به زراعی کشاورزی
دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۴۷۳-۴۵۹

بررسی اثر TDZ و BAP بر میزان باززایی مستقیم ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی (*Agastache foeniculum*)

بهمن حسینی[۱]*، لیلا محرمی[۲]

۱. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. کارشناس ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۸

چکیده

در این تحقیق، برای اولین بار سیستم موفق و مؤثر باززایی درون‌شیشه‌ای گل مکزیکی گزارش شد. در آزمایش اول، غلظت‌های مختلف هورمون BAP و TDZ در چهار سطح (صفر، ۲/۲، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار) به تنهایی یا در ترکیب با IAA در سه سطح (صفر، ۱ و ۲/۲ میکرومولار) و در سه تکرار بر باززایی شاخساره از ریزنمونهٔ گره گیاه گل مکزیکی در شرایط کشت درون شیشه‌ای بررسی شد. نتایج آنالیز داده ها نشان داد که تیمارهای مورد بررسی از نظر میانگین باززایی اختلاف معناداری دارند. در تیمار ترکیبی BAP و IAA میانگین حداکثر القای جوانه (۳۲/۷۲ جوانه) و میانگین حداکثر شاخهٔ باززایی شده (۷/۹ شاخساره) در تیمار ۸/۸ میکرومولار BAP مشاهده شد. در تیمار ترکیبی TDZ و IAA حداکثر میانگین القای جوانه (۲۴/۶ جوانه) و شاخه (۷/۱۳ شاخساره در هر ریزنمونه) در تیمارهای ۲/۲ میکرومولار TDZ و ۲/۲ میکرومولار IAA ثبت شد. در آزمایش دوم، اثر محیط کشت پایه و غلظت‌های مختلف هورمون IAA و IBA بر القای ریشه در گیاهچه‌های باززایی‌شده در شرایط درون شیشه بررسی شد. نتایج آزمایش ریشه‌زایی نشان داد بیشترین درصد ریشه‌زایی (۷۴ درصد در هر تیمار) در محیط کشت MS ½ تکمیل‌شده با ۱/۱ میکرومولار IBA، بیشترین میانگین ریشه‌زایی (۵/۰۶ ریشه‌چه در هر گیاهچه) در محیط MS ½ و تیمار ۱/۱ میکرومولار IBA مشاهده شد. گیاهچه‌های ریشه‌دارشده پس از سازگار شدن در شرایط گلخانه در بستر حاوی پرلیت با حداکثر زنده‌مانی ۱۰۰ درصد به خاک منتقل شدند.

کلیدواژه‌ها: القای شاخساره، ایندول ۳- بوتیریک اسید، درون شیشه، گل مکزیکی، متیل کاویکول.

* نویسنده مسئول
Email: b.hosseini@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

گل مکزیکی[1] گیاهی علفی و چندساله از خانوادهٔ نعناییان[2] است. منشأ این گیاه آمریکای جنوبی است. پیکر رویشی گل مکزیکی حاوی اسانس.بوده و مقدار اسانس آن بین ۱/۴ تا ۲ درصد است. تحقیقات در ایران نشان می دهد اسانس این گیاه از ۴۶ ترکیب تشکیل شده است که مهم‌ترین آن را متیل کاویکول به‌مقدار ۸۷/۵ درصد تشکیل می‌دهد. لیمونن (۲/۴ درصد)، ۱و۸ سینئول (۲ درصد) و گلوبولول (۱/۴ درصد) از دیگر اجزای تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌اند [۲]. از مواد مؤثرهٔ گل مکزیکی در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی- بهداشتی و همچنین در صنایع بستنی‌سازی استفاده می‌شود. به علت خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی، اسانس این گیاه در صنایع دارویی به منظور تهیهٔ داروهایی برای معالجهٔ بیماری‌های ریوی و سرفه استفاده می‌شود [۳۴].

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از عوامل بسیار مؤثر در کنترل رشد و تمایز بافت‌ها در کشت‌های درون‌شیشه‌ای‌اند. از بین تنظیم کننده‌های رشد اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها تأثیر بسیار زیادی در القای رشد در بافت‌های گیاهی دارند [۳]. در زمینهٔ تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، نوع، غلظت و نسبت آنها در موفقیت کشت بافت مؤثرند. در گیاه ریحان، حداکثر درصد باززایی (۹۶/۶۷) در تیمار ۲/۵ میلی گرم در لیتر BAP به‌دست آمد [۱]. در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه دارویی آلوئه ورا BAP مؤثرترین نوع سیتوکینین برای القای شاخه زایی معرفی شده است [۱۱، ۳۶ ، ۳۸]. در کشت ریزنمونه‌های گونه‌ای آویشن[3] بهترین نتیجه در تیمار ۶/۶ میکرومولار BAP به همراه ۲/۸ میکرومولار IAA به‌دست آمد [۱۷]. در ریزازدیادی کاکتوس زینتی دارویی[4] نتایج مطالعات مختلف کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان داد که حداکثر کالوس‌زایی در محیط حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۰۷ میلی‌گرم در لیتر TDZ ثبت شد. حداکثر تولید شاخساره در محیط کشت پایهٔ تکمیل شده با ۶ میلی گرم در لیتر Kin و ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد و بیشترین نرخ ریشه زایی نیز در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌علاوهٔ ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4,-D ثبت شد [۶]. تیمار قلمه های گیاهانی از خانوادهٔ نعناع باIAA و IBA سرعت و تعداد ریشه‌زایی را افزایش داد [۲۴]. تأثیر IBA در ریشه‌زایی چندین گونهٔ گیاه دارویی از خانوادهٔ نعناییان نظیر نعناع فلفلی [۳۱] و گیاه *Centella asiatica* [۳۲] از خانوادهٔ ماکینی لیاسه نیز گزارش شده است. در ریشه‌زایی دو گونه ریحان *Ocimum americanum* و *Ocimum tenuiflorum* محیط کشت MS ½ غنی‌شده با IBA و NAA مناسب گزارش شده است [۲۸].

در زمینهٔ بهینه سازی شرایط کشت و ازدیاد درون شیشهٔ گل مکزیکی تاکنون مطالعه‌ای گزارش نشده است. از طرف دیگر، به‌دلیل دگرگرده‌افشان بودن این گیاه تولید لاین‌های یکنواخت از طریق بذر بسیار سخت است. ازاین‌رو، استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی یا ریزازدیادی بهترین راه برای دستیابی به تعداد زیاد گیاه با ساختار ژنتیکی یکسان است که کاهش هزینه‌های تولید و امکان تولید مداوم و سریع را در پی خواهد داشت.

هدف از پژوهش حاضر، دستیابی به دستورالعمل سریع، آسان و تکرارپذیر کشت درون شیشهٔ گل مکزیکی است.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. مواد گیاهی، ضدعفونی سطحی بذر و شرایط نگهداری و رشد

این تحقیق در سال ۱۳۹۰-۹۱، به‌منظور بررسی عوامل مؤثر در باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه دارویی گل مکزیکی در

1. Agastache foeniculum
2. Lamiaceae
3. Thymus piperella L.
4. Cereus peruvianus Mill.

آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. بذرهای گل مکزیکی از باغ گیاهان دارویی دانشگاه ارومیه جمع‌آوری شد. به‌منظور ضدعفونی سطحی بذور گل مکزیکی، از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و مدت زمان پنج دقیقه به‌همراه توین ۲۰، به‌مقدار یک تا دو قطره، به‌منظور افزایش تماس بهتر مادهٔ ضدعفونی‌کننده با پوشش بذر استفاده شد. در پایان چند بار شست‌وشو با آب مقطر نیز انجام گرفت. پس از کشت بذور، فلاسک‌های حاوی بذور در اتاقک‌های رشد با شرایط دمای روز ۲±۲۵ و دمای شب ۲±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، نور سفید فلورسنت و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند.

۲. ۲. بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر باززایی درون‌شیشه‌ای گل مکزیکی

این آزمایش به‌منظور بررسی اثر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان باززایی ریزنمونهٔ گره به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل ترکیب هورمون IAA در سه سطح (صفر، ۱ و ۲/۲ میکرومولار) با BAP و TDZ در چهار سطح (صفر، ۲/۲، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار)، بودند. در پایان واکشت‌ها، درصد و میانگین باززایی در هر تیمار یادداشت شد.

۲. ۳. بررسی اثر نوع محیط کشت پایه و غلظت IBA و IAA بر ریشه‌زایی گل مکزیکی

این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر غلظت نمک (MS) [۲۶] و هورمون‌های IAA و IBA بر میزان ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی‌شده در آزمایشگاه انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل محیط کشت ½MS و MS همراه با غلظت های ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار IAA و IBA بودند. همچنین محیط کشت ½MS و MS فاقد هورمون به‌عنوان تیمار شاهد آزمایش شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت پذیرفت. در پایان واکشت ها، درصد و میانگین ریشه‌زایی و طول ریشه‌های حاصل اندازه‌گیری شد.

۲. ۴. سازگاری

گیاهچه های ریشه‌دارشده به داخل گلدان های پلاستیکی حاوی پرلیت استریل منتقل و سپس به منظور حفظ رطوبت به داخل جعبه های پلاستیکی انتقال داده شدند. تغذیهٔ گیاهچه‌ها با استفاده از محلول MS_2 [1]/ انجام گرفت. سازگاری به‌تدریج و طی دو هفته صورت گرفت. گیاهچه‌ها پس از سازگاری به محیط به شرایط گلخانه انتقال یافتند.

۲. ۵. تجزیهٔ آماری داده ها و نرم افزارهای مورد استفاده

در ابتدا نرمال بودن داده‌ها بررسی شد و داده‌هایی که نرمال نبودند، به‌روش تبدیل زاویه‌ای ($Arc\ \sin\sqrt{x}$) و جذری نرمال شدند. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخهٔ ۹/۱ و مقایسهٔ میانگین تیمارها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن [1] (DMRT) انجام گرفت. نمودارها نیز به‌وسیلهٔ نرم‌افزار اکسل [2] رسم شدند.

۳. نتایج و بحث

۳. ۱. اثر غلظت‌های مختلف BAP و IAA بر میانگین درصد القای جوانه در گل مکزیکی

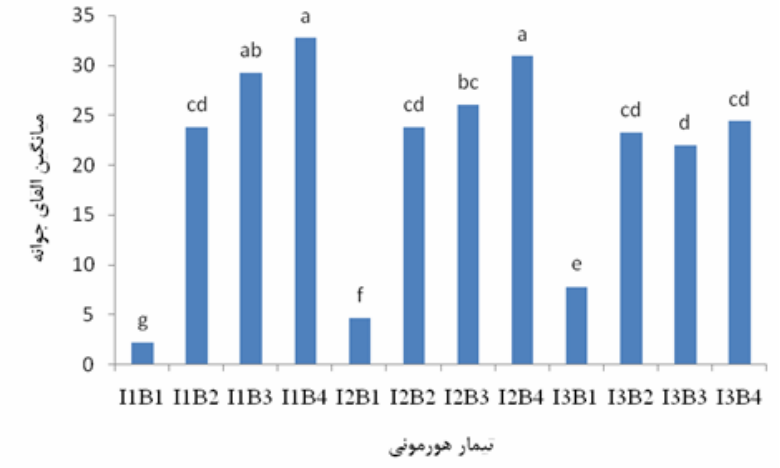
نتایج آنالیز تجزیهٔ واریانس داده ها نشان داد که اثر بنزیل آدنین، اسید ایندول استیک و اثر متقابل آن بر میانگین

1. Duncan's Multiple Range Test
2. Excel

درصد القای جوانه در ریزنمونه های گره گـل مکزیکـی در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۱). نتایج آنـالیز داده نشان داد که کمتـرین میـانگین القـای جوانـه بـا ۲/۱۹ جوانه در هر ریزنمونه در محیط کشت MS فاقد هورمـون و حداکثر میانگین القای جوانه در محیط کشت تکمیل شده بـا ۸/۸ میکرومـولار BAP و محـیط کشـت حـاوی ۸/۸ میکرومـولار BAP در ترکیـب بـا ۱ میکرومـولار IAA به ترتیب با ۳۲/۷۲ و ۳۰/۹۱ جوانه در هر ریزنمونه مشاهده شد. همچنین بـین تیمارهـای ۲/۲ میکرومـولار BAP، ۲/۲ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار IAA، ۲/۲ میکرومـولار BAP و ۲/۲ میکرومـولار IAA، ۸/۸ میکرومـولار BAP و ۲/۲ میکرومولار IAA بـه‌ترتیـب بـا میـانگین‌هـای ۲۳/۸۱، ۲۳/۸۱، ۲۳/۲۳، ۲۴/۴ جوانـه در هـر ریزنمونـه اخـتلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۱).

جدول ۱. نتایج تجزیهٔ واریانس اثر ترکیب هورمونی BAP و IAA در باززایی ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات	
		میانگین القای جوانه	میانگین باززایی شاخه
IAA	۲	۰/۰۴۱ ns	۲/۱۶۶**
BAP	۳	۲۰/۱۳۱**	۰/۹**
(IAA × BAP)	۶	۰/۷۳۱**	۰/۱۱۸ns
اشتباه آزمایشی	۲۴	۰/۰۳۷	۰/۰۵۲
ضریب تغییرات (٪)		۴/۴۲۳	۹/۱۱۸



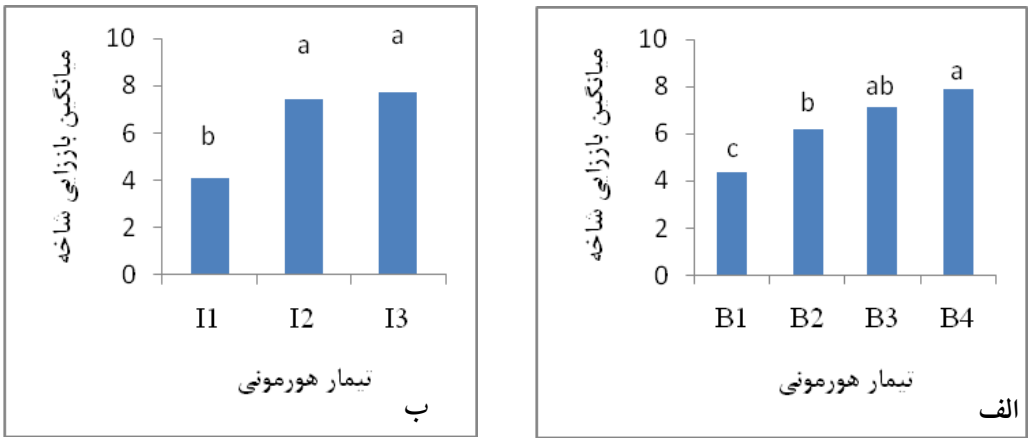
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IAA بر میانگین درصد القای جوانه در ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

I1= 0 µM IAA, I2= 1 µM IAA, I3= 2.2 µM IAA, B1= 0 µM BAP, B2= 2.2 µM BAP, B3= 4.4 µM BAP, B4= 8.8 µM BAP

۳. ۲. اثر غلظت‌های مختلف BAP و IAA بر میانگین درصد باززایی شاخساره در گل مکزیکی

نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سادهٔ بنزیل آدنین و اسید ایندول استیک بر درصد میانگین باززایی شاخه در ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۱). مقایسهٔ اثر غلظت‌های مختلف BAP بر میانگین باززایی شاخساره، نشان می‌دهد که کمترین میانگین باززایی شاخساره با ۴/۳۳ گیاهچه در هر ریزنمونه در محیط کشت MS بدون BAP و بیشترین میانگین باززایی شاخساره، ۷/۹ و ۷/۱۳ گیاهچه در هر ریزنمونه به‌ترتیب در محیط کشت دارای ۸/۸ و ۴/۴ میکرومولار BAP که اختلاف معناداری با هم در سطح احتمال ۵ درصد نداشتند مشاهده شد. در مقایسهٔ اثر غلظت‌های مختلف IAA بر میانگین باززایی شاخه، کمترین میانگین با ۴/۰۸ گیاهچه در هر ریزنمونه در تیمار بدون IAA، و بیشترین میانگین با ۷/۷۳ و ۷/۴۵ گیاهچه در هر ریزنمونه به ترتیب در تیمارهای ۲/۲ و ۱ میکرومولار IAA به‌دست آمد (شکل ۲).

تکثیر درون‌شیشه‌ای به‌وسیلهٔ فاکتورهای زیادی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. یکی از عوامل بسیار مهم، نوع و غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد اضافه‌شده به محیط کشت است. در کشت درون‌شیشه‌ای از تنظیم‌کننده‌های رشد برای تسریع در رشد استفاده می‌شود [۸]. به‌عنوان قاعده‌ای کلی به منظور انجام هرچه بهتر رشد، اکسین یا سیتوکینین یا هر دو با هم به محیط کشت افزوده می‌شوند [۹]، ولی نسبت مناسب اکسین به سیتوکینین به نوع گونه و ریزنمونه بستگی دارد. نتایج این آزمایش نیز نقش مؤثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در پاسخ ریزنمونه‌ها را مشخص کرد. نقش سیتوکینین‌ها در تحریک تقسیم سلولی، رفع درمانسی، القای تشکیل جوانهٔ نابجا، رشد جوانه‌های جانبی و کنترل چرخهٔ سلولی به خوبی ثابت شده است [۲۰].



شکل ۲. اثر غلظت ترکیبات هورمونی BAP و IAA بر میزان باززایی شاخساره از ریزنمونهٔ گره در گل مکزیکی
الف) اثر سادهٔ غلظت BAP بر میانگین باززایی شاخساره؛ ب) اثر سادهٔ غلظت‌های مختلف IAA بر میانگین باززایی شاخساره
حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

I1= 0 µM IAA, I2= 1 µM IAA, I3= 2.2 µM IAA

B1= 0 µM BAP, B2= 2.2 µM BAP, B3= 4.4 µM BAP, B4= 8.8 µM BAP

از هورمون سیتوکینین در ریزازدیادی درون شیشه ای بیشتر گیاهان استفاده شده است. در مرحلهٔ اول، این تحقیق از غلظت‌های مختلف BAP به‌دلیل اثر سریع آن در القای شاخساره، قابل اتوکلاو بودن و همچنین قیمت مناسب آن نسبت به سایر سیتوکینین ها به منظور مقایسهٔ قدرت باززایی ریزنمونه های مختلف استفاده شد. اهمیت BAP برای باززایی گیاهان مختلف خانوادهٔ نعناع ثابت شده است. گزارش کرده‌اند که محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ازدیاد شاخهٔ ریزنمونه‌های گرهی نعناع فلفلی مناسب است [۲۳]. نقش BAP در شکفتن جوانهٔ سایر گیاهان دارویی نظیر گونهٔ درمنه[1] [۱۲] و *Wedelia chinensis* [۳۵] گزارش شده است. همچنین طبق نتایج دیگر تحقیقات، BAP در ریزازدیادی درون شیشه‌ای لوبیا[2] (*Phaseolus vulgaris*) [۲۵] مؤثرتر از دیگر سیتوکینین‌ها است. برای ریزازدیادی درون شیشه‌ای ریحان[3] محیط کشت MS همراه با ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌علاوهٔ ۰/۵ میلی-گرم در لیتر NAA را به‌عنوان ترکیب مناسب معرفی کرده‌اند (۱۶). در این آزمایش، بیشترین میانگین باززایی از ریزنمونهٔ گره با ۵۳/۷۳ گیاهچه در هر ریزنمونه در محیط MS همراه با ۸/۸ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱ میکرومولار IAA به‌دست آمد که این نتیجه با گزارش‌های سایر محققان در ریزازدیادی ریحان مطابقت دارد و نشان می دهد که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین موجب افزایش باززایی از ریزنمونهٔ گره شد [۳۰]. ترکیب BAP و IAA برای افزایش تعداد و طول شاخه در گیاه *Paederia foetida* نیز مؤثر شناخته شده است [۱۳]. ایجاد شاخسارهٔ کامل کمتر در محیط‌های حاوی BAP احتمال دارد که به دلیل تأثیر BAP بر افزایش تعداد جوانه‌های نابجا روی ریزنمونه و افزایش رقابت بین جوانه‌ها باشد، درحالی‌که در محیط کشت‌های بدون BAP شاخساره‌ها به‌صورت تکی یا با تعداد کمی شاخسارهٔ جانبی شروع به رشد کردند و رقابت کمتری بین شاخساره‌ها در آویشن مشاهده شد. به طور کلی، برای تشکیل شاخسارهٔ اکسین و سیتوکینین باید در غلظت بهینه در محیط کشت موجود باشند (۲۷].

۳. ۳. اثر غلظت‌های مختلف TDZو IAA بر میانگین درصد القای جوانه در ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر سادهٔ ایندول استیک اسید بر میانگین القای جوانه در سطح احتمال ۵ درصد و اثر سادهٔ تیدیازورون و اثرهای متقابل تیدیازورون و اسید ایندول استیک در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بوده است (جدول ۲). نتایج آنالیز اثرهای غلظت‌های مختلف TDZ و IAA نشان داد که کمترین میانگین درصد القای جوانه با ۲/۱۹ جوانه در هر ریزنمونه در محیط کشت MS بدون هورمون و بیشترین میانگین درصد القای جوانه (۲۴/۶) در تیمار ۲/۲ میکرومولار TDZ مشاهده شد. بین تیمارهای ۴/۴ میکرومولار TDZ، ۲/۲ میکرومولار TDZدر ترکیب با ۲/۲ میکرومولار IAA، ۸/۸ میکرومولار TDZدر ترکیب با ۲/۲ میکرومولار IAA و همچنین بین تیمارهای ۲/۲ میکرومولار TDZدر ترکیب با ۱ میکرومولار IAA و ۴/۴ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار IAA اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۳).

۳. ۴. اثر غلظت‌های مختلف TDZ و IAA بر میانگین درصد باززایی شاخسارهٔ ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی

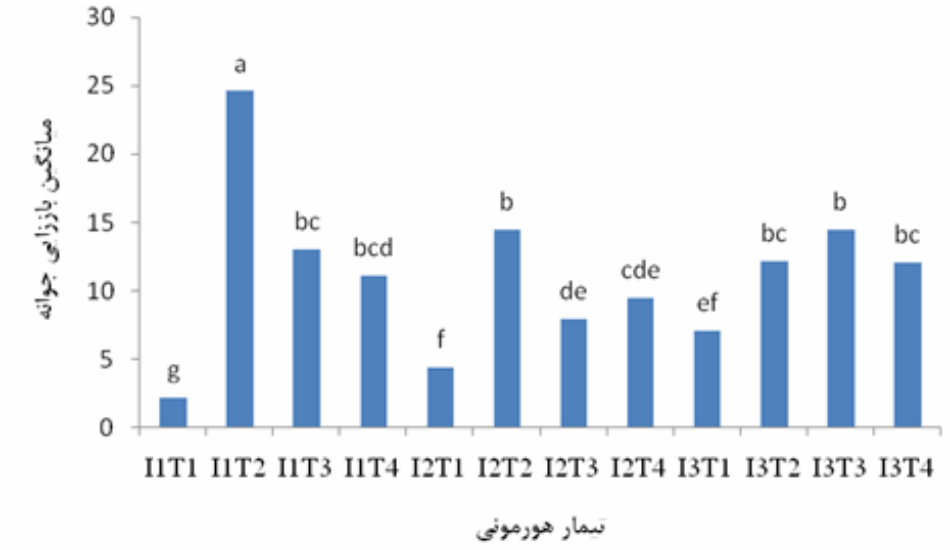
نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر سادهٔ ایندول استیک اسید و تیدیازورون و اثرهای متقابل آنها بر میانگین درصد باززایی جوانهٔ شاخه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود

1. Artemisia annua
2. Phaseolus vulgaris
3. Ocimum basilicum

(جدول ۲). حداقل میانگین باززایی شاخساره با یک شاخه در هر ریزنمونه در تیمار ۲/۲ میکرومولار TDZ و بیشترین میانگین درصد باززایی شاخساره (۷/۱۳) در تیمار ۲/۲ میکرومولار IAA به تنهایی مشاهده شد. اختلاف تیمار شاهد با تیمار ۲/۲ میکرومولار TDZ معنادار نبود و نیز بین تیمارهای ۴/۴ میکرومولار TDZ، ۸/۸ میکرومولار TDZ، ۲/۲ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۱ میکرومولار IAA، ۴/۴ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۱ میکرومولار IAA و ۸/۸ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۱ میکرومولار IAA، ۴/۴ میکرومولار TDZ در ترکیب با ۲ میکرومولار IAA اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۴).

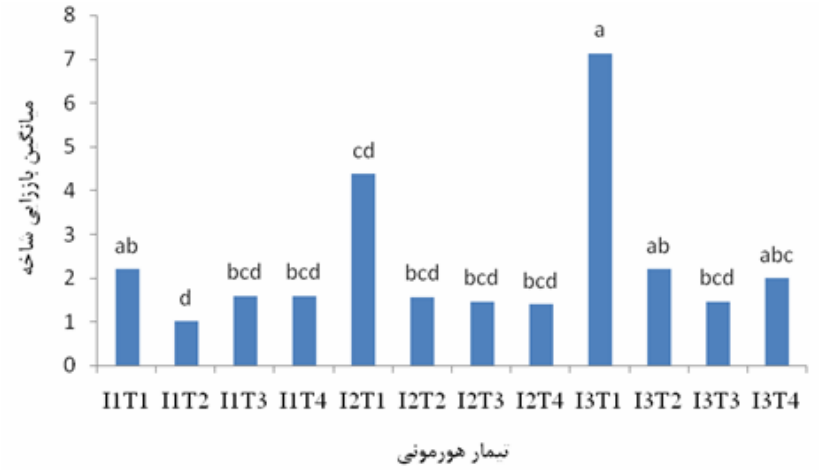
جدول ۲. نتایج تجزیهٔ واریانس اثر ترکیب هورمونی TDZ و IAA در باززایی ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات	
		میانگین درصد القای جوانه	میانگین درصد باززایی شاخه
IAA	۲	۰/۶۳۶ *	۰/۵۹۶**
TDZ	۳	۶/۲۳۷**	۱/۵۵۴**
(IAA×TDZ)	۶	۱/۰۴۹**	۰/۲۲۹**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۰/۱۲۱	۰/۰۲۹
ضریب تغییرات (٪)		۱۰/۸۲۴	۱۱/۷۲۹



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ و IAA بر میانگین درصد القای جوانه در ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

I1= 0 µM IAA, I2= 1 µM IAA, I3= 2.2 µM IAA,
T1= 0 µM TDZ, T2= 2.2 µM TDZ, T3= 4.4 µM TDZ, T4= 8.8 µM TDZ,



شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف TDZ و IAA بر میانگین درصد باززایی شاخسارهٔ ریزنمونهٔ گره گل مکزیکی. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

I1= 0 µM IAA, I2= 1 µM IAA, I3= 2.2 µM IAA,
T1= 0 µM TDZ, T2= 2.2 µM TDZ, T3= 4.4 µM TDZ, T4= 8.8 µM TDZ

در مطالعات ریزازدیادی گیاهان مختلف مانند ریحان [۲۱]، کاکتوس [۶]، ترشک [۴]، رازیانه [۵] و بسیاری از گیاهان دیگر در شرایط درون‌شیشه‌ای سیتوکینین‌های BAP، Kin و TDZ به‌تنهایی یا در ترکیب با اکسین‌هایی مثل IAA، IBA و NAA استفاده شده است. به هر حال، ترکیب اکسین و سیتوکینین همیشه به‌عنوان یک ترکیب مناسب برای ازدیاد شاخه شناخته شده و در کل القای جوانه و نمو شاخه از ریزنمونه‌های گره ساقه از فعالیت‌های سیتوکینین‌ها است [۲۹]. در این مطالعه، باززایی درون‌شیشه‌ای گل مکزیکی به‌وسیلهٔ غلظت و نوع تنظیم‌کننده های رشد تحت تأثیر قرار گرفت. این نتایج با نتایج دیگر تحقیقات در ازدیاد *Centella asiatica* [۳۲] مطابقت دارد. بیشترین میانگین تعداد شاخسارهٔ کامل در تیمار ۸/۸ میکرومولار BAP و کمترین میانگین از تیمار ۲/۲ میکرومولار TDZ به‌دست آمد. همچنین بیشترین میانگین جوانهٔ القایی از تیمار ۸/۸ میکرومولار BAP و کمترین میانگین از تیمار شاهد بدون هورمون به‌دست آمد.

بر این اساس به‌طور کلی می‌توان گفت که تنظیم‌کنندهٔ رشد کینتین در تعادل با غلظت‌های اکسین، ریزنمونه‌ها را در جهت افزایش طول سلول‌ها و در نتیجه افزایش تولید شاخسارهٔ کامل پیش برده است [۱۵].

۳. ۵. بررسی اثرهای غلظت نمک (MS) و تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و IBA بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی‌شدهٔ گل مکزیکی

۳. ۵. ۱. اثر غلظت‌های مختلف نمک (MS)، IAA و IBA بر درصد ریشه‌زایی

ریشه‌زایی در همهٔ تیمارهای آزمایشی مشاهده شد. نتایج تجزیهٔ واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت نمک (MS) و تیمار هورمونی بر درصد ریشه‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۳). بیشترین درصد ریشه‌زایی (۷۴ درصد) در محیط کشت MS ½ مشاهده شد. براساس نمودار مقایسهٔ میانگین‌های مربوط به اثرهای غلظت‌های مختلف IAA و IBA، تیمار ۱/۱ میکرومولار IBA سبب

القای حداکثر درصد ریشه‌زایی (۸۵ درصد در هر تیمار) شد که اختلاف معناداری با تیمارهای ۲/۲ میکرومولار IAA و ۲/۲ میکرومولار IBA نشان نداد، کمترین درصد ریشه‌زایی (۲۵ درصد در هر تیمار) در محیط کشت فاقد هورمون مشاهده شد (شکل ۵).

۳. ۵. ۲. اثر غلظت‌های مختلف نمک (MS)، IAA و IBA بر میانگین تعداد ریشه

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر غلظت نمک در سطح احتمال ۵ درصد و اثر تیمار هورمونی در سطح احتمال ۱ درصد بر میانگین تعداد ریشه‌های تشکیل‌شده معنادار است (جدول ۳). طبق نمودار مقایسهٔ میانگین‌ها مربوط به اثر غلظت محیط کشت MS بر میانگین تعداد ریشه، بیشترین میانگین تعداد ریشه (۵/۰۶) در تیمار MS ½ به دست آمد که اختلاف معناداری با محیط کشت MS داشت و براساس نمودار مقایسهٔ میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف IAA و IBA، بیشترین میانگین تعداد ریشه (۷/۰۷ در هر شاخساره) در تیمار ۱/۱ میکرومولار IBA ثبت شد که با ۲/۲ میکرومولار IAA و ۲/۲ میکرومولار IBA، اختلاف معناداری نداشت. کمترین میانگین تعداد ریشه (۰/۵ در هر شاخساره) در محیط کشت بدون هورمون مشاهده شد (شکل ۶).

ریشه‌زایی به‌وسیلهٔ فاکتورهای متعددی شامل، وجود تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط بیرونی کشت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. کاهش غلظت مواد معدنی موجب کاهش پتانسیل اسمزی می‌شود، به نحوی که در این شرایط جذب املاح و مواد معدنی توسط گیاه، مستلزم ایجاد ریشه و تارهای کشنده است [۷]. همان‌گونه‌که در گیاه *Stevia rebaudiana* نیز کاهش نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم، کلسیم کلراید و سولفات منیزیم به نصف مقداراستاندارد، میانگین ریشه‌زایی را افزایش داد [۲۲]، در تحقیق حاضر نیز اثر کاهش غلظت نمک در ریشه‌زایی به خوبی مشهود است. مطالعهٔ نقش هورمون‌های گیاهی در القای ریشه زایی نیز نشان داده است که اکسین‌ها نقش مهمی در القای ریشه‌زایی گیاهان دارند و برای بیشتر گونه‌ها، وجود اکسین برای انگیزش ریشه زایی لازم است. IAA، IBA و NAA رایج ترین اکسین هایی هستند که اغلب برای انگیزش ریشه در کشت‌های درون‌شیشه‌ای گیاهان استفاده می‌شود.

در پژوهش حاضر، از محیط کشت MS ½ و MS کامل بدون هورمون یا همراه با هورمون های اکسینی IAA و IBA به‌عنوان تیمارهای ریشه‌زایی به‌منظور انگیزش و تولید ریشه در گیاهچه های ریزازدیادی شدهٔ گل مکزیکی به‌منظور تعیین بهترین محیط ریشه‌زایی استفاده شد. ریزشاخساره هایی که در محیط کشت بدون اکسین قرار داده شدند، ریشه ای ایجاد نکردند یا تعداد ریشهٔ کم و ریشه‌های نسبتاً باریک ایجاد کردند که ناشی از اثر اکسین های طبیعی و درونی خود گیاه بود. نتایج مشابهی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه *Cunila galioides* Benth. به دست آمد [۱۹]. در مطالعهٔ ریزازدیادی گونه ای ریحان[1] همچنین گزارش شده که در حدود ۹۲ درصد از شاخساره‌های باززایی‌شده در محیط درون‌شیشه‌ای، قادر به ریشه‌زایی در محیط MS بدون هورمون طی دو تا سه هفته پس از کشت بودند [۳۰]. استفاده از اکسین‌ها می‌تواند عامل تشدیدکننده یا تسریع‌کنندهٔ انگیزش ریشه‌زایی باشد [۱۰]. القای ریشه‌زایی گیاهچه‌ها توسط اکسین‌ها پاسخی متعارف است که در مدت به نسبت کوتاهی در حضور هر دو هورمون IAA و IBA صورت گرفت. این دو هورمون به‌عنوان اکسین‌های مصنوعی پایدار غیرفنوکسی در محیط های کشت گیاهی برای ایجاد ریشه در اکثر گونه‌ها به کار می رود [۱۴] با این حال، غلظت بهینهٔ آنها نسبت به همدیگر برای قطعات جداکشت یک گونه و همچنین از گونه‌ای به گونهٔ دیگر متفاوت است.

1. *Ocimum sanctum*

جدول ۳. تجزیهٔ واریانس اثر غلظت نمک و ترکیب هورمونی IBA و IAA در ریشه‌زایی شاخسارهٔ گل مکزیکی

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات		
		درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشهٔ القایی	حداکثر طول ریشه
غلظت نمک (S)	۱	۱۰۴۲/۴۴**	۰/۷*	۰/۴^{ns}
تیمار هورمونی (I)	۴	۱۷۹۱/۴۸**	۵/۱۴**	۶۹/۵۲**
اثر متقابل (S×I)	۴	۹۸/۵۵^{ns}	۰/۳^{ns}	۵/۱۵*
اشتباه آزمایشی	۳۰	۱۲۰/۶۵	۰/۱۴	۱/۵۳
ضریب تغییرات (٪)		۲۰/۲	۱۷/۵۱	۱۷/۱۱

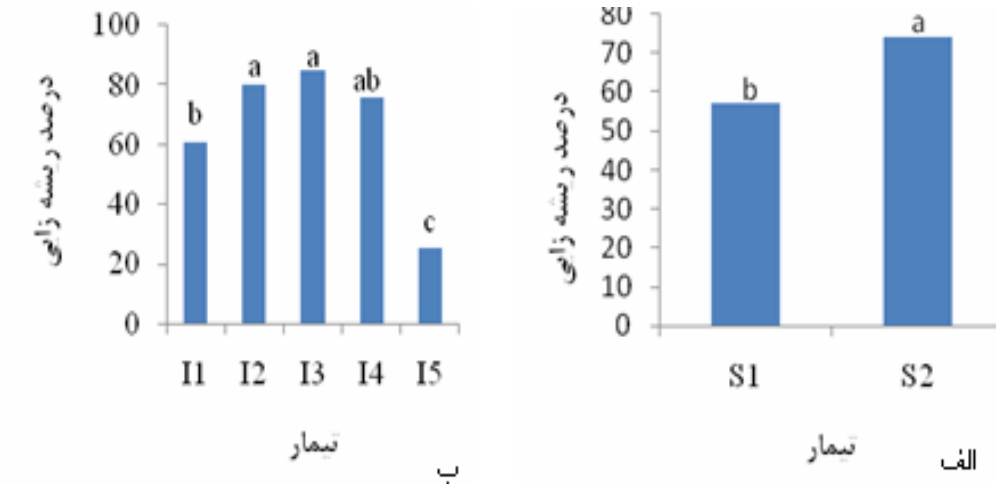
۳. ۵. ۳. اثر غلظت های مختلف نمک (MS)، IAA و IBA بر طول ریشه

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت نمک بر طول ریشه‌های تشکیل‌شده معنادار نبود، ولی اثر تیمار هورمونی در سطح احتمال ۱ درصد و اثرهای متقابل غلظت محیط کشت MS و تیمار هورمونی در سطح احتمال ۵ درصد بر طول ریشه های تشکیل شده معنادار شد (جدول ۳). براساس نمودار مقایسهٔ میانگین های مربوط به اثرهای متقابل غلظت محیط کشت MS و تیمار هورمونی بیشترین طول ریشه ۱۲۶/۵۶ میلی‌متر در محیط کشت MS حاوی ۲/۲ میکرومولار IBA مشاهده شد که با بقیهٔ تیمارهای مورد استفاده اختلاف معناداری نشان داد و کمترین طول ریشه (۵/۰۶ میلی متر) در محیط کشت MS ½ و MS کامل بدون هورمون مشاهده شد. در محیط کشت‌های MS حاوی ۱/۱ میکرومولار IBA و محیط کشت MS ½ حاوی ۱/۱ میکرومولار IAA، ۲/۲ میکرومولار IAA، ۱/۱ میکرومولار IBA، ۲/۲ میکرومولار IBA اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۷).

در کل ریشه‌زایی گیاهچه های گل مکزیکی در محیط MS ½ و در حضور IBA بهتر از سایر تیمارها بود که این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق انجام‌گرفته در گیاه *Paederia foetida* [۱۳] و *Isatis indigotica* [۳۷]، *Mucuna pruriens* [۱۸] مطابقت دارد. بیشترین طول ریشه در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت MS ½ مشاهده شد که بلندتر بودن طول ریشه‌ها در این محیط به‌دلیل فراهم بودن مواد غذایی برای رشد ریشه‌ها است. نتایج به‌دست‌آمده روشی را برای باززایی گیاه گل مکزیکی با استفاده از کشت قطعات گرهی در مدتی حدود دَه هفته ارائه می کند. این روش می‌تواند به‌منظور تولید انبوه گیاه دارویی گل مکزیکی استفاده شود.

۳. ۶. سازگاری

از خصوصیات بسیار مطلوب گل مکزیکی باززایی شده در شرایط درون شیشه، سازگاری بسیار آسان و راحت این گیاه در محیط پرلیت استریل است، به‌طوری‌که ۱۰۰ درصد گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط درون شیشه پس از گذشت چهار هفته در گلدان‌های حاوی پرلیت به شرایط محیطی سازگار شده و با محلول غذایی محیط کشت MS ½ تغذیه شدند (شکل ۸). پس از سازگاری، گیاهچه ها به داخل گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند و در اوایل بهار به داخل مزرعهٔ گیاهان دارویی انتقال یافتند.

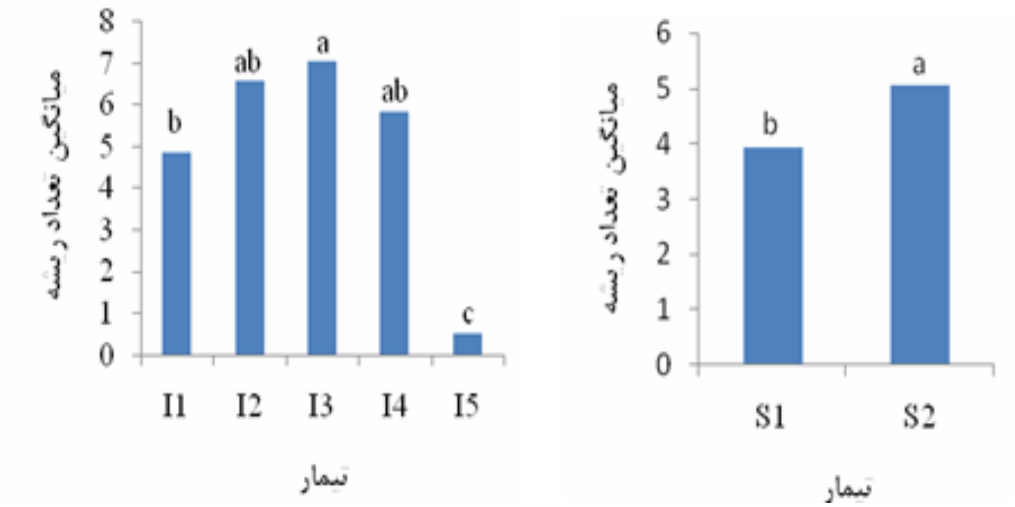


شکل ۵. اثر غلظت ترکیبات هورمونی بر درصد ریشه‌زایی شاخسارهٔ باززاشده در گل مکزیکی.

الف) اثر غلظت نمک بر درصد ریشه‌زایی، ب) اثر ترکیب هورمونی IAA و IBA بر درصد ریشه‌زایی.

حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

I1= 1.1 µM IAA, I2= 2.2 µM IAA, I3= 1.1 µM IBA, I4= 2.2 µM IBA, I5= Control S1= MS, S2=1/2 MS,

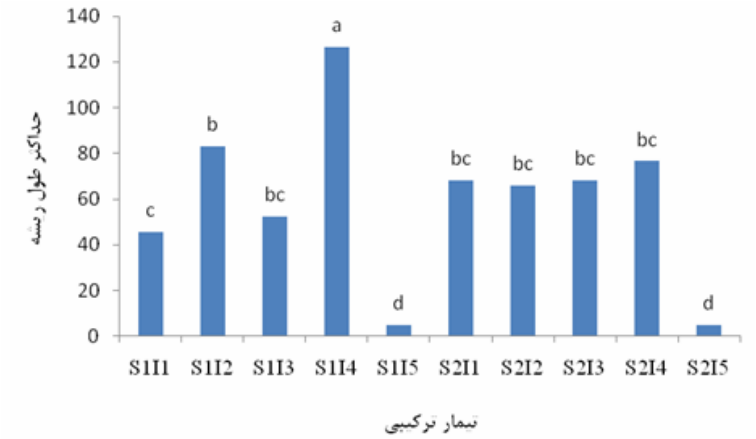


شکل ۶. اثر غلظت ترکیبات هورمونی IAA و IBA بر میانگین تعداد ریشه تولیدشده در شاخسارهٔ باززاشدهٔ گل مکزیکی.

الف) اثر غلظت نمک بر میانگین تعداد ریشه، ب) اثر ترکیب هورمونی IAA و IBA بر میانگین تعداد ریشه

حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

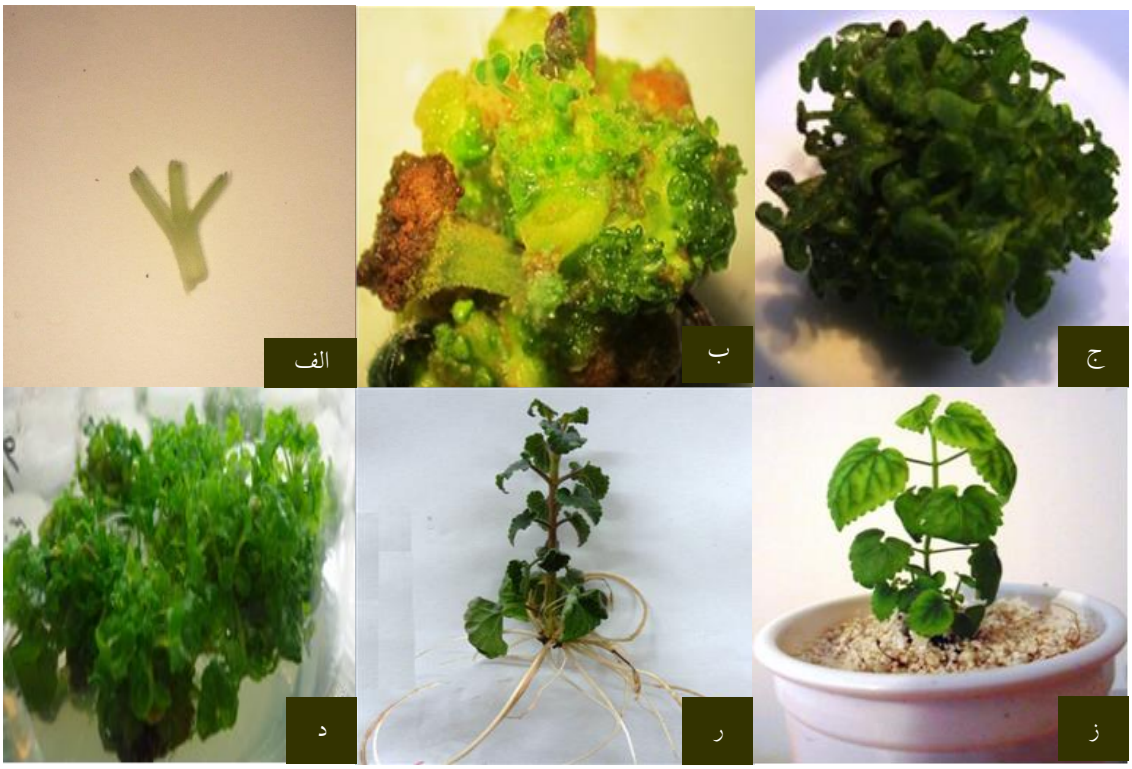
I1= 1.1 µM IAA, I2= 2.2 µM IAA, I3= 1.1 µM IBA, I4= 2.2 µM IBA, I5= Control, S1= MS, S2=1/2 MS,



شکل ۷. تأثیر غلظت نمک و هورمون‌های IAA و IBA بر طول ریشهٔ گیاهچه‌های باززاشدهٔ گل مکزیکی.

حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون DMRT هستند.

I1= 1.1 µM IAA, I2= 2.2 µM IAA, I3= 1.1 µM IBA, I4= 2.2 µM IBA, I5= Control, S1= MS, S2=1/2 MS,



شکل ۸. بررسی اثر ترکیبات مختلف هورمونی سیتوکینینی و اکسینی بر باززایی شاخساره از ریزنمونهٔ گره گیاه دارویی گل مکزیکی در شرایط درون شیشه

الف) تهیهٔ ریزنمونهٔ گره از گیاهان هشت‌هفته‌ای کشت‌شده در شرایط درون شیشه؛ ب) القای جوانه از ریزنمونهٔ گره بعد از ۲۸ روز. در محیط حاوی BAP؛ ج) باززایی گیاهچهٔ نرمال از ریزنمونهٔ گره در محیط MS حاوی ۸/۸ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار IAA؛ د) باززایی گیاهچهٔ گل مکزیکی در محیط حاوی TDZ و IAA؛ ر) گیاهچه ریشه‌دارشده در محیط MS_2 [1] بدون هورمون؛ ز) گیاهان سازگارشده در گلدان در اتاق سازگاری

در کل ریشه‌زایی گیاهچه های گل مکزیکی در محیط MS ½ و در حضور IBA بهتر از سایر تیمارها بود که این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق انجام‌گرفته در گیاه *Paederia foetida* [۱۳] و *Isatis indigotica* [۳۷]، *Mucuna pruriens* [۱۸] مطابقت دارد. بیشترین طول ریشه در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت MS ½ مشاهده شد که بلندتر بودن طول ریشه‌ها در این محیط به دلیل فراهم بودن مواد غذایی برای رشد ریشه‌ها است. نتایج به‌دست آمده روشی را برای باززایی گیاه گل مکزیکی با استفاده از کشت قطعات گرهی در مدتی حدود دَه هفته ارائه می کند. این روش می تواند به‌منظور تولید انبوه گیاه دارویی گل مکزیکی استفاده شود.

۳. ۶. سازگاری

از خصوصیات بسیار مطلوب گل مکزیکی باززایی شده در شرایط درون شیشه، سازگاری بسیار آسان و راحت این گیاه در محیط پرلیت استریل است، به‌طوری‌که ۱۰۰ درصد گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط درون شیشه پس از گذشت چهار هفته در گلدان‌های حاوی پرلیت به شرایط محیطی سازگار شده و با محلول غذایی محیط کشت MS ½[1] تغذیه شدند (شکل ۸). پس از سازگاری، گیاهچه ها به داخل گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند و در اوایل بهار به داخل مزرعهٔ گیاهان دارویی انتقال یافتند.

منابع

۱. اصغری ف (۱۳۸۹) بررسی اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و ترکیبات هورمونی مختلف در باززایی گیاه ریحان (Ocimum basilicum). رسالهٔ کارشناسی ارشد. گروه باغبانی، دانشگاه ارومیه، ۹۳ ص.

۲. امیدبیگی ر (۱۳۸۴) تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم. انتشارات آستان قدس رضوی، ۴۳۸ ص.

۳. حسندخت م ر و ابراهیمی ر (۱۳۸۵) مبانی کشت بافت گیاهی. چاپ اول. انتشارات مرز دانش، ۳۲۸ ص.

۴. زرگری ک، شکیب عم، کشاورزی م و مظفری ج (۱۳۸۷) مطالعهٔ اثر ترکیبات مختلف هورمونی و اندام‌های گیاهی بر میزان باززایی گیاه ترشک (Rumex asetosa L). دانش کشاورزی ایران. ۵(۱): ۱۳۱-۱۲۳.

۵. سرخیل پ، امیدی م، پیغمبری س ع و دوازده امامی س (۱۳۸۸) تأثیر هورمونی و ریزنمونه بر کالزایی، باززایی و کشت سوسپانسیون سلولی در رازیانه (Foeniculum vulgare Mill.). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵(۳): ۳۶۴-۳۷۵.

۶. کریمی ن، نادری را، ابراهیمی م و مفید م ر (۱۳۸۹) بررسی تکثیر کاکتوس زینتی - دارویی Cereus peruvianus Mill. (Cactaceae) با استفاده از تکنیک کشت بافت. گیاهان دارویی. ۳۴: ۳۸-۴۵.

۷. ناصر ش، قمری زارع ع، شهرزاد ش و بخشی خانیکی غ (۱۳۸۹) ریزازدیادی گیاه دم گاوی (Smirnovia turkestana Bunge) . تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۸(۱): ۷۴-۸۲.

۸. نوری قنبلانی ق (۱۳۷۱) تجربیاتی در زمینهٔ کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه تبریز، ۲۵۰ ص.

۹. وصال س و باقری ع (۱۳۸۲) عملیات کشت بافت‌های گیاهی. ترجمه. انتشارات آستان قدس رضوی، ۲۰۰ ص.

۱۰. هدایت م و خوشخوی م (۱۳۸۴) اثر محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی پیرتروم [Tanacetum cineraria efolium (Trevir) Schultz-

[.Bip . علوم و فنون باغبانی ایران. ۶(۴): ۱۷۱-۱۸۲.

Tissue and Organ Cultre, 64:1-4.

20. Gaspar TH, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM And Thorpe T. A (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant. 32(4): 272-289.

21. Gopi C, Nataraja Sekhar Y and Ponmurugan P (2006) In vitro multiplication of Ocimum gratissimum L. through direct regeneration. African Journal of Biotechnology. 5(9): 723-726.

22. Ibrahim IA, Nasr MI, Mohammedm BR and El-Zefzafi MM (2008) Nutrient factors affecting in vitro cultivation of Stevia rebaudiana. Sugar Test. 10(3): 248-253.

23. Kiran G, Kaviraj CP, Venugopal RB, Jabeen FTZ and Rao S (2004) Rapid regeneration of Mentha piperita L. from shoots tip and nodal explants. Indian Journal of Biotechnology. 3: 594-598.

24. Kuris A, Altman A and Putievsky E (1980) Rooting and initial establishment of stem cuttings of Oregano, Peppermint and Balm. Scientia Horticulturae. 13(1): 53-59.

25. Malik Kamal A And Saxena Praveen K (1991) Regeneration in Phaseolus vulgaris L.: High-frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta. 186(3): 384-389.

26. Murashinge T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.

27. Olszowska O and Furmanowa M (1987) Micropropagation of thyme (Thymus vulgaris). Revue-Suisse-do-Viticulture, d'Arboriculture-et-d'Horticulture, 21: 355-358.

28. Patnaik J and Chand PK (1996) In vitro propagation of the medicinal herbs Ocimum

11. Abrie A and Staden JV (2001) Micropropagation of endangered Aloe polyphylla. Plant Growth Regulation, 33(1): 19-23.

12. Agarwala B, Azam FMS, Khatun MA, Rahman F and Rahmatullah M (2010) Simultaneous shoot regeneration and rhizogenesis of Wedelia chinensis for in vitro clonal propagation. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 4(1):65-69.

13. Amin MN, Rahman MM and Manik MS (2003) In vitro clonal propagation of Paederia foetida L. - Medicinal Plant of Bangladesh. Plant Tissue Culture, 13(2): 117-123.

14. Amutha R, Jawaha M and Ravi Paul S (2008) Plant regeneration and in vitro flowering from shoot tip of Basilicum polystachyon L. Moench-an important medicinal plant. Agricultural Technology. 4(2): 117-123.

15. Arteca RN (1995) Plant Growth Regulators, Substances Principles and Applications, Chapman and Hall, New York, 332p.

16. David RH and Arockiasamy DI (2008) In vitro Propagation of Mentha viridis L. from nodal and shoot tip explants. Plant Tissue Culture Biotechnology. 18: 1-6.

17. Erzen-Vodenica M and Baricevic D (1996) Tissue propagation of medicinal and aromatic plants. University of Lyublijana, (Slovenia). Pp. 201-206.

18. Faisal M, Siddique I and Anis M (2006) An efficient plant regeneration system for Mucuna pruriens L. (DC.) using cotyledonary node explants. In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 42: 59-64.

19. Faraco F and Echeverrigaray S (2001) Micropropagation of Cunila galioides, a popular medicinal plant of south Brazil. Plant Cell,

americanum L. syn. O. canum Sim. (Hoary basil) and O. tenuiflorum L. (holy basil), Plant Cell Report, 15: 846-850. International Research Journal Plant Science, 176.

29. Sahoo Y and Chand PK (1998) In vitro multiplication of medical herb Tridax procumbens L. (Mexican daisy, coat button) influence of explanting season, growth regulator, synergy, culture passage and passing substrate. Phytomorphology, 48: 195-205.
30. Singh NK and Sehgal CB (1999) Micropropagation of Holy Basil (Ocimum sanctum Linn.) from young inflorescences of mature plants. Plant Growth Regulatores, 29: 161-166.
31. Sunandakumari C, MaSurtin KP, Chithra M, Sini S and Madhusoodanan PV (2004) Rapid axillary bud proliferation and ex vitro rooting of herbal spice Mentha piperita L. Indian Journal of Biotechnology. 3: 108-112.
32. Tiwari KN, Sharma NC, Tiwari V and Singh BD (2000) Micropropagation of Centella asiatica (L.), a valuable medicinal herb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63: 179-185.
33. Tulok M (1996) Naturalization of Agastache foeniculum (Pursh) O. Kuntze, ph. D. Thesis university of Horticulture and Food Industry, Budapest, 112p.
34. Tuker O and De Baggio T (2000) The big book of herbs. Interweave Press. USA, 111-113.
35. Usha R and Swamy PM (1998) In vitro micropropagation of sweet wormwood (Artemisia annua L.). Phytomorphology, 48: 149-154.
36. Velcheva M, Faltin Z, Vardi A, Eshdat Y and Peral A (2005) Regeneration of Aloe arborescens via organogenesis from young inflorescences. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 293-301.
37. Zhang L, Kai G, Xu T, Pi Y, Sun X and Tang K (2004) Efficient regeneration of tetraploid Isatis indigotica plants via adventitious organogenesis from hypocotyl explants. Biology Plant, 48: 121–124.
38. Zhou GY, HongFeng D, Min SW, Lei C, Zhou, GY, Ding HF, Shi WM and Cheng L (1999) Fast asexual propagation of Aloe vera. Acta Horticulturae Scinica, 26(6): 410-411.