زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره چهاردهم، زمستان ۱۳۹۱، صفحه ۸۹-۱۰۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۱۳
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۴/۱۹

مطالعه ریزازدیادی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) با استفاده از کشت جوانه انتهایی

معصومه مدرس [۱و۲]*، مهرداد لاهوتی [۱]، علی گنجعلی [۱] و جواد اصیلی [۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، پردیس شهید هاشمی‌نژاد مشهد، مشهد، ایران
[۳] گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده
نوروزک (*Salvia leriifolia*)، از گیاهان بومی استان خراسان رضوی و سمنان، در معرض خطر انقراض است. این پژوهش، با هدف بررسی امکان ریزازدیادی گیاه نوروزک از طریق کشت جوانه انتهایی انجام گرفت. برای این هدف، گیاهچه‌ها از طریق کشت جنین در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمدند. جوانه انتهایی این گیاهچه‌ها در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BAP و Kin به تنهایی و یا در ترکیب با IBA برای ساقه‌زایی کشت شدند. ریشه‌زایی ساقه‌ها در محیط MS حاوی سطوح مختلف از هورمون‌های IBA، NAA و 2,4-D بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزارهای JMP و MSTAT-C انجام شد. نتایج نشان داد ترکیب BAP و IBA نتیجه مناسب‌تری در ارتباط با ساقه‌زایی به ازای هر ریزنمونه داشت و BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر همراه با IBA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار ساقه‌زایی بود. همچنین، برای ریشه‌زایی ساقه‌ها وجود اکسین ضروری است. IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بهترین تیمار ریشه‌زایی بود. بر این اساس استفاده از تیمارهای یاد شده برای ریزازدیادی گیاه نوروزک با استفاده از جوانه انتهایی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جوانه انتهایی، ریزازدیادی، نوروزک (*Salvia leriifolia*)

مقدمه
جنس مریم‌گلی (*Salvia*) با ۵۸ گونه، از معروفترین جنس‌های تیره نعناست که استفاده‌های دارویی، غذایی و زینتی بسیاری دارد (Heywood, 1985). گونه *Salvia leriifolia* که در ایران به نام نوروزک شناخته می‌شود، بومی استان خراسان و بخشی از استان سمنان است که در فلور طبیعی ایران به آن اشاره شده است (Rechinger, 1982).

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: masoomeh.modarres@stu-mail.um.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۱۱۸۷۹۷۰۲۲

Archive of SID
www.SID.ir

گزارش‌هایی در ارتباط با خواص درمانی عصاره‌های برگ و ریشه گیاه نوروزک وجود دارد. برای مثال، خاصیت ضد درد وآرام بخش آن قابل مقایسه با دیازپام (Hosseinzadeh and Lary, 2000) و خاصیت ضد التهابی آن قابل مقایسه با دیکلوفناک است (Hosseinzadeh and Yavary, 1999). همچنین، عصاره آن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی (مدرس و همکاران، ۱۳۸۶ ب) و ضد باکتری بوده (مدرس و ابریشم‌چی، ۱۳۸۹)، از ایجاد و توسعه زخم معده در موش جلوگیری می‌کند، به طوری که کارآیی آن مشابه داروی sucralfate است (Hosseinzadeh *et al*., 2000). همچنین، در اسانس این گیاه ۴۹ ترکیب وجود دارد که ترکیبات کامفور با ۱۰/۵ درصد، ۱ و ۸- سینئول با ۸/۶ درصد، کامفن با۶/۲ درصد وآلفاپینن با ۴/۷ درصد بیشترین سهم را به خود اختصاص می‌دهند. خواص ضد تکثیری آن روی سلول‌های سرطانی انسان به اثبات رسیده است (Loizze *et al*., 2009).

با توجه به محدودیت منابع آب و خاک و محدودیت تولید غذا و علوفه در زمین‌های زراعی، رویکرد کنونی بیشتر به منظور استفاده از گیاهانی است که متحمل به تنش‌های محیطی به ویژه خشکی و شوری باشند. گیاه نوروزک متحمل به شرایط سخت محیطی است و می‌تواند نقش مؤثری در تأمین بعضی از داروهای گیاهی مورد نیاز کشور و صادرات ایفا نماید. بنابراین، تلاش برای تکثیر و تولید انبوه آن، علاوه بر تأمین مصارف دارویی و صنعتی می‌تواند نقش مؤثری در ایجاد پوشش مناسب در مرتع به منظور جلوگیری از فرسایش خاک و کویرزدایی داشته باشد.

به طور کلی، هدف از ریزازدیادی، بیشینه تولید از یک گیاه در زمانی معین و در عین حال ایجاد مجموعه‌ای از گیاهان با ویژگی‌های ژنتیکی یکسان و با صفات کمّی و کیفی مورد نظر است (جعفری مفیدآبادی و طبایی عقدایی، ۱۳۸۰). تکثیر سریع گیاهان به ویژه در مورد گیاهانی که ازدیاد غیر جنسی آنها با روش‌های جنسی غیر ممکن و یا مشکل است، از طریق ریزازدیادی امکان‌پذیر است (حاج نجاری، ۱۳۷۳).

