افزایش تعداد ریشه، تعداد شاخساره، طول ریشه و طول ساقه شد. همچنین، کاربرد یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و عدم استفاده از ۲ و ۴- دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید باعث افزایش کالوس‌زایی، وزن‌تر و وزن خشک کالوس شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی نشان دادند، غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین در کشت ریزنمونه‌ها مطلوب‌ترین نتیجه را به همراه داشت همچنین هیپوکلریت سدیم بهترین تیمار برای گندزدایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت بود.

واژگان کلیدی: بنزیل‌آمینوپورین، ۲ و ۴- دی کلروفنوکسی‌استیک اسید، ریزازدیادی، گیاهان دارویی، نانوسیلور

*نویسنده مسئول: (Email): zaynabmohkami@uoz.ac.ir

مقدمه

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در تولید ترکیبات مؤثره مورد نیاز جهت صنایع داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی و همچنین رویکرد جهانی به‌خصوص کشورهای پیشرفته به استفاده از داروهای گیاهی به‌جای داروهای شیمیایی، لزوم تحقیق بیشتر در مورد جنبه‌های مختلف تولید این گیاهان ارزشمند احساس می‌شود. یکی از گیاهان مهم دارویی، آویشن دنایی با نام علمی *Thymus daenensis* Celak. از خانواده‌ی Lamiaceae است. آویشن دنایی، گیاهی علفی، چندساله، دارای ساقه‌های متعدد و پرپشت به ارتفاع ۳۰-۲۵ سانتیمتر، برگ‌های متقابل و کوچک و گل‌هایی به رنگ سفید مایل به ارغوانی یا بنفش و مجتمع در کنار برگ‌ها می‌باشد (Amin, 2002). اسانس این گیاه اهمیت ویژه‌ای در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی دارد. از مهم‌ترین اجزاء گزارش شده در اسانس آویشن دنایی، تیمول (۷۰ درصد) می‌باشد (Jamshidi *et al.*, 2006). همچنین در تحقیقی دیگر تیمول (۷۳/۹ درصد) و کارواکرول (۶/۷ درصد) گزارش شده است (Sajjadi and Khatamsaz, 2003). خواص انواع آویشن مربوط به دو ترکیب تیمول و کارواکرول در اسانس آن است. اسانس گل و برگ‌های آویشن دارای اثر ضد اسپاسم، ضد نفخ، ضد رماتیسم، ضد سیاتیک و ضدعفونی‌کننده‌ی قوی است (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2010b). در حال حاضر صنایع داروسازی تعدادی از کشورهای غربی از مواد مؤثره‌ی این گیاه، داروهای متعددی ساخته و به بازار دارویی عرضه می‌کنند. با توجه به اهمیت تولید گیاه دارویی آویشن دنایی، لزوم اجرای یک مدیریت صحیح در تولید مواد گیاهی عاری از آلودگی ضروری به نظر می‌رسد. تهیه‌ی مواد گیاهی سالم به عنوان پایه‌های مادری جهت ازدیاد گیاه مادری مؤثرترین روش می‌باشد که به این منظور از شیوه‌هایی نظیر کشت بافت استفاده می‌گردد. با عنایت به موارد فوق، تکنیک کشت بافت طی چند دهه‌ی گذشته به‌عنوان ابزاری کارآمد در ریزازدیادی، تکثیر، اصلاح و تولید گیاهان در شرایط کنترل شده‌ی درون شیشه‌ای در مراکز تحقیقاتی سراسر دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از روش کشت بافت می‌توان افزونگری هم‌گروه‌ها را با سرعتی زیاد و در مدتی کوتاه انجام داد و گیاهانی دارای فرآورده‌های ثانویه یکسان و زیاد به دست آورد. افزون بر آن، کشت بافت گیاهی نیاز به قرنطینه‌ی گیاه را از بین می‌برد که خود عاملی در صرفه‌جویی زمان می‌باشد. همچنین با توجه به اهمیت فرآورده‌های ثانویه در گیاهان دارویی در صورت شناسایی یک تک گیاه با میزان فرآورده‌های ثانویه بالا می‌توان آن‌را با سرعت و به تعداد زیاد و بدون تغییر در ژنوتیپ افزود (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2010b).

معمولاً چهار مرحله جهت ازدیاد درون شیشه‌ای گیاهان مورد توجه واقع می‌شود که شامل استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ایجاد اولین شاخساره‌ها و پرآوری، تکثیر انبوه شاخساره از طریق بازکشت‌های متوالی و در نهایت ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده و سازگار کردن آن‌ها با شرایط بیرون و انتقال به محیط گلخانه می‌باشد (Chee and Pool, 1985).

موفقیت در بهینه‌سازی محیط کشت در مرحله استقرار و به دست آوردن حتی یک گیاهچه کافی است که بتوان همین گیاهچه سالم را با سایر روش‌های متداول کشت بافت به‌راحتی ازدیاد کرد (Pati *et al.*, 2010).

رشد و تمایز ریز نمونه‌ها در محیط کشت تحت کنترل هورمونی است و حضور هورمون جهت استقرار ریز نمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آن‌ها ضروری است (Yew *et al*., 2010).

نتایج سایر تحقیقات نشان داد که ترکیبات هورمونی مانند سایتوکنین‌ها به‌تنهایی یا همراه با اکسین، در غلظت‌های مختلف بر استقرار ریز نمونه‌ها مؤثر است (Kebeli *et al*., 1995; Gomes *et al*., 2004; Szegedi, 1995)؛ بنابراین تعیین بهترین ترکیب ضد میکروبی جهت ضدعفونی ریزنمونه‌ها و بهترین هورمون جهت استقرار و رشد ریز نمونه‌ها هدف اصلی این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها

الف: تهیه‌ی بذر

بذرهای گیاه دارویی آویشن دنایی، از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و در این آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

ب: تهیه اسانس و سایر تیمارهای آزمایش ضد میکروبی

جهت تهیه اسانس آویشن دنایی، قسمت هوایی گیاه در فاز گلدهی از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل واقع در چاه نیمه بقیه اله الاعظم (عج) جمع‌آوری و در شرایط دمای معمولی اتاق و سایه خشک گردید. نمونه‌های گیاهی به‌وسیله آسیاب الکتریکی خرد شدند. سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت استخراج گردید. اسانس‌ها که به دمای بالا حساس هستند، توسط فیلترهای سرسرنگی با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون تهیه شده از شرکت پارسیان زیست استریل و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از استریل کردن محیط کشت، اسانس‌ها در زیر دستگاه لامینارفلو[1] با استفاده از فیلترهای غشایی به محیط کشت اضافه شد. نانو ذرات نقره (نانوسیلور) از شرکت پیشگامان نانو مواد (با خلوص ۹۹ درصد) خریداری گردید.

ج: تعیین اثر ضدمیکروبی

جهت تهیه‌ی ریز نمونه‌ی غیر آلوده، بذرها در شرایط محیط MS کشت شدند. برای این منظور جهت سترون کردن بذرهای گیاه پس از شستشو با آب مقطر، در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شده و در نهایت سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در تیمارهای آب مقطر استریل، نانوسیلور خالص (۱۰۰٪ غلظت تجاری)، اسانس آویشن دنایی (۲۵٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪) و هیپوکلریت سدیم (۲٪) برای ضدعفونی قرار گرفتند. در پایان بذرها، با آب مقطر استریل سه بار با فواصل زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه آبکشی شدند. بذرهای آماده شده در زیر لامینارفلو به‌دقت در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS استقرار یافتند (Hosseini Beheshti and Khoshkhoy, 2005). محیط‌های کشت قبل از استفاده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند. پس از کشت بذر، هر یک از ظرف‌ها با استفاده از پارافیلم پوشانده شده و در اتاقک‌های رشد با میانگین دمای ۱± ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. این آزمایش به‌صورت طرح کامل تصادفی با شش تیمار، چهار تکرار و ۱۰ نمونه در هر تکرار انجام شد. ارزیابی صفاتی نظیر درصد آلودگی و

[1] - Laminar flow

درصد رشد پس از گذشت یک ماه صورت گرفت (شکل ۳-B).

چ: تعیین بهترین هورمون جهت استقرار و رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت

این آزمایش با هدف بررسی اثر نوع ترکیب هورمونی، جهت استقرار ریزنمونه‌های تک گره ساقه حاصل از گیاهان رشد یافته‌ی مرحله‌ی اول به‌صورت فاکتوریل با ۱۶ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ نمونه در هر تکرار انجام شد. تیمارهای این آزمایش شامل (A): غلظت‌های مختلف بنزیل آمینوپورین[1] (در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ $mg.l^{-1}$)؛ (B): غلظت‌های مختلف ۲ و ۴- دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید[2] (در چهار سطح ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ $mg.l^{-1}$) و همچنین اثرات متقابل این دو تیمار (A*B) بود که محیط‌های کشت مختلف عبارت بودند از:

M1= MS+ BAP 0 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0 $mg.l^{-1}$
M2= MS+ BAP 0 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0.5 $mg.l^{-1}$
M3= MS+ BAP 0 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 1 $mg.l^{-1}$
M4= MS+ BAP 0 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 2 $mg.l^{-1}$
M5= MS+ BAP 0/5 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0 $mg.l^{-1}$
M6= MS+ BAP 0/5 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0.5 $mg.l^{-1}$
M7= MS+ BAP 0/5 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 1 $mg.l^{-1}$
M8= MS+ BAP 0/5 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 2 $mg.l^{-1}$
M9= MS+ BAP 1 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0 $mg.l^{-1}$
M10= MS+ BAP 1 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0.5 $mg.l^{-1}$
M11= MS+ BAP 1 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 1 $mg.l^{-1}$
M12= MS+ BAP 1 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 2 $mg.l^{-1}$
M13= MS+ BAP 2 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0 $mg.l^{-1}$
M14= MS+ BAP 2 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 0.5 $mg.l^{-1}$
M15= MS+ BAP 2 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 1 $mg.l^{-1}$
M16= MS+ BAP 2 $mg.l^{-1}$ +2, 4-D 2 $mg.l^{-1}$

ارزیابی صفات پس از گذشت یک ماه صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی عبارت بودند از: تعداد ریشه، طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک گیاه و تعداد شاخساره (شکل‌های ۳-A، B، C، D و E). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. در نهایت گیاهچه‌های دارای شاخساره و برگ‌های مطلوب و ریشه‌های قوی، حاصل از این آزمایش از ظروف کشت بیرون آورده شدند و ریشه‌ها با دقت توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا بقایای محیط کشت جدا شود. در ادامه پس از سپری شدن دو هفته، به منظور استقرار گیاهان در محیط آزاد هر یک از گیاهچه‌ها به داخل گلدان‌های کوچک حاوی پرلیت منتقل گردیدند. در طول دو هفته‌ی اول، همه گلدان‌ها توسط مه‌افشان آبیاری شدند.

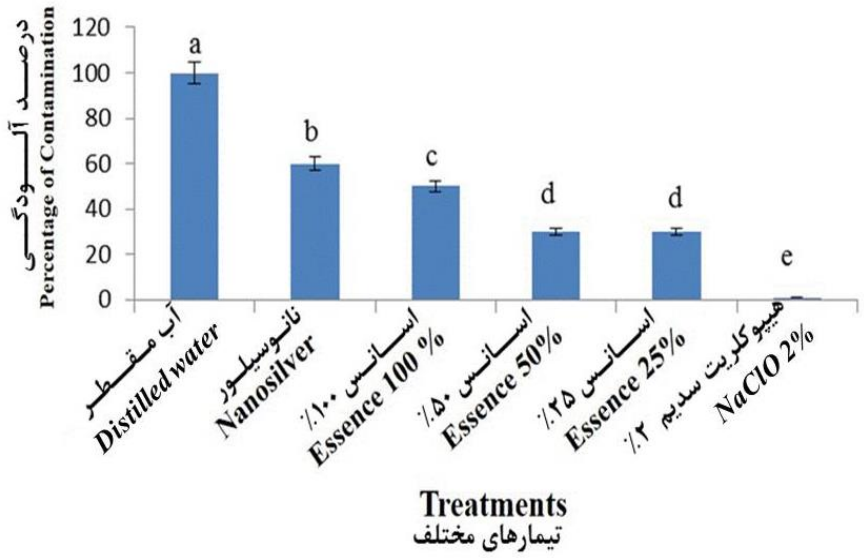
نتایج و بحث

نتایج آزمایش ضد میکروبی

نتایج مربوط به تعیین بهترین ترکیب ضد میکروبی جهت ضد عفونی ریزنمونه‌های آویشن دنایی نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر درصد آلودگی و درصد رشد در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد مشخص شد، بیشترین درصد آلودگی و کمترین درصد رشد مربوط به آب مقطر بود. کاربرد سایر تیمارها منجر به کاهش درصد آلودگی شد به‌طوری‌که کمترین درصد آلودگی مربوط به هیپوکلریت‌سدیم ۲ درصد بود (شکل ۱ و ۲).

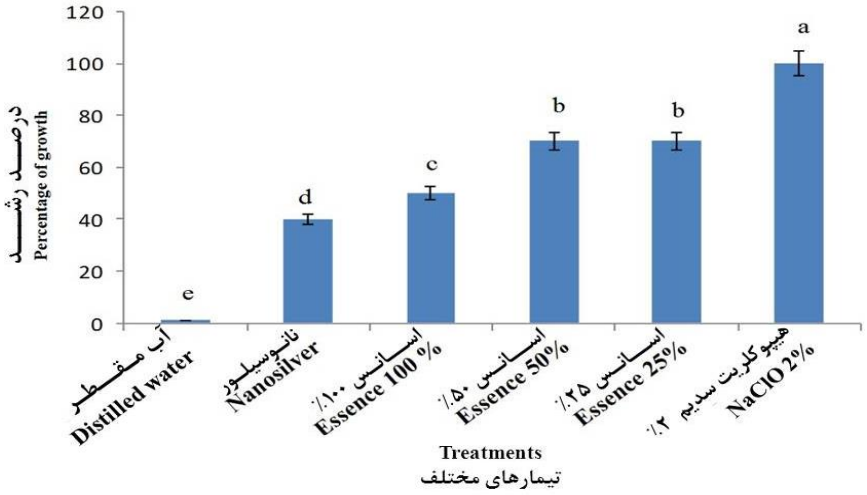
طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس، غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین (BAP) بر طول ساقه، تعداد شاخساره، وزن تر گیاه، وزن خشک گیاه و تعداد ریشه تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲).

---
[1] - 6- Benzylaminopurine
[2] - 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid



شکل ۱- بررسی درصد آلودگی ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف

Figure 1- Percentage of contamination of explants on different treatments



شکل ۲- بررسی درصد رشد ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف

Figure 2- Percentage of growth of explants on different treatments

کاربرد BAP تأثیری بر طول ریشه نداشت. کاربرد 2,4-D بر تمامی صفات مورد بررسی در این آزمایش، در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت. بررسی اثر متقابل BAP × 2,4-D بر تمامی صفات به‌جز طول ریشه و وزن خشک گیاه معنی‌دار بود (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین اثر متقابل BAP و 2,4-D مشخص گردید، بیشترین طول ساقه مربوط به کاربرد ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم استفاده از 2,4-D بود. در کاربرد همزمان غلظت‌های مختلف BAP و 2,4-D رشد طولی آویشن دنایی مشاهده نگردید. کاربرد BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخساره را دارا بود

(شکل ۳). استفاده از غلظت‌های دیگر منجر به کاهش تعداد شاخساره شد و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در بررسی اثر متقابل BAP و 2,4-D مشخص شد، بیشترین تعداد شاخساره مربوط به کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم استفاده از 2,4-D (غلظت صفر) بود. استفاده از سایر غلظت‌های BAP و 2,4-D منجر به کاهش تعداد شاخساره شد. در بررسی اثر متقابل BAP و 2,4-D مشخص شد، بیشترین وزن‌تر گیاه مربوط به کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم استفاده از 2,4-D (غلظت صفر) بود. استفاده از سایر غلظت‌های BAP و 2,4-D منجر به کاهش وزن‌تر گیاه شد، به‌طوری‌که کمترین وزن‌تر گیاه در شرایط استفاده از 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و عدم کاربرد BAP مشاهده گردید. در بررسی اثر متقابل BAP و 2,4-D مشخص شد، بیشترین وزن خشک گیاه مربوط به کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و استفاده از 2,4-D با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. کمترین وزن خشک گیاه در شرایط استفاده از 2,4-D با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و عدم کاربرد BAP مشاهده گردید. بیشترین طول ریشه مربوط به کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم استفاده از 2,4-D بود، همچنین تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری با آن نداشت. استفاده از سایر تیمارها منجر به کاهش طول ریشه شد. بیشترین تعداد ریشه مربوط به کاربرد غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم استفاده از 2,4-D بود. کاربرد سایر غلظت‌های BAP و 2,4-D منجر به کاهش قابل‌توجه تعداد ریشه‌ها شد (جداول ۲،۳ و ۴).

در این پژوهش مشاهده گردید که گندزدایی توسط هیپوکلریت سدیم دو درصد بهترین تیمار برای گندزدایی بود و هیچ‌گونه آلودگی باکتریایی مشاهده نشد (شکل ۳-B).

نخزری مقدم و همکاران (Nakhzari Moghaddam *et al*., 2012)، گزارش نمودند که کاربرد اسانس‌ها می‌تواند به‌عنوان روش عملی برای حذف آلودگی در محیط کشت گیاهی قلمداد شود. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که با افزایش غلظت اسانس آویشن در محیط کشت MS، میزان بازدارندگی رشد باکتری *Lactobacillus* sp. افزایش یافت به‌طوری‌که غلظت ۴۰۰ پی پی ام در ۰/۲-۰/۱: A و غلظت ۷۰۰ پی پی ام در ۲: A در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور کامل اثر بازدارندگی داشتند که همان‌طور که در نتایج آزمایش ما نیز مشاهده گردید کاربرد اسانس آویشن دنایی نسبت به تیمار شاهد (آب مقطر) اثر بازدارندگی قوی بر کاهش درصد آلودگی دارد.

ژنگ و فنگ (Zheng and Feng, 2007) اثر ضدمیکروبی اسانس پنج گیاه دارویی را روی *Alternaria alternata* در شرایط درون شیشه‌ای بررسی نمودند. نتایج آزمایش آن‌ها حاکی از آن بود که اسانس آویشن و کاسیا هر دو اثرات بازدارندگی قوی بر این قارچ داشتند.

مبشری و همکاران (Mobbasheri *et al*., 2013)، تیمارهای مختلف را بر گندزدایی سطحی بذر گیاه دارویی گشنیز (*Corianderum sativum* L.) در شرایط درون شیشه‌ای بررسی نمودند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که کاربرد هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۵ دقیقه بهترین اثر را در کاهش آلودگی داشت و تیمار شاهد (آب مقطر) بالاترین درصد آلودگی (۹۴٪) را نشان داد که با نتایج آزمایش ما مطابقت داشت.

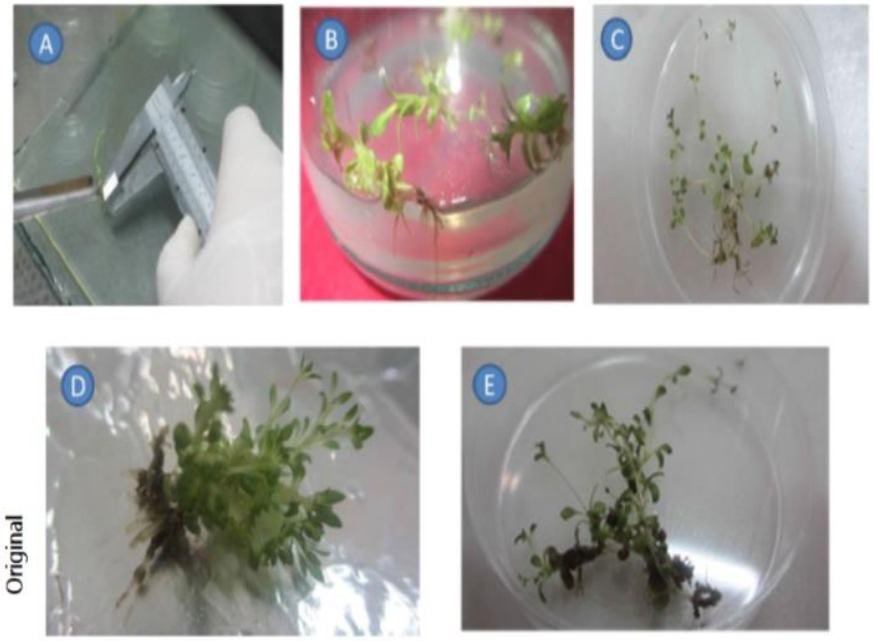
با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش کاربرد هورمون‌های مختلف در محیط کشت مشاهده شد که در شرایطی که از هورمون BAP (غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد، بهترین نتایج در رابطه با رشد ریزنمونه‌ها بدست آمد؛ نتایج تحقیق ما با نتایج آزمایش‌های عصاره و همکاران (Assare *et al.*, 2007) در مورد کشت بافت سه ژنوتیپ برگزیده در گل محمدی مطابقت داشت، به‌طوری‌که در تحقیق آن‌ها نیز بیشترین ضریب ازدیاد و رشد طولی در محیط کشت MS حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید.

در تحقیقی دیگر کاربرد بنزیل‌آمینوپورین و نوع محیط کشت بر رشد و شاخه‌زایی گیاه نیشکر بررسی شد. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که گیاهچه‌ها از نظر شاخص‌های ریزازدیادی در غلظت‌های مختلف هورمون BAP دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. تعداد جوانه‌ها، وزن تر، وزن خشک و همچنین نرخ تکثیر در دو محیط کشت جامد و مایع با غلظت ۳ میلی‌گرم لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود که با نتایج ما پیرامون تأثیر مثبت محیط کشت حاوی BAP بر ریز-ازدیادی آویشن دنایی مطابقت دارد. به نظر می‌رسد افزایش میزان تقسیم سلولی القاء شده با BAP و توزیع بهتر هورمون‌ها و مواد غذایی و عدم تجمع مواد سمی در سطح ریشه در گیاهک‌های تولید شده در محیط کشت مایع می‌تواند علت افزایش شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده در این آزمایش باشد آقائی و همکاران (Aghayi *et al.*, 2014) گزارش کردند، کاربرد هورمون 2,4-D منجر به کاهش و یا عدم رشد ریز نمونه‌ها شد. اصولاً کمتر پدیده‌ای را در گیاه می‌توان نام برد که هورمون‌ها در تنظیم آن نقش اساسی نداشته باشند. سیتوکینین‌ها در تقسیم سلولی و تحریک رشد در جوانه‌های جانبی، مهار رشد و مهار پیری دخالت دارند. اگرچه نوع و غلظت این تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در القاء اندام‌زایی نیز نقش به-سزایی دارد (Sanchez-Gras, 1996; Benkova *et al.*, 1999). تمایزیابی ریزنمونه‌های آویشن به‌وسیله تغییر در میزان هورمون‌ها تنظیم می‌گردد. به نظر می‌رسد پدیده‌ی مرفوژنوز که شامل دو مرحله تمایزیابی[1] و طویل شدن[2] است، تحت تأثیر هورمون‌ها قرار می‌گیرد ولی فعالیت تمایزیابی حتماً منجر به طویل شدن و رشد سلولی نمی‌شود، به‌طوری‌که غلظت‌های مختلف BAP در این آزمایش منجر به تولید تعداد و طول ریشه متفاوتی شد ولی از نظر وزن‌تر، بیشترین وزن‌تر و خشک مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود (Ishioka and Tanimoto, 1993). از طرفی با توجه به رقابت شدیدتر ریشه‌ها در محیط کشت بافت، رقابت بین ریشه‌ها بر سر به دست آوردن مواد غذایی سبب می‌گردد تا تیماری که دارای ریشه بیشتری است، وزن بیشتری را نیز تولید کند. تحقیقات نشان داده است سرعت رشد کالوس‌ها و تولید ساقه و برگ‌ها در گونه‌های مختلف اسطوخودوس به نوع و تراکم سیتوکینین استفاده شده، بستگی دارد (Calvo and Segura, 1989; Dronne *et al.*, 1999). در پژوهش انجام شده ریز نمونه‌هایی که در محیط کشت بدون BAP و IBA قرار داده شدند، ریشه ایجاد نکردند و یا تعداد ریشه بسیار کم و ریشه‌های بسیار نازک ایجاد نمودند که به‌احتمال در اثر اکسین‌های طبیعی و درونی گیاه بود.

---

[1] - Differentiation
[2] - Elongation

به‌طورکلی، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اگرچه کاربرد اسانس‌ها می‌تواند به‌عنوان روش عملی برای حذف آلودگی در محیط کشت گیاهی قلمداد شود، اما همچنان گندزدایی توسط هیپوکلریت سدیم بهترین نتیجه را در پی داشت و بهترین فاکتورهای ریزازدیادی آویشن دنایی نیز در محیط کشت MS حاوی هورمون BAP (غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید که مبین اثر مثبت این هورمون در القاء تقسیم سلولی و پرآوری گیاهان در محیط درون شیشه‌ای می‌باشد.



شکل ۳- تصاویر کشت بافت آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)؛ A: اندازه‌گیری طول ساقه و طول ریشه به کمک کولیس دیجیتال، B: بررسی وضعیت آلودگی گیاهان در آزمایش ضد میکروبی، C: بررسی رشد طولی ساقه ، D: بررسی وزن تر گیاه آویشن دنایی ، E: بررسی تعداد شاخساره گیاه

Figure 3– Photos of Deanaie thyme tissue plant culture, A: Measurement of root and stem length by digital caliper, B: Study of contamination in plant antimicrobial tests, C: Study on growth of stem length, D: Study on plant fresh weight, E: Study on number of root

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه

Table 1- Analysis of variance of the studied traits

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی d.F	میانگین مربعات Mean of square					
		طول ساقه Shoot length (cm)	تعداد شاخساره Number of shoot	وزن تر گیاه Plant Fresh weight (gr)	وزن خشک گیاه Plant dry weight (gr)	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ریشه Number of root
BAP (A)	3	10.53**	8.86**	0.04**	0.01**	0.42 ns	76.57**
2,4-D (B)	3	1096.35**	239.28**	0.01**	0.01**	209.77**	5333.02**
A × B	9	10.53**	8.86**	0.02**	0.003 ns	0.42 ns	76.57**
Error	48	0.74	0.49	0.001	0.002	0.25	10.31
ضریب تغییرات ٪ C.V	-	20.91	16.53	12.42	23.50	27.91	15.18

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and ** : no significant, significant at the 5% and 1% levels of probability respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر بنزیل آدنین پورین بر صفات مورد ارزیابی آویشن

Table 2- Mean comparison of the effect of different concentrations of BAP on studied traits of *Thymus*

BAP (mg.l^{-1})	طول ساقه Shoot length (cm)	تعداد شاخساره Number of shoot	وزن تر گیاه Plant Fresh weight (gr)	وزن خشک گیاه Plant dry weight (gr)	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ریشه Number of root
0	2.92 b	1.36 b	0.20 d	0.16 b	1.87 a	6.18 b
0.5 mg/l	4.60 a	1.65 b	0.27 b	0.20 a	1.67 a	9.43 a
1 mg/l	4.60 a	1.69 b	0.24 c	0.15 b	1.67 a	9.43 a
2 mg/l	4.41 a	3.02 a	0.32 a	0.20 a	2.01 a	11.47 a

در هر ستون میانگین دارای حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن ندارند.

In each column, means with the similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's test

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر 2,4-D بر صفات مورد ارزیابی آویشن

Table 3- Mean comparison of the effect of different concentrations of 2,4-D on studied traits of *Thymus*

2,4-D (mg.l^{-1})	طول ساقه Shoot length (cm)	تعداد شاخساره Number of shoot	وزن تر گیاه Plant Fresh weight (gr)	وزن خشک گیاه Plant dry weight (gr)	طول ریشه Root length (cm)	تعداد ریشه Number of root
0	16.55 a	7.73 a	0.22 c	0.18 b	7.24 a	36.51 a
0.5 mg/l	0.01 b	0.01b	0.25 b	0.21 a	0.01 b	0.01 b
1 mg/l	0.01 b	0.01 b	0.29 a	0.16 b	0.01 b	0.01 b
2 mg/l	0.01 b	0.01 b	0.28 a	0.16 b	0.01 b	0.01 b

در هر ستون میانگین دارای حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن ندارند.

In each column, means with the similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's test

جدول ۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف BAP و 2,4-D بر صفات مورد بررسی آویشن

Table 4- Effect of combination of 2,4-D and BAP on all studied traits of *Thymus*

2,4-D (mg.l^{-1})	BAP (mg.l^{-1})	تعداد ریشه Number of root	طول ریشه Root length (cm)	وزن خشک گیاه Plant dry weight (gr)	وزن تر گیاه Plant Fresh weight (gr)	تعداد شاخساره Number of shoot	طول ساقه Shoot length (cm)
0	0	11.72 b	5.44 c	0.08 h	0.17 ab	7.51 a	24.73 c
	0.5 mg/l	18.42 a	6.61 b	0.17 g	0.15 b	6.70 b	37.72 b
	1 mg/l	18.42 a	6.77 b	0.17 g	0.15 b	6.70 b	37.72 b
	2 mg/l	17.68 a	12.11 a	0.45 a	0.24 a	8.04 a	45.89 a
0.5 mg/l	0	0.01 c	0.01 d	0.21 fg	0.18 ab	0.01 c	0.01 d
	0.5 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.27 bcde	0.24 a	0.01 c	0.01 d
	1 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.24 ef	0.18 ab	0.01 c	0.01 d
	2 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.27 cde	0.23 a	0.01 c	0.01 d
1 mg/l	0	0.01 c	0.01 d	0.00 i	0.00 c	0.01 c	0.01 d
	0.5 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.31 bc	0.19 ab	0.01 c	0.01 d
	1 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.00 i	0.01 c	0.01 c	0.01 d
	2 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.31 bcd	0.18 ab	0.01 c	0.01 d
2 mg/l	0	0.01 c	0.01 d	0.26 def	0.14 b	0.01c	0.01 d
	0.5 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.32 b	0.20 ab	0.01 c	0.01 d
	1 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.28 bcde	0.14 b	0.01 c	0.01 d
	2 mg/l	0.01 c	0.01 d	0.26 cde	0.15 b	0.01 c	0.01 d

در هر ستون میانگین دارای حروف لاتین مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن ندارند.

In each column, means with the similar letters are not significantly different at 1% level of probability using Duncan's test

References: **فهرست منابع:**

Aghayi, K., Rostami, s. and Davoodi, D. 2014. Effect of Benzylaminopurine and media type on growth and propagation of Sugarcane in vitro. "*international symposium of medicinal plants and sustainable agricultural*". December, 6-10, 2014, Hamedan, Iran, PP: 1-9. (In Persian)

Amin, Gh.R. 2002. The most popular traditional medicinal plants of Iran. Tehran University of Medical Sciences and Health Services. (In Persian)

Assareh, M., Ghamari Zarea, A., Ghorbanli M., Alahverdi Mamaghani, B. and Shahrzad, Sh. 2007. Evaluation of the micropropagation of three genotypes favorites Rose (*Rosa damscena* Mill.). *Research and development in agriculture and horticulture*,76:1-10. (In Persian)

Benkova, E., Witters, E., Van Dongen, W., Kola, J., Motyka, V., Brzobohaty, B., Van Onckelen, H.A. and Machakova, I. 1999. Cytokinins in Tobacco and Wheat chloroplasts. Occurrence and Changes Due to Light/Dark Treatment. *Plant Physiology*, 121(1): 245-252.

Calvo, M.C. and Segura, J. 1989. *In vitro* propagation of *Lavender*, *HortScience* 24 (2): 375-376.

Chee, R. and Pool, R.M. 1985. *In vitro* propagation of *vitis*: The effects of organic substances on shoot multiplication. *Vitis*, 24: 106-118.

Dronne, S., Jullien, F., Caissard, G.C. and Faure, O. 1999. A simple and efficient method for in vitro shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula××intermedia Emeric ex Loiseleur*), *Plant Cell Reports*, 18(5): 429-433.

Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Enteshari, S., Yousefi, M., Momtaz, H. and Hamedi, B. 2010b. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by Bakhtiari tribal in Southwest Iran. *International Journal of Biology*, 2:55-63.

Gomes, S., Periera, A.M. and Pinto-Carnide, O. 2004. Effects of culture medium on meristem differentiation and plant regeneration in *Vitis vinifera* L. *Acta Horticulture*, 652: 425-432

Hosseyni Beheshti, B. and Khoshkhoy, M. The effects of media and growth regulators on micropropagation of garden Thyme. *Journal of Horticultural Science and Technology of Iran*, 6(2):61-68. (In Persian)

Ishioka, N. and Tanimoto, S. 1993. Changes in proteins during bulblet differentiation in *Lilium longiflonm* Bulletin of the faculty of Agriculture, Saga University, 74:107-113.

Jamshidi, M., Amin Zadeh, M., Azarnivand, H. and Abedi, M. 2006. The effect of altitude on the quantity and quality of thyme essential oil. *Journal of Medicinal Plants*,18:17-22. (In Persian)

Kebeli, N., Boz, Y. and Gursoy, Y.Z. 1995. The research on the propagation with meristem culture of elite vine material from clonal selection studies. *Viticulture Research Institute.*

Mobbasheri, M., Mobbasheri S., Sadeghi, A. and Sajjadi, S.R. 2013. Check the seed surface disinfection treatment of the Coriander (*Corianderum sativum* L.) in the glassy conditions. *National Conference on Medicinal Plants*, July, 22, 2013, Amol, Iran, Islamic Azad University, Science and Research Ayatollah Amelie. (In Persian)

Nakhzari Moghaddam, M.R., Sabbagh, K. and Mobasser, H.R. 2012. The effect of thyme essential oil to eliminate bacterial contamination in plant tissue culture. Lactobacillus sp. "Iran's third national *conference on agricultural biotechnology* (plant, animal and industrial)". September, 1, 2012, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, PP:1-5. (In Persian)

Pati, P.K., Kaur, J. and Singh, P. 2010. A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10: 1-9.

Sanchez-Gras, M.C. and Del Carmen Calvo, M. 1996. Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45:259- 261.

Sajjadi, S.E. and Khatamsaz, M. 2003. Composition of the essential oil of *Thymus daenensis* Celak. Subsp. *lancifolius* (Cleak.) Jalas. *Journal of Essential Oil Research*, 15:34-35.

Szegedi, E. 1995. A review of the use of thermotherapy in viticulture to eliminate pathogens and pests from propagating material. *Pesticide Science*, 45:282-286.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Heuckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceeding of the National Acadamy of Sciences*, USA, 38: 13386 - 91.

Yew, C.K., Balakrishnan, B., Sundasekaran, J. and Subramaniam, S. 2010. The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24): 2641-2646.

Determination of th best cultural sterilization compound and the best hormone for establishment of explants of *Thymus daenensis* Celak.

Zaynab Mohkami[1*], Ali Mirshekar[2], Fahimeh Mohammadi[3]

1- Lecturer, Institute of Agricultural Research, University of Zabol

2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol

3- Lecturer, Department of Agriculture, Payame noor University of Zabol

Received: 2015/03/08 Accepted: 2015/12/20

Abstract

Success in optimization of the culture during the establishment stage guarantees continuous cultivation and multiplication of the samples. The presence of hormones is vital for establishment of the explants and their optimal numerical growth. This research was conducted to determine the best disinfective combination of the explants and to choose the most suitable hormone for establishment of the *Thymus daenensis* explants in vitro during 2013. This factorial experiment was performed in a completely randomly design with the following treatments in four replications: distilled water, nano-silver (100% commercial concentration), essential oil of Deanaie thyme (20%, 50% and 100%), and 2% NaClO (Clorox). The results showed that the highest rate of contamination and the lowest rate of explants' growth in this plant were correlated to sterile distilled water (Control) and the lowest and the highest rates of infection were related to NaClO (2%) whereas the 25% and 50% treatments of Deaneries thyme resulted in 70% growth of the explants. Combined treatment of 0.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l 2, 4-Declorophenoxi acetic led to an increase in number of roots, number of shoots, length of root, and length of stem. Moreover, using 1 mg/l BAP instead of using 2,4D increased callus formation, and wet and dry weights of callus. Analysis of variance and of comparison means of the studied traits showed 2 mg/l BAP in the culture explants yielded desirable results and NaClO was the best combination for disinfection of explants *in vitro*.

Key words: BAP, 2,4-D, Medicinal plant, Micro propagation, Nano-silver

* Corresponding Author Email: zaynabmohkami@uoz.ac.ir