

تکثیر سریع گیاه دارویی به لیمو از طریق کشت درون شیشه‌ای (*Lippia citriodora* L.)

آتنا اولادزاد^۱، اردشیر قادری^۲، حسنعلی نقدبادی^۳، امیررضا زارع کاریزی^{۱*}

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

۲- عضو هیأت علمی، گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

۳- دانشیار، گروه پژوهشی کشت و توسعه گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

*آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۳۶۹ - ۳۱۳۷۵

تلفن: ۰۰۲۶ (۳۴۷۶۴۰۲۱)، نمبر: ۰۰۲۶ (۳۴۷۶۴۰۱۰)

پست الکترونیک: amirrzare@gmail.com

تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۹

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۴

چکیده

مقدمه: جنس *Lippia* دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که در این بین گونه *Lippia citriodora* L. دارای ارزش بالای دارویی می‌باشد و تکثیر سریع و گستردگی آن به روش‌های نوین جهت گسترش سطح زیرکشت از ارزش بالای برخوردار است.

هدف: تحقیق حاضر به منظور ارائه یک روش سریع و کارآمد برای تکثیر این گونه دارویی برای اولین بار در یک حجم بزرگ با استفاده از قطعات گرهای در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شده است.

روش بررسی: قطعات گرهای حاوی ۱ تا ۲ جوانه جانی به منظور ریازدیادی نوساقها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA و BAP کشت شدند. ریشه‌زایی در محیط‌های کشت حاوی هورمون‌های NAA، IBA و ذغال فعال بررسی و سازگاری در گلستانهای پلاستیکی کوچک حاوی مخلوط پرلیت، ورمی کولیت و خاک زراعی انجام شد.

نتایج: بیشترین تعداد ساخه‌ها در تیمار هورمونی حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA و بیشترین فراوانی ریشه در تیمار هورمونی حاوی IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۲ گرم در لیتر ذغال فعال به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به امکان تکثیر سریع و آسان گیاه به لیمو در محیط‌های حاوی هورمون‌های BAP و IBA و ترتیب در غلظت‌های ۳ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌توان روش کشت درون شیشه‌ای را به عنوان روشی سریع و ارزان جایگزین روش‌های رایج تکثیر گیاه دارویی به لیمو نمود.

گل واژگان: به لیمو، کشت درون شیشه‌ای، NAA، IBA، BAP



مقدمه

سریع و اقتصادی به لیمو است. به عبارت دیگر، روش‌هایی موردنیاز است تا بتوان در مدت زمان کوتاه، تعداد زیادی گیاهچه تولید نمود. از دیاد به لیمو از طریق بذر به دلیل وجود پدیده دگرگشته و تفرقه ژنتیکی صفات در نتاج، مورد توجه نمی‌باشد [۸]. از این رو تکثیر گیاه به لیمو با استفاده از کشت بافت راه حل کارآمد و مفید برای غلبه بر مشکلات تکثیر آن می‌باشد. با استفاده از کشت درون شیشه‌ای می‌توان نسبت به تولید انبوه و عاری از آلودگی گیاه به لیمو اقدام نمود. همچنین اولین گام در اصلاح ژنتیکی با استفاده از روش‌های ملکولی، تولید متابولیت‌های ثانویه در بیوراکتورها و افزایش میزان ماده مؤثره به وسیله تکنیک‌های بیوتکنولوژیکی بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه می‌باشد. با توجه به اهمیت گیاه به لیمو در صنایع مختلف بهینه‌سازی کشت بافت آن به عنوان گام نخست در بهبود و افزایش تولید متابولیت ثانویه این گیاه حائز اهمیت می‌باشد.

علی‌رغم اهمیت این جنس و به خصوص گونه با ارزش *L. citriodora* مطالعات بیوتکنولوژیک (کشت بافت، کشت سوسپانسیون و انتقال ژن) اندکی روی آنها انجام شده و در منابع علمی معتبر گزارش‌های کمی در این رابطه موجود است. گوپتا و همکاران (۲۰۰۱) اثر تنظیم‌کننده‌های رشد را بر ریزازدیادی گونه *Lippia alba* بررسی نمودند و بیشترین تعداد نوساقه‌ها را در محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آورند [۹]. همچنین در تحقیقی بر روی گونه *Lippia junelliana* اثر BAP در غلاظت ۴/۴ میکرومولار به تنهایی و یا در ترکیب با ۰/۰۴ میکرومولار IBA بر ریزازدیادی این گیاه بررسی شد [۱۰]. در مطالعه‌ای دیگر اثر هورمون‌های BAP و NAA بر تکثیر و ریشه‌زایی گیاه دارویی و در حال انقراض *Lippia filifolia* بررسی شد. نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی ۴/۵ میکرومولار BAP به همراه

به لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* L. درختچه‌ای است خزان‌پذیر از خانواده شاپیسته (Verbenaceae) است که ارتفاع آن به ۳ تا ۵ متر می‌رسد [۱]. برگ‌های این گیاه به صورت کشیده و به رنگ سبز کمرنگ به صورت دسته‌های سه تایی بر روی ساقه قرار می‌گیرند. جنس *Lippia* دارای بیش از ۲۰۰ گونه است که در این بین، گونه *L. citriodora* دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. به لیمو گیاهی بومی کشورهای آمریکای جنوبی (شیلی و پرو) است که به طور وسیع در باغ‌های کشورهای اروپایی کشت می‌شود [۲]. امروزه این گیاه در شمال کشورمان کشت و کار می‌شود و گونه‌های بومی‌ای نیز از جنس *Lippia* در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشورمان وجود دارد [۳]. برگ‌ها و اندام رویشی این گیاه دارای خاصیت تبربر، مسکن، ضدنفخ و کمک‌کننده به هضم غذا می‌باشد. چای به لیمو فوق العاده آرام‌بخش و تسکین‌دهنده اعصاب است [۴,۵,۶].

تکثیر به لیمو به وسیله قلمه‌زن شاخه‌ها و یا خوابانیدن آنها در زمینه‌ای قابل نفوذ و مرطوب در فصل بهار صورت می‌گیرد [۷]. البته با استفاده از این روش، تعداد محدودی گیاه با توجه به حجم خزانه در دسترس و همچنین تعداد پایه‌های مادری اولیه تولید می‌شود. از آنجایی که در کشور پتانسیل زیادی برای تولید گیاهچه‌های به لیمو وجود دارد، با تکثیر سریع و گسترش سطح زیر کشت آن می‌توان تحولی اقتصادی در صنعت این گیاه دارویی ایجاد نمود. زیرا این محصول یکی از محصولات نوین در عرصه کشاورزی ایران است که مصرف آن به میزان فزاینده‌ای در جامعه در حال گسترش است. یکی از راه‌کارهای تولید تجاری و همچنین افزایش عملکرد اندام دارویی گیاه به لیمو، افزایش سطح زیر کشت آن می‌باشد که مستلزم تکثیر



به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس ظروف کشت به اتاق رشد در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد با فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی متغیر شدند. واکست در فواصل زمانی هر ۴ هفته انجام و ۲۱ روز پس از واکشت دوم، درصد نوشاخه های ایجاد شده، تعداد و طول نوشاخه ها بررسی شدند.

ریشه زایی و سازگاری

نوشاخه های به دست آمده از مرحله تکثیر که دارای طول ۱۰ - ۸ سانتی متر بودند به منظور ریشه زایی به محیط های کشت حاوی هورمون های IBA و NAA در غلظت های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر هر یک به تهیی و یا در ترکیب با ۲ گرم در لیتر ذغال فعال متغیر شدند. دما و شرایط محیط های کشت کاملاً شیبیه به مرحله تکثیر بود. چهار هفته بعد از کشت درصد ریشه زایی نوشاخه ها و تعداد ریشه های تولید شده در هر ریزنمونه بررسی شد. به منظور سازگاری گیاهچه ها ابتدا گیاهان از آگار خارج شده و پس از شستشوی کامل در زیر آب و لم در گلدان های کوچکی که با ترکیبی از پرلیت، ورمی کولیت و خاک زراعی با نسبت ۱:۱:۱ پر شده بود وارد شدند. گلدان ها با آب معمولی مه پاشی می شدند. سپس برای حفظ حداقل رطوبت، روی گلدان ها را با سرپوش پلاستیکی پوشانده و گیاهان به ژرمنیاتور در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد متغیر شدند. جهت انجام سازگاری تدریجی و به منظور تهیی بهتر هر چند ساعت یک بار گیاهچه ها مورد مه پاشی قرار می گرفتند. پس از دو هفته، چند منفذ کوچک روی سرپوش ها ایجاد و در هفته چهارم سرپوش ها به طور کامل برداشته شد و گیاهان سازگار شده به گلخانه متغیر شدند.

آنالیز داده ها و محاسبات آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و در هر تکرار

۵ نانو مولار NAA بیشترین درصد نوشاخه ها را القاء نموده است [۱۱]. مطالعه حاضر برای اولین بار یک روش سریع، ساده و کارآمد برای تکثیر گونه با ارزش L. *citriodora* گرهای (Nodal Segments) در شرایط کشت درون شیشه ای را ارائه می دهد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

سرشاخه های گیاه دارویی به لیمو به طول ۱۵ - ۱۰ سانتی متر در اوایل اردیبهشت از پایه های مادری ۲ ساله واقع در گلخانه های تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیی شد. پس از انتقال سرشاخه ها به آزمایشگاه ابتدا برگ ها جدا شدند و سپس شاخه ها به قطعات گرهای که حاوی ۱ - ۱ جوانه جانبی بودند بریده شدند. به منظور سترون سازی، ابتدا ریزنمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری به همراه مایع ظرفشویی شستشو شدند. سپس در زیر لامینار ایرفلو ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه با الكل ۷۰ درصد و سپس با محلول هیپوکلرید سدیم ۱ درصد حاوی ۲ - ۲ قطره تویین ۲۰ به مدت ۲۵ دقیقه استریل شدند. در نهایت ریزنمونه ها به وسیله آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند.

محیط تکثیر و شرایط کشت

قطعات گرهای حاوی ۱ - ۱ جوانه جانبی به منظور تکثیر نوشاخه (Shoot) در محیط کشت (MS Murashige and Skoog) حاوی ۰/۵، ۱، ۰/۵ و ۴ میلی گرم در لیتر هورمون BAP به تهیی و یا در ترکیب با ۰/۱، ۰/۵ و ۰ میلی گرم در لیتر هورمون ABA یا ۰/۱ گرم در لیتر ذغال فعال کشت شدند. به تمامی محیط های کشت ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر شکر افزوده شد. pH محیط ها در ۵/۸ تنظیم شد و محیط ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در فشار ۱/۲ بار



هormونی ۱ - ۰ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم IBA ریشه‌زایی مشاهد شد. به منظور ریشه‌زایی نوساقه‌های با طول ۱۲ - ۱۰ سانتی‌متر، به محیط‌های حاوی اکسین‌های IBA و NAA به تنها ی و یا در ترکیب با ذغال فعال انتقال داده شدند. اولین نشانه‌های تشکیل ریشه ۲ هفته پس از کشت در تیمار هورمونی حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. با این حال با گذشت ۴ هفته از کشت در تمامی تیمارهای هورمونی ریشه تشکیل شد. افزایش غلظت IBA افزایش معنی‌دار در ریشه‌زایی را NAA به همراه داشت. برخلاف آن افزایش غلظت باعث کاهش ریشه‌زایی شد. به نظر می‌رسد که در این تیمارها تشکیل کالوس در انتهای بريده شده نوساقه باعث کاهش ریشه‌زایی شده است. افزودن ذغال فعال به محیط‌های حاوی IBA و NAA به طور معنی‌داری باعث افزایش ریشه‌زایی شد (جدول شماره ۲). چنان‌که مشاهده می‌شود بیشترین فراوانی ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) و طول ریشه ۶/۱ سانتی‌متر) در تیمار هورمون حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر ذغال فعال به دست آمد (شکل شماره ۲-الف).

گیاهانی که ریشه و ساقه‌های آنها به خوبی گسترش یافته بود به منظور سازگاری از آگار خارج شده و به گلدان‌های پلاستیکی کوچک حاوی پرلیت، ورمی کولیت و خاک زراعی انتقال یافتند. تعدادی از این گیاهان بر اثر خشک شدن سریع و پوسیدگی از بین رفتند. با این حال گیاهان با نرخ زنده مانی حدود ۸۵ درصد به شرایط محیطی سازگار شدند (شکل شماره ۲-ب).

۱۰ ریز نمونه قرار داشت. به منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار 2.10 MSTAT-C Version و از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

طی دو تا سه هفته پس از کشت، در همه تیمارها به جز محیط کشت پایه MS، نوشاخه‌ها بر روی ریزنمونه‌ها تشکیل و مشاهده شد. با این حال نتایج نشان داد که در تعداد شاخه و همچنین طول شاخه‌ها، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف وجود دارد (جدول شماره ۱). افزایش غلظت BAP به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد نوساقه‌ها شد، به طوری که بیشترین تعداد شاخه‌ها در تیمار هورمونی حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمد (شکل شماره ۱-الف). در تمامی محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر ABA، در انتهای بريده شده ریزنمونه‌ها، کالوس نیز مشاهده شد.

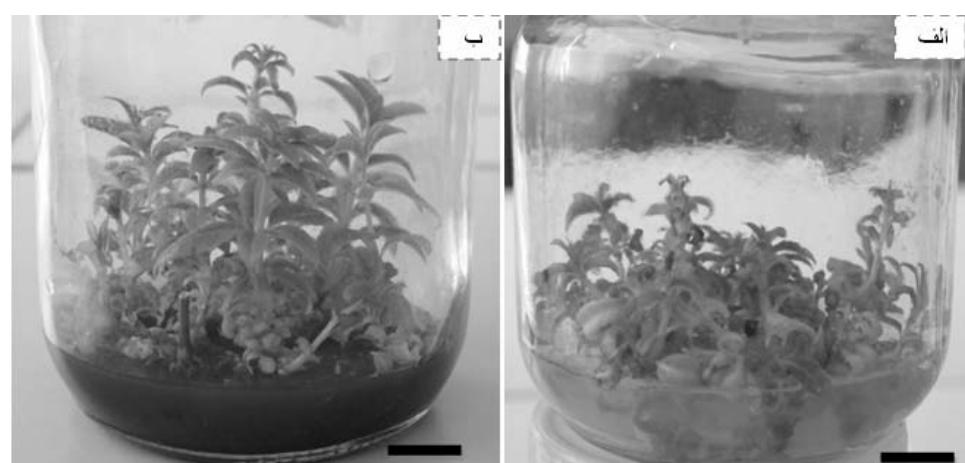
در بسیاری از تیمارهای هورمونی ۴ هفته پس از کشت، گیاهان شروع به زرد شدن و ریزش برگ می‌کردند. بنابراین به تمامی تیمارها ۱ میلی گرم در لیتر ذغال فعال افزوده شد. در مقایسه با محیط‌های فاقد ذغال فعال، افزودن ذغال فعال به محیط‌های کشت باعث کاهش تعداد شاخه‌ها شد اما طول شاخه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت. لازم به ذکر است که بیشترین طول گیاهچه در تیمار هورمونی حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA به دست آمده است (جدول شماره ۱). همچنین، در محیط‌های حاوی ذغال فعال به خصوص در تیمارهای



جدول شماره ۱- اثر غلظت‌های مختلف BAP به تنهایی و یا در ترکیب با IBA و ذغال فعال بر تعداد و طول نوساقه‌ها در گیاه دارویی به لیمو ۲۱ روز پس از واکشت دوم

شماره	تنظیم کننده‌های رشد (mgL ⁻¹)	ذغال فعال (grL ⁻¹)	طول نوساقه‌ها (cm)	تعداد نوساقه‌ها	شماره	تنظیم کننده‌های رشد (mgL ⁻¹)	ذغال فعال (grL ⁻¹)	طول نوساقه‌ها (cm)	تعداد نوساقه‌ها
	IBA	BAP				IBA	BAP		
۱	۰/۰ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۰ ± ۰/۰۰ ^۱	۱	۰	۱۹	۰ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۰± ۰/۰۰ ^۱	۰	۰
۲	۴/۰ ± ۰/۲۰ ^g	۱/۰ ± ۰/۲۵ ^k	۱	۰/۱	۲۰	۱/۱ ± ۰/۲۷ ^{op}	۱/۰± ۰/۰۰ ^k	۰	۰/۱
۳	۳/۲ ± ۰/۴۴ ^h	۱/۰ ± ۰/۰۰ ^k	۱	۰/۵	۲۱	۲/۲ ± ۰/۲۰ ^{jk}	۱/۰± ۰/۸۷ ^k	۰	۰/۵
۴	۴/۵± ۰/۰۰ ^f	۱/۴± ۰/۱۰ ^{ij}	۱	۰	۲۲	۲/۹ ± ۰/۲۰ ^g	۱/۲ ± ۰/۲۰ ^{jk}	۰	۰/۵
۵	۴/۱ ± ۰/۱۰ ^g	۱/۷ ± ۰/۱۰ ^{hi}	۱	۰/۱	۲۳	۴/۱ ± ۰/۱۰ ^g	۱/۶± ۰/۱۰ ^{ij}	۰	۰/۱
۶	۴/۶ ± ۰/۱۰ ^f	۲/۰ ± ۰/۱۵ ^h	۱	۰/۵	۲۴	۴/۶ ± ۰/۱۰ ^f	۱/۵ ± ۰/۲۰ ^{ij}	۰	۰/۵
۷	۷/۱ ± ۰/۱۰ ^d	۲/۱ ± ۰/۱۰ ^h	۱	۰	۲۵	۲/۰ ± ۰/۲۵ ^{kl}	۲/۱ ± ۰/۲۰ ^h	۰	۱
۸	۷/۰ ± ۰/۲۰ ^b	۲/۹ ± ۰/۱۰ ^f	۱	۰/۱	۲۶	۲/۴ ± ۰/۲۶ ^{ij}	۲/۵ ± ۰/۲۲ ^g	۰	۰/۱
۹	۸/۴± ۰/۳۰ ^a	۲/۸ ± ۰/۱۰ ^{fg}	۱	۰/۵	۲۷	۲/۶ ± ۰/۲۷ ⁱ	۳/۰ ± ۰/۲۰ ^f	۰	۰/۵
۱۰	۷/۲± ۰/۳۰ ^d	۳/۰± ۰/۰۵ ^f	۱	۰	۲۸	۱/۳ ± ۰/۲۶ ^{no}	۴/۰ ± ۰/۰۰ ^{de}	۰	۲
۱۱	۷/۷± ۰/۱۰ ^c	۳/۱± ۰/۲۲ ^f	۱	۰/۱	۲۹	۱/۸ ± ۰/۲۰ ^{lm}	۴/۳ ± ۰/۴۰ ^d	۰	۰/۱
۱۲	۷/۱± ۰/۲۰ ^b	۳/۷± ۰/۱۰ ^e	۱	۰/۵	۳۰	۱/۶ ± ۰/۱۰ ^{mn}	۴/۷ ± ۰/۱۰ ^c	۰	۰/۵
۱۳	۵/۲± ۰/۱۰ ^e	۴/۰± ۰/۰۵ ^{de}	۱	۰	۳۱	۱/۰ ± ۰/۳۳ ^{mn}	۵/۰ ± ۰/۰۰ ^{bc}	۰	۳
۱۴	۵/۹ ± ۰/۱۰ ^d	۴/۱± ۰/۱۰ ^d	۱	۰/۱	۳۲	۱/۹ ± ۰/۱۰ ^{k-m}	۵/۷ ± ۰/۱۰ ^a	۰	۰/۱
۱۵	۵/۴± ۰/۲۰ ^e	۴/۸± ۰/۱۵ ^c	۱	۰/۵	۳۳	۱/۰ ± ۰/۰۰ ^{op}	۵/۲ ± ۰/۱۰ ^b	۰	۰/۵
۱۶	۲/۱± ۰/۱۰ ^{j-l}	۳/۱± ۰/۱۰ ^f	۱	۰	۳۴	۰/۸ ± ۰/۲ ^p	۳/۲ ± ۰/۱۰ ^f	۰	۴
۱۷	۳/۰± ۰/۱۰ ^h	۴/۰± ۰/۱۰ ^{de}	۱	۰/۱	۳۵	۱/۱ ± ۰/۰۰ ^{op}	۳/۶ ± ۰/۱۰ ^e	۰	۰/۱
۱۸	۳/۸± ۰/۱۰ ^g	۳/۲± ۰/۱۰ ^f	۱	۰/۵	۳۶	۱/۳ ± ۰/۱۷ ^{no}	۴/۰ ± ۰/۲۰ ^{de}	۰	۰/۵

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانگر وجود تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.



شکل شماره ۱- ریازدیدادی گیاه به لیمو. ۱- الف- نوساقه‌های ایجاد شده در تیمار هورمونی حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۰ میلی گرم در لیتر IBA یک ماه پس از کشت. ۲- ب- نوساقه‌های کشت شده در محیط‌های دارای ذغال فعال (مقیاس = ۱ سانتی‌متر)





شکل شماره ۲- ریشه‌زایی و سازگاری گیاه به لیمو. -الف- مقایسه ریشه‌زایی در تیمار هورمونی حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ میلی گرم در لیتر ذغال فعال با تیمار محیط کشت پایه MS بدون ذغال فعال، چهار هفته پس از کشت. -ب- گیاهچه‌های سازگار شده به لیمو در شرایط برونزی شیشه‌ای (مقیاس = ۲ سانتی‌متر).

جدول شماره ۲- اثرات غلظت‌های مختلف IBA و NAA به تنهایی و یا در ترکیب با ذغال فعال بر درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها چهار هفته بعد از کشت.

تنظیم کننده‌های رشد (سانتی‌متر)	درصد ریشه‌زایی (گرم در لیتر)	ذغال فعال		طول ریشه (سانتی‌متر)
		NAA	IBA	
۲/۴ ^h	۵۰/۰ ⁱ	•	•	
۳/۹ ^d	۶۴/۰ ^{gh}	•	۰/۱	
۵/۰ ^b	۷۱/۰ ^f	•	۰/۵	
۴/۰ ^d	۸۹/۰ ^b	•	۱	
۲/۷ ^g	۶۱/۰ ^h	۰/۱	•	
۳/۱ ^f	۷۰/۰ ^f	۰/۵	•	
۳/۹ ^d	۵۲/۰ ⁱ	۱	•	
۳/۰ ^f	۶۱/۰ ^h	۲	•	
۴/۶ ^c	۷۲/۰ ^{ef}	۲	•	۰/۱
۶/۱ ^a	۱۰۰/۰ ^a	۲	•	۰/۵
۴/۹ ^b	۸۵/۰ ^c	۲	•	۱
۳/۶ ^e	۶۵/۰ ^g	۲	۰/۱	•
۴/۰ ^d	۸۲/۰ ^{ad}	۲	۰/۵	•
۴/۱ ^d	۷۵/۰ ^e	۲	۱	•

حروف غیر مشابه در هر ستون نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

بحث

روز از کشت، کاملاً سالم و سبز بودند (شکل شماره ۱-ب). در حالی که نوساقه‌های کشت شده در محیط بدون ذغال فعال پس از ۲۰ روز شروع به زرد شدن و ریزش برگ کردند. از لحاظ مورفولوژیکی نیز گیاهان کشت شده در محیط دارای ذغال فعال دارای ظاهری کاملاً طبیعی بودند در حالی که در محیط‌های فقد ذغال فعال برگ‌های نوساقه‌ها کوچک و ظاهری شیشه‌ای پیدا کرده بودند (شکل شماره ۱-الف).

افزودن ذغال فعال به محیط‌های حاوی اکسین‌های NAA و IBA باعث افزایش ریشه‌زایی شد (جدول شماره ۲). به طوری که میانگین ریشه‌زایی در محیط‌های حاوی ذغال فعال با IBA در سطوح پایین‌تر (۰/۵ - ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) افزایش معنی‌داری نسبت محیط‌های حاوی حتی سطوح بالاتر IBA اما بدون ذغال فعال داشت. مشابه با این نتایج، در گیاهان توت سفید [۱۹]، ماکادمیا [۲۰] و گیاه دارویی *Swertia chirayita* [۲۱] نیز افزودن ذغال فعال به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین‌ها باعث افزایش معنی‌دار ریشه‌زایی نسبت به محیط‌های حاوی اکسین‌ها به تنهایی شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های انجام شده بهترین تیمار جهت شاخه‌زایی تیمار هورمونی حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌باشد. بهترین تیمار جهت ریشه‌زایی تیمار هورمونی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۲ گرم در لیتر ذغال فعال می‌باشد. همچنین جهت افزایش رشد طولی گیاهچه‌ها در مرحله شاخه‌زایی می‌توان از تیمار هورمونی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۱ گرم در لیتر ذغال فعال استفاده نمود.

در این تحقیق، اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA و BAP بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه به لیمو بررسی گردیده است. تعداد نوساقه‌ها با افزایش غلظت BAP افزایش یافت (جدول شماره ۱). افزایش تعداد نوساقه‌ها با افزایش غلظت BAP در مطالعات صورت گرفته بر روی گیاه *Lippia Alba* نیز مشاهده شده است [۹]. صرف‌نظر از غلظت BAP، افزایش غلظت IBA در بسیاری از تیمارهای هورمونی باعث افزایش طول شاخه‌ها شد (جدول شماره ۱). اثر القایی و BAP بروی تکثیر جوانه‌های جانبی در بسیاری از گیاهان دارویی همچون *Ceropogia candelabrum* [۱۲]، *Curcuma zedoaria* [۱۳]، *Aloe chinensis* [۱۴]، *Curcuma longa* [۱۵] نیز گزارش شده است. تشکیل کالوس در بافت‌های در حال تکثیر محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، در انتهای بریده شده ریزمنونه‌ها می‌تواند به دلیل تجمع اکسین‌ها در سلول‌های در حال تکثیر باشد، خصوصاً هنگامی که در ترکیب با سیتوکین‌ها باشند [۱۶]. افزودن ذغال فعال به محیط‌های کشت به لیمو علاوه بر افزایش طول نوساقه‌ها باعث کاهش ریزش برگ و جلوگیری از زرد شدن برگ‌ها شد. در تائید نتایج به دست آمده، افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ذغال فعال در کشت درون شیشه‌ای گونه‌ای از سوزنی برگان (*Pinus heldreichii*) باعث افزایش طول نوساقه‌ها شده است [۱۷]. در سال‌های اخیر ذغال فعال به طور گستره‌های در کشت بافت مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده اغلب در کشت بافت جهت بهبود رشد و نمو سلول‌ها استفاده می‌شود. ذغال فعال به طور عمده منجر به جذب ترکیبات بازدارنده رشد موجود در محیط کشت و کاهش اثرات ترکیبات سمعی می‌شود [۱۸]. در مطالعه حاضر، نوساقه‌های کشت شده در محیط‌های دارای ذغال فعال حتی پس از ۴۰



می‌رسد استفاده از عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌ها گیاهی خصوصاً سیتوکنین‌ها در غلاظت‌های مختلف، ایجاد شرایط دمایی و نوری متفاوت می‌تواند باعث افزایش در شاخه‌زایی این گیاه در مطالعات پیش رو شود. همچنین بررسی و ایجاد تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت بافت جهت گزینش گیاهان با عملکرد بالای ماده مؤثره در آینده‌ای نزدیک حائز اهمیت می‌باشد.

افزایش کاربرد گیاه دارویی به لیمو طی سال‌های اخیر در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، نیاز به افزایش سطح زیر کشت آن را ضروری می‌نماید. لذا می‌توان از این روش به عنوان راهکاری سریع جهت تکثیر این گیاه ارزشمند در کنار روش‌های سنتی استفاده نمود. در این بررسی اثر تعدادی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در غلاظت‌های مشخص مورد بررسی قرار گرفت. به نظر

منابع

1. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plant names. Farhange moaser press. Tehran. 1996, p: 325.
2. Zargari A. Medicinal Plants. Tehran University Press. Iran. 1996, pp: 711 - 3.
3. Amin Gh. Traditional Medical Plants of Iran. Ministry of Health and Medical Education Press. 1991, 1: pp: 64 - 5.
4. Argyropoulou CC, Daferera D, Tarantilis PA. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Plant Geno. Evol.* 2007; 35: 831 - 7.
5. Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lourdes Basto M. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25 (10): 1324 - 7.
6. Spector Platt E. Lemon Herbs: How to grow and use 18 great plants, Stackpole Books. USA. 2002, p: 35.
7. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke Ch. PDR for Herbal Medicines. 3rd ed., Thompson PDR, Montvale: NJ, 2004, p: 504.
8. Omid beigi, R. Approaches in Production and Processing of Medicinal Plants. Tarrahan-e-Nashr publishing Co. Iran. 1997, 2: pp: 270.
9. Gupta S.K, Khanuja S, Kumar S. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. *Curr. Sci.* 2001; 81: 206 – 10.
10. Juliani Jr, Koroch AR, Juliani R, Trippi VS. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1999; 59: 175 – 9.
11. Peixoto P, Salimena F, Santos M, Garcia L, Pierre P, Viccini L, Otoni W. In vitro propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart and Schauer Ex Schauer. In vitro cell dev-pl, 2006; 42 (6): 558 - 61.
12. Beena MR, Martin KP, Kirti PB, Hariharan M. Rapid in vitro propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2000; 72: 285 – 8.
13. Liao Z, Chen M, Tan F, Sun X, Tang K. Micropropagation of endangered *aloe Chinese*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2004; 76 (1): 83 – 6.
14. Loc NH, Duc DT, Kwon TH, Yang MS. Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) – a valuable medicinal plant. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2005; 81: 119 – 22.



- 15.** Prathanturug S, Soonthornchareonnon N, Chuakul W, Phaidee Y, Saralamp P. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2005; 80: 347 – 51.
- 16.** Marks TR, Simpson SE. Factors affecting shoot development in apically dominant Acer cultivars in vitro. *J. Hort. Sci.* 1994; 69: 543 – 51.
- 17.** Sul IW, Korban SS. Direct shoot organogenesis from needles of three genotypes of *Sequoia sempervirens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2005; 80: 353 – 8.
- 18.** Denis Thomas T. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotech. Advances.* 2008; 26: 618 – 31.
- 19.** Agarwal S, Kanwar K. Comparison of genetic transformation in *Morus alba* L. via different regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 2007; 26: 177 – 85.
- 20.** Mulwa RMS, Bhalla PL. In vitro plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson). *Plant Cell Rep.* 2006; 25: 1281 – 6.
- 21.** Joshi P, Dhawan V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. *Biol. Plant.* 2007; 51: 22 – 6.