قوه نامیه پایین و درصد جوانه‌زنی کم در بذر گیاه نوروزک، مشکلی اساسی برای تکثیر این گیاه ارزشمند به حساب می‌آید (حداد خداپرست و حسینی، ۱۳۷۲). همچنین، از آنجا که استفاده گسترده از گیاهان دارویی موجود در رویشگاه‌های طبیعی باعث نابودی آنها می‌شود، حفظ ذخایر ژرم‌پلاسم گیاهان دارویی در معرض خطر انقراض امری ضروری است. در گیاه نوروزک به علت تولید مقدار کم بذر سالم، استقرار کم بذرها در رویشگاه اصلی، روش‌های ناپایدار بهره‌برداری توسط افراد بومی و محلی و چرای بی‌رویه توسط دام، بخش وسیعی از رویشگاه‌های طبیعی این گیاه تخریب شده، در نتیجه گیاه نوروزک در معرض خطر انقراض قرار گرفته است (Jalili and Jamzad., 1999). ریزازدیادی گیاهان در معرض خطر انقراض، یکی از روش‌های حفاظتی مؤثر برای جلوگیری از انقراض آنهاست.

ریزازدیادی گونه‌های مختلف جنس *Salvia* توسط محققان انجام شده است. به عنوان مثال، کشت جوانه انتهایی *S. fruticosa* در محیط کشت‌های مختلف و تیمارهای هورمونی مختلف نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی در محیط MS حاوی هورمون BAP و بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS به همراه هورمون IBA بوده است (Arikat *et al*., 2004).

Archive of SID

www.SID.ir

ریزازدیادی *S. branchyodon* از طریق کشت تک‌گره در محیط‌کشت MS ۱/۲ در حضور هورمون‌های BA برای شاخه‌زایی و هورمون‌های IBA، NAA و IAA برای ریشه‌زایی صورت گرفته است (Misic *et al.*, 2006). همچنین، کشت جوانه انتهایی در گونه *S. nemorosa* و گونه *S. stenophylla* نشان داد، محیط‌کشت MS همراه با هورمون‌های BA و IAA موثرترین تیمار برای ریزازدیادی آنها بوده است (Ewa and Wysokinska, 2004؛ Hannibal *et al.*, 2010). گونه *S. officinalis* در محیط‌کشت MS از طریق کشت ریزنمونه گره همراه با هورمون‌های مختلف سیتوکینین و اکسین تکثیر و مشخص شده است که مناسب‌ترین هورمون‌ها برای ریزازدیادی آن BA و IBA است (Gostin, 2008). شایان ذکر است، گونه *Salvia leriifolia* به علت پراکندگی محدود (بومی بخشی از ایران)، قدرت جوانه‌زنی کم بذرها، قرار داشتن در معرض انقراض و ویژگی‌های غذایی، دارویی و مرتعی منحصر به فرد آن با دیگر گونه‌های *Salvia* متفاوت است. بنابراین، ریزازدیادی آن از اهمّیت ویژه‌ای برخوردار است. طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون گزارشی از ریزازدیادی گیاه نوروزک منتشر نشده است. لذا، مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان ریزازدیادی این گیاه از طریق کشت جوانه انتهایی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد گیاهی

بذر گیاه نوروزک از اطراف شهرستان بجستان واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری و برای استریفیکاسیون بذرها به مدت ۳ هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. با توجه به جوانه‌زنی بسیار کم بذرها در شرایط درون شیشه‌ای از کشت جنین (مدرس و همکاران،۱۳۸۶ الف) برای به دست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده شد.

برای کشت جنین، از محیط‌کشت MS ۱/۲ (Murashige and Skoog ,1962) حاوی سوکروز (۳۰ گرم بر لیتر)، گلایسین (۲ میلی‌گرم بر لیتر)، زغال فعال (۲ گرم بر لیتر) و آگار (۷ گرم بر لیتر) استفاده شد. هورمون‌های BAP (بنزیل آمینو پورین) و NAA (نفتالین استیک اسید) به میزان یک میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌کشت اضافه شد و اسیدیته محلول ۵/۸ تنظیم شد (مدرس و همکاران، ۱۳۹۱). در ادامه، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت به ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شد.

ابتدا پوشش روی بذرها حذف شد، سپس برای ضدعفونی شدن به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و ۵ دقیقه در آب ژاول ۳ درصد قرار گرفتند و ۳ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. پس از آن، رویان چند میلی‌متری با دقت از میان دو لپه خارج شد و در سطح محیط‌کشت قرار گرفت. رویان‌ها، ابتدا به مدت یک هفته در شرایط تاریکی و سپس به شرایط ۱۶ و ۸ ساعت به ترتیب روشنایی (۴۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و تاریکی و دمای ۲۴-۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند. ۱۰ روز پس از کشت جنین از جوانه انتهایی آن برای ریزنمونه استفاده شد.

ساقه‌زایی (پرآوری)

به منظور ساقه‌زایی دو آزمایش طراحی شد. در آزمایش اول ۹ تیمار شامل هورمون‌های سیتوکینین BAP و Kin (کینتین) با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و

Archive of SID

www.SID.ir

۳ میلی‌گرم بر لیتر، هر کدام به تنهایی در محیط‌کشت MS حاوی سوکروز (۳۰ گرم بر لیتر) و زغال فعال (۲ گرم بر لیتر) در ساقه‌زایی جوانه انتهایی بررسی شد. در آزمایش دوم نیز به محیط‌کشت یاد شده، غلظت‌های مورد نظر از BAP و Kin، در ترکیب با IBA در ۲ سطح ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر (۱۶ تیمار) برای ساقه‌زایی از جوانه انتهایی بررسی شد. اسیدیته همه محلول‌ها روی ۵/۸ تنظیم شد، پس از آن، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شد. جوانه انتهایی حاصل از رشد جنین به طول ۵ میلی‌متر جدا شد و به صورت عمودی روی محیط‌کشت قرار گرفت. محیط‌های کشت حاوی جوانه انتهایی به شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی(۴۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و دمای ۲۴-۲۵ درجه سانتیگراد منتقل شدند. پس از ۴ هفته درصد ریزنمونه‌هایی که تشکیل ساقه دادند، تعداد ساقه‌ها در هر ریزنمونه و طول ساقه ها محاسبه شد. همچنین، با توجه به این که در برخی تیمارها ساقه‌زایی همراه با تولید ریشه بود، طول ریشه و درصد ریشه‌زایی نیز بررسی شد.

ریشه‌زایی

در پایان هفته چهارم ساقه‌های کوچک به دست آمده در مرحله ساقه‌زایی برای حذف تأثیرات سیتوکینین وارد محیط MS بدون هورمون شدند، پس از گذشت ۴ هفته، ساقه‌ها به منظور ریشه‌زایی به محیط‌کشت MS حاوی هورمون‌های اکسین NAA، 2,4-D و IBA در ۳ غلظت (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه‌ها و طول ریشه‌ها پس از ۴ هفته بررسی شد.

سازگاری

ساقه‌های ریشه‌دار شده پس از شستشوی ریشه‌ها با آب مقطر استریل در گلدان‌های پلاستیکی حاوی پرلیت، شن و خاک استریل شده به نسبت (۰/۵:۱:۱) کشت داده شدند. برای جلوگیری از تبخیر آب روی گیاهچه‌ها با لیوان یک‌بار مصرف شفاف پوشیده شد و در اتاق رشد با شرایط قبلی قرار گرفتند. گیاهچه‌ها هر روز به مدت ۱۴ روز آبیاری شدند. پس از این مدت، به منظور سازگاری گیاهچه‌ها، سوراخ‌هایی توسط پانچ روی لیوان‌ها ایجاد و پس از ۳ هفته سرپوش روی گلدان‌ها برداشته و به گلخانه منتقل شدند.

تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در هر تیمار ۲۵ ریزنمونه کشت شد و همه آزمایش‌ها ۲ بار تکرار شد. برای محاسبات آماری از نرم‌افزارهای JMP و MSTAT-C استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P<0.05$) انجام شد.

نتایج

ساقه‌زایی

در این مطالعه، تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین BAP و Kin به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون اکسین IBA به محیط‌کشت MS در ساقه‌زایی از جوانه انتهایی گیاه نوروزک بررسی شد. نتایج آزمایش اول نشان داد، بیشترین درصد ساقه‌زایی در تیمارهای حاوی سیتوکینین به تنهایی به غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP مربوط بود. محیط‌کشت MS بدون هورمون و پس از آن محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin دارای کمترین درصد ساقه‌زایی بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین، در غلظت‌های مختلف BAP و Kin به تنهایی بیشترین میانگین تعداد ساقه‌ها متعلق به غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های یاد شده بود. در این ارتباط، کمترین تعداد ساقه را محیط کشت MS بدون هورمون و سپس ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin تولید نمود. بر اساس مقایسه میانگین‌ها، در محیط کشت‌های حاوی سیتوکینین، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بلندترین طول ساقه را ایجاد کرد.

درآزمایش دوم، نتایج کشت جوانه‌های انتهایی در محیط MS حاوی سطوح مختلف از سیتوکینین‌های BAP و Kin در ترکیب با هورمون اکسین IBA نشان داد، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر میانگین تعداد ساقه‌های ایجاد شده در هر ریزنمونه وجود دارد و ترکیب غلظتی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بیشترین میانگین تعداد ساقه را تولید نمود که نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این، بیشترین درصد تولید ساقه از هر ریزنمونه به تیمار فوق اختصاص داشت. همچنین، بین ترکیب غلظت‌های مختلف BAP، Kin و IBA از نظر طول ساقه‌های تولیدی نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن، سطح هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بلندترین ساقه را ایجاد کرد که نسبت به تیمارهای دیگر معنی‌دار بود. شایان ذکر است، در محیط‌های حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف سیتوکینین در ترکیب با اکسین علاوه بر ساقه‌زایی، ریشه‌زایی نیز صورت گرفت (جدول ۱ و شکل‌های ۱ و ۲).

ریشه‌زایی

در مرحله ریشه‌زایی تأثیر ۳ هورمون اکسین IBA، NAA و 2,4-D در غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ بر ریشه‌زایی ساقه‌های حاصل از مرحله قبل بررسی شد. ابتدا ساقه‌ها به مدت ۴ هفته در محیط MS بدون هورمون قرار گرفتند. ولی در این مدت ریشه‌زایی انجام نشد. نتایج ریشه‌زایی در محیط کشت‌های دارای هورمون اکسین پس از ۴ هفته نشان داد که ریشه‌زایی تنها در محیط کشت‌های حاوی هورمون‌های IBA و 2,4-D اتفاق می‌افتد و غلظت‌های مختلف NAA تأثیری بر تولید ریشه در ساقه‌ها نداشتند. بالاترین درصد ریشه‌زایی به سطح یک میلی‌گرم بر لیتر IBA و پس از آن غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مربوط بود.

طول ریشه نیز تحت تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون IBA قرار گرفت و بلندترین ریشه در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر IBA تشکیل شد که نسبت به دیگر تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان داد. از بین غلظت‌های مختلف 2,4-D ساقه‌ها تنها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر ریشه‌زایی نمودند و کمترین طول ریشه نیز به همین غلظت مربوط بود. در تیمارهایی که ریشه‌زایی در آنها انجام شده بود، از نظر تعداد ریشه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲ و شکل‌های ۳ و ۴). ریشه‌ها به طور مستقیم از قاعده خارج شدند، بنابراین، ارتباط آوندی بین ساقه و ریشه که مستلزم جذب و انتقال املاح به بخش هوایی است به موقع صورت گرفته است (حاج نجاری، ۱۳۷۳). گیاهان به دست آمده مراحل سازگاری را در اتاق رشد طی کردند و بقای آنها در حدود ۷۵ درصد بود.

Archive of SID

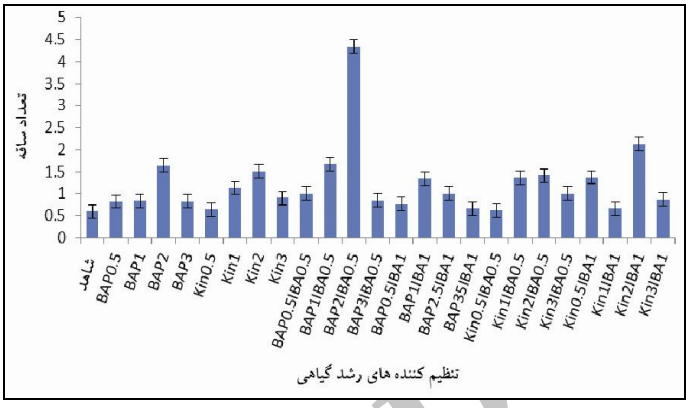
www.SID.ir

جدول ۱- تأثیر هورمون‌های BAP، Kin و IBA در محیط کشت MS بر ساقه‌زایی از جوانه انتهایی *S. leriifolia* پس از ۴ هفته. مقادیر میانگین ۵ تکرار ± StD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

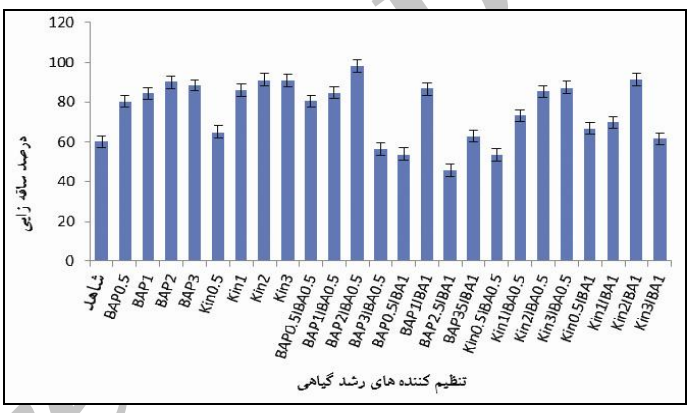
BAP (mg/lit)	Kin (mg/lit)	IBA (mg/lit)	ساقه‌زایی (%)	تعداد ساقه (mm)	طول ساقه (mm)	ریشه‌زایی (%)	تعداد ریشه	طول ریشه (mm)
۰	۰	۰	۶۰±۰/۱۵^{q}	۰/۶۰±۰/۰۲^{g}	۲۰/۳۴±۳/۲^{i}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰/۵	۰	۰	۸۰/۵۶±۰/۱۷^{j}	۰/۸۲±۰/۰۲^{fg}	۳۹/۰۰±۴/۵^{bcd}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۱	۰	۰	۸۴/۶۲±۰/۱۶^{i}	۰/۸۴±۰/۰۳^{fg}	۳۵/۴۲±۰/۵۷^{def}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۲	۰	۰	۹۰/۲۴±۰/۱۲^{c}	۱/۶۴±۰/۰۲^{bcd}	۳۳/۳۶±۳/۵۷^{efg}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۳	۰	۰	۸۸/۵۳±۰/۱۱^{d}	۰/۸۳±۰/۰۱^{fg}	۳۰/۲۵±۴/۶۴^{g}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۰/۵	۰	۶۵/۰۰±۰/۱۳^{n}	۰/۶۴±۰/۰۱^{g}	۲۳/۵۳±۴/۵^{hi}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۱	۰	۸۶/۰۰±۰/۱۳^{fg}	۱/۱۳±۰/۰۲^{defg}	۳۲/۶۸±۳/۲^{efg}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۲	۰	۹۱/۲±۰/۱۲^{b}	۱/۵۱±۰/۰۱^{cde}	۳۶/۶۵±۴/۲^{cde}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۳	۰	۹۰/۸۷±۰/۱۴^{b}	۰/۹۰±۰/۰۲^{efg}	۲۰/۳۸±۶/۵^{i}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰/۵	۰	۰/۵	۸۰/۶±۰/۱۲^{j}	۱/۰۰±۰/۰۱^{defg}	۳۴±۴/۵۸^{efg}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۱	۰	۰/۵	۸۴/۷±۰/۱۲^{hi}	۱/۶۷±۰/۰۲^{bc}	۴۰±۵/۶^{bc}	۴۲/۸۵±۳/۱^{c}	۲/۳۷±۰/۵۷^{a}	۴۴/۶۶±۱۵/۲^{b}
۲	۰	۰/۵	۹۸/۳۰±۰/۱۴^{a}	۴/۳۴±۰/۰۳^{a}	۳۳/۶۷±۸/۲^{efg}	۸۳/۳۳±۳/۳^{a}	۳/۳۵±۰/۶۲^{a}	۵۶/۴۸±۱۱/۷^{a}
۳	۰	۰/۵	۵۶/۳۶±۰/۱۲^{r}	۰/۸۵±۰/۰۱^{fg}	۳۴±۴/۸^{efg}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰/۵	۰	۱	۵۳/۷۴±۰/۲۴^{s}	۰/۷۶±۰/۰۱^{def}	۳۵/۳۴±۰/۵۸^{def}	۳۲/۰۰±۲/۵^{d}	۳/۳۵±۰/۵۵^{a}	۱۷/۰۰±۰/۳^{c}
۱	۰	۱	۸۶/۶۶±۰/۱۲^{ef}	۱/۳۴±۰/۰۲^{cdef}	۴۲/۷۰±۳/۲^{b}	۱۲/۵۰±۰/۳^{e}	۰/۶۶±۰/۳^{b}	۶۶/۶۶±۱۱/۳^{a}
۲	۰	۱	۴۵/۶۸±۰/۱۴^{t}	۱/۰۰±۰/۰۱^{defg}	۳±۲/۶^{j}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۳	۰	۱	۶۲/۸۵±۰/۲۱^{o}	۰/۶۶±۰/۰۱^{g}	۳۰±۷/۶^{g}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۰/۵	۰/۵	۵۳/۳۷±۰/۱۵^{s}	۰/۶۲±۰/۰۲^{g}	۴۷±۴/۹^{a}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۱	۰/۵	۷۳/۴±۰/۱۲^{k}	۱/۳۶±۰/۰۳^{cdef}	۳۰/۷۰±۷/۵^{g}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۲	۰/۵	۸۵/۴۲±۰/۱۴^{gh}	۱/۴۱±۰/۰۲^{cdef}	۳۱/۸±۲/۰^{fg}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۳	۰/۵	۸۷/۳۳±۰/۱۵^{e}	۱/۰۰±۰/۰۲^{defg}	۲۴/۴±۸/۱^{h}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۰/۵	۱	۶۶/۶۶±۰/۱۳^{m}	۱/۳۷±۰/۰۱^{cdef}	۲۶±۴/۶^{h}	۷۱/۴۲±۴/۷^{b}	۲/۳۳±۰/۶۷^{a}	۳۹/۶۶±۰/۵۹^{b}
۰	۱	۱	۷۰±۰/۱۹^{l}	۰/۶۶±۰/۰۱^{g}	۳۳/۱±۷/۲^{efg}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۲	۱	۹۱/۴۲±۰/۱۵^{b}	۲/۱۲±۰/۰۲^{b}	۲۴/۸±۶/۳^{h}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}
۰	۳	۱	۶۱/۶۸±۰/۲۰^{p}	۰/۸۷±۰/۰۱^{efg}	۳۰/۳۵±۲/۲^{g}	۰±۰/۰^{f}	۰±۰/۰^{c}	۰±۰/۰^{d}

Archive of SID

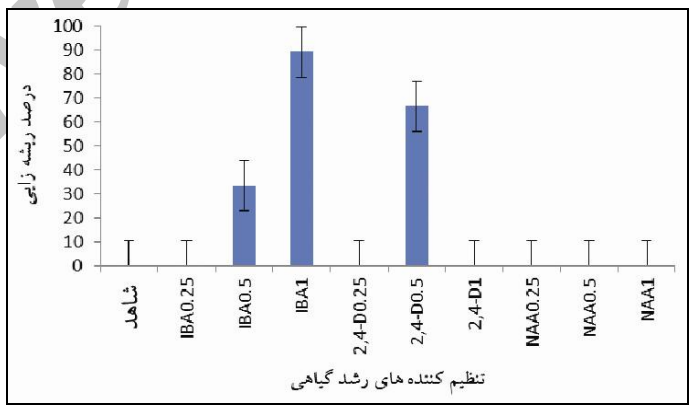
www.SID.ir



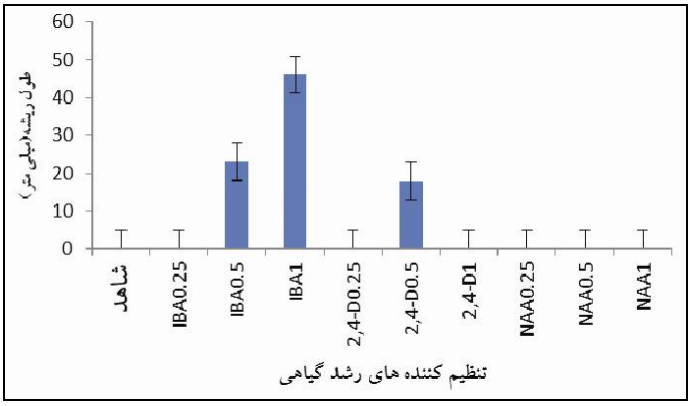
شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و Kin به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون IBA در محیط کشت MS بر تعداد ساقه‌ها به ازای هر ریزنمونه. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است.



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و Kin به تنهایی و یا در ترکیب با هورمون IBA در محیط کشت MS بر درصد ساقه‌زایی. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA، 2,4-D و NAA در محیط کشت MS بر درصد ریشه‌زایی. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA، 2,4-D و NAA در محیط کشت MS بر طول ریشه. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است.

Archive
www.SID.ir

جدول ۲- تأثیر هورمون‌های IBA، 2,4-D و NAA در محیط کشت MS بر ریشه‌زایی ساقه‌های حاصل از ریزازدیادی گیاه *S. leriifolia* پس از ۴ هفته. مقادیر میانگین ۵ تکرار±StD است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

IBA (mg/lit)	2,4-D (mg/lit)	NAA (mg/lit)	ریشه‌زایی (%)	تعداد ریشه	طول ریشه (mm)
۰	۰	۰	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d
۰/۲۵	۰	۰	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d
۰/۵	۰	۰	۳۳/۳۳±۳/۷ c	۲±۰/۰ a	۲۳±۶/۵ b
۱	۰	۰	۸۹/۳۵±۴/۲ a	۲/۳۳±۰/۵۷ a	۴۶±۳/۵ a
۰	۰/۲۵	۰	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d
۰	۰/۵	۰	۶۶/۷۰±۶/۳ b	۲±۰/۱۲ a	۱۸±۳/۲ c
۰	۱	۰	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d
۰	۰	۰/۲۵	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d
۰	۰	۰/۵	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d
۰	۰	۱	۰±۰/۰ d	۰±۰/۰ b	۰±۰/۰ d

بحث

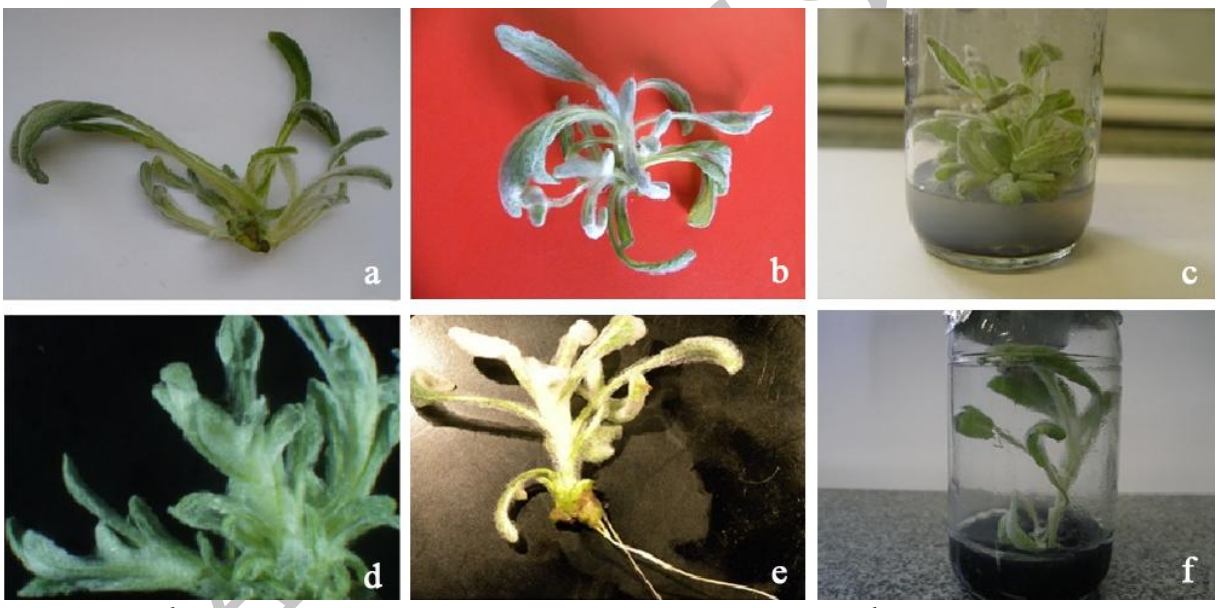
تأثیر سطوح مختلف هورمون‌های BAP و Kin به تنهایی و نیز در ترکیب با IBA در محیط کشت MS بر ساقه‌زایی از جوانه انتهایی گیاه *S. leriifolia* بررسی شد. توانایی ساقه‌زایی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و Kin واقع شد و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin بیشترین درصد ساقه‌زایی و بیشترین تعداد ساقه‌ها به ازای هر ریزنمونه ایجاد شد. از طرف دیگر، رشد طولی ساقه‌ها با افزایش غلظت BAP کاهش یافت. این نتیجه در گونه *S. nemorosa* نیز گزارش شده است (Ewa and Wysokinska, 2004). پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از ترکیب غلظت‌های مختلف BAP و Kin با هورمون IBA نسبت به سیتوکینین‌ها به تنهایی، نتیجه بهتری در ارتباط با افزایش تعداد ساقه به ازای هر ریزنمونه و رشد طولی ساقه‌ها دارد. در این بین، ترکیب سطوح مختلف BAP با IBA بر ساقه‌زایی مؤثرتر بود. مناسب‌ترین تیمار برای ساقه‌زایی از جوانه انتهایی *S. leriifolia* در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد. اگرچه در این تیمار بیشینه تولید ساقه به ازای هر ریزنمونه به وجود آمد، ولی، طول ساقه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. به علاوه تیمار یاد شده به تولید ریشه در ساقه‌ها منجر شد که نقش مهمی در افزایش مقاومت ساقه‌ها و رشد مناسب برگ‌ها داشت. برتری هورمون BAP نسبت به دیگر سیتوکینین‌ها برای ریزازدیادی جنس *Salvia* پیش از این گزارش شده است. برای مثال، در گونه *S. guaranitica* از میان هورمون‌های سیتوکینین BAP، Kin، TDZ و 2-iP، هورمون BAP بیشترین تأثیر را بر افزایش تعداد ساقه‌ها به ازای هر ریزنمونه داشت (Echeverrigaray *et al.*, 2010). همچنین، Arikat و همکاران (۲۰۰۴) BAP، Kin و TDZ را روی ساقه‌زایی از جوانه انتهایی گونه *S. fruticosa* آزمایش و مناسب‌ترین سیتوکینین را BAP گزارش کردند. Misic و همکاران (۲۰۰۶) نیز نتیجه مشابهی را در ریزازدیادی گونه *S. brachydon*

Archive of SID

www.SID.ir

به‌دست آوردند. در توافق با نتیجه پژوهش حاضر در گونه *S.brossontii*، تأثیر BAP به همراه اکسین بهتر از BAP به تنهایی بود (Mederos-Molina, 2006). پژوهش Zhao و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده است که ژن‌های تنظیم‌کننده ARR (A-type Arabidopsis Responsive Regulator) که در مریستم انتهایی حضور دارند، در ترارسانی علامت سیتوکینین نقش منفی دارند. از طرفی، مشخص شده است که اکسین بر ARRها اثر بازدارندگی دارد. پس وجود اکسین به همراه سیتوکینین سبب تقویت نقش سیتوکینین می‌شود. بنابراین، در تحقیق حاضر، اثر مثبت اکسین و سیتوکینین در ساقه‌زایی از جوانه انتهایی منطقی به نظر می‌رسد.

در این پژوهش، ساقه‌های حاصل از جوانه‌های انتهایی *S. leriifolia* طبیعی بوده، شیشه‌ای شدن در هیچ کدام از تیمارها مشاهده نشد. شایان ذکر است که جوانه‌های انتهایی حاصل از ساقه‌های به دست آمده در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA، ۶ بار به طور ماهیانه در تیمار یادشده واکشت شدند و تحت این شرایط توان ساقه‌زایی و شکل طبیعی آنها تغییر نکرد.



شکل ۵- ساقه‌زایی از جوانه انتهایی گیاه *S. leriifolia* در محیط کشت MS حاوی تیمارهای هورمونی. a) ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin ؛ b) ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP؛ c و d) ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر IBA؛ e و f) ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA و رشد طولی گیاه در همین تیمار پس از ۴ هفته.

در این تحقیق، تعداد ساقه‌های به دست آمده در هر ریزنمونه (۴/۳) نسبت به گونه‌های *S. blanacona* (۱/۵) (Cuenca and Amo-Marco, 2000) و *S. officinalis* (۳/۲) (Avato *et al*., 2005) بیشتر بود که علت احتمالی آن تسلط انتهایی پایین *S. leriifolia* است. در عین حال، غلظت بهینه BAP برای ریزازدیادی *S. leriifolia* (۲ میلی‌گرم بر لیتر) نسبت به *S. fruticosa* (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) (Arikat *et al*., 2004) و *S. officinalis* (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) (Gostin, 2008) بیشتر بود، در حالی که از غلظت بهینه

www.SID.ir

برای ریزازدیادی *S. brachyodon* (۶/۸ میلی‌گرم بر لیتر) کمتر است (Misic *et al.*, 2006). این نشان می‌دهد که میزان مناسب هورمون BAP برای ساقه‌زایی بستگی به سیتوکینین درونی دارد. علاوه بر این، احتمالاً حساسیت گونه‌های مختلف نسبت به BAP متفاوت است.

در این پژوهش، طویل‌ترین ساقه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به دست آمد. همچنین، در محیط کشت‌های حاوی BAP بلندترین ساقه در حضور یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA ایجاد شد. نتیجه مشابهی در گونه *S. nemorosa* (Ewa and Wysokinska, 2004) داده‌های حاضر را تأیید می‌کند.

تحقیق حاضر نشان داد که حضور اکسین در محیط کشت برای ریشه‌زایی ضروری است. افزایش غلظت IBA از ۰/۵ تا یک میلی‌گرم بر لیتر به افزایش ریشه‌زایی منجر شد و IBA با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر مؤثرترین هورمون برای افزایش درصد ریشه‌زایی و تولید ریشه‌های بلند بود، در حالی که هورمون 2,4-D تنها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به تولید ریشه‌های کوتاه منجر شد. علاوه بر آن، در طی ریشه‌زایی و رشد ریشه در تیمار یاد شده طول گیاهچه‌ها به طور قابل توجهی افزایش یافت که احتمالاً این امر در بقای آنها در مراحل بعدی مؤثر بود. گزارش‌های پیشین نشان داده بود که اکسین‌ها نقش مهمی در القا ریشه در *S. fruticosa* دارند (Arikat *et al.*, 2004). با وجود این، گونه‌های *S. brossontii* و *S. brachyodon* قادر به تولید ریشه در غیاب اکسین‌ها بوده‌اند (Mederos-Molina, 2006; Misic *et al.*, 2006). در این پژوهش، NAA تأثیری بر ریشه‌زایی نداشت، اگرچه در برخی از گونه‌های *Salvia* به طور موفقیت‌آمیزی باعث تولید ریشه در ساقه‌های حاصل از ریزازدیادی شده بود. برای مثال، Mederos-Molina (۲۰۰۶) مؤثرترین هورمون برای ریشه‌زایی *S. brossontii* را هورمون NAA گزارش کرد. نتایج مشابهی درباره ریشه‌زایی *S. brachyodon* و *S. nemorosa* نیز نشان داد که IBA مؤثرترین هورمون و NAA کم تأثیرترین هورمون برای ریشه‌زایی بوده است (Ewa and Wysokinska, 2004; Misic *et al.*, 2006).

جمع‌بندی

به طور کلی، بر اساس نتایج این تحقیق برای ریزازدیادی از طریق جوانه انتهایی گیاه *S. leriifolia* محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای ساقه‌زایی و یک میلی‌گرم بر لیتر IBA برای ریشه‌زایی پیشنهاد می‌شود. روش ارایه شده در این پژوهش می‌تواند علاوه بر تکثیر گیاه برای حفظ ژرم‌پلاسم و انتقال ژن استفاده شود. همچنین، از آنجا که گیاه نوروزک دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی است، گیاهان ریزازدیادی شده در محیط کشت می‌توانند برای استحصال متابولیت‌های ثانویه با ارزش به کار گرفته شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی و همکاران پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

جعفـری مفیـدآبادی، ع. و طبـایی عقـدایی، ر. (۱۳۸۰) بیوتکنولوژی گیاهی (روشها و کاربرد). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران.

حـاج نجـاری، ح. (۱۳۷۳) ریزازدیـادی. انتشـارات مؤسسـه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران.

حـداد خداپرسـت، م .ح. و حسـینی، م. (۱۳۷۲) اثـر عوامـل محیطـی بـر جوانـه‌زنـی گیـاه نـوروزک در شـرایط آزمایشگاهی. مجله پژوهش و سازندگی ۳۷: ۴۲-۴۵.

مدرس، م.، ابریشـم‌چـی، پ.، اجتهـادی، ح. و رمضـانی، ع. (۱۳۸۶، الف) تکثیر گیاه نوروزک بـا اسـتفاده از کشـت رویـان. تحقیقـات ژنتیـک و اصـلاح گیاهـان مرتعـی و جنگلی ایران ۱۵: ۱۲۹-۱۴۱.

مـدرس، م.، ابریشـم‌چـی، پ.، فرهـوش، ر. و اجتهـادی، ح. (۱۳۸۶، ب) بررسی تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشـه و بـرگ نـوروزک (*Salvia leriifolia*) در مراحـل رشـدونمو. مجلـه علمـی پژوهشـی تحقیقـات گیاهـان دارویی و معطر ایران ۲۳: ۲۸۵-۲۹۴.

مدرس،م. و ابریشـم‌چـی، پ. (۱۳۸۹) بررسـی فعالیـت ضـد باکتریایی ریشه گیاه نـوروزک (*Salvia leriifolia*)، در مراحل مختلف رشد و نمو. مجلـه زیسـت‌شناسـی ایـران ۲۳: ۷۰۷-۷۱۷.

مدرس، م.، لاهوتی، م.، گنجعلـی، ع. و اصـیلی، ج. (۱۳۹۱) بررسـی اثـر محـیط‌کشـت و تنظـیم‌کننـده‌هـای رشـد در بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای جنـین گیـاه نـوروزک (*Salvia leriifolia*). نشریه علمی-پژوهشی علوم باغبانی (در حال چاپ).

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S. and Shibli, R. A. (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientia Horticulturae 100: 193-202.

Avato, P., Fortunato, I. M., Ruta, C. and D'Elia, R. (2005) Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. Plant Science 169: 29-36.

Cuenca, S. and Amo-Marco, J. B. (2000) *In vitro* propagation of two Spanish endemic species of Salvia through bud proliferation. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 36: 225-229.

Echeverrigaray, S., Postingher Carrer R. and Bavaresco, Andrade L. (2010) Micropropagation of *Salvia guaranitica* benth through axillary shoot proliferation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 883-888.

Ewa, S. and Wysokinska, H. (2004) *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 40: 596-602.

Gostin, I. (2008) Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated *in vitro.* International Journal of Botany 4: 430-436.

Hannibal, T., Van Staden, J. and Makunga, P. (2010) *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of a-bisabolol. Plant Growth Regulation 61: 287-295.

Heywood, V. H. (1985) Flowering plants of the world. Croom Helm Publication, London.

Hosseinzadeh, H. and Lary, P. (2000) The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research 14: 384-387.

Hosseinzadeh, H. and Yavary, M. (1999) Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice and rat. Pharmaceutical and Pharmacological Letters 9: 60-61.

Hosseinzadeh, H., Haddad Khodaparast, M. H. and Hosseini, E. (2000) Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters

Archive of SID

www.SID.ir

10: 63-64.

Jalili, A. and Jamzad, Z. (1999) Red data book of Iran. a preliminary survey of endemic, rare and enudaugered plants species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR) Publication, Tehran.

Loizze, M. R., Menchini, F., Tundis, R., Bonesi, M. and Cenforti, F. (2009) *In vitro* biological activity of *Salvia leriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. Journal of Oleo Science 58: 443-446.

Mederos-Molina, S. (2006) Micropropagation of *Salvia broussonetii* Benth. a medicinal plant species. Plant Tissue Culture and Biotechnology 16: 19-23.

Misic, D., Grubisic, D. and Konjevic, R. (2006) Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. Biologia Plantarum 50: 473-476.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Phsiologia Plantarum 15: 473-497.

Rechinger, K. H. (1982) Flora Iranica. no. 150. Academische Druk-U Verlagsustalt, Gratz.

Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J. and Lohmann, J. U. (2010) Hormonal control of the shoot stem-cell niche. Nature 465: 1089-1092.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of micropropagation of *Salvia leriifolia* Benth using shoot tip

Masoomeh Modarres [1,2], Mehrdad Lahouti [1]*, Ali Gangeali [1] and Javad Asili [3]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2] Department of Biology, Shahid Hasheminejad Campus, Farhangian University, Mashhad, Iran
[3] Deptartment of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Mashhad, Iran

Archive of SID

Abstract

Salvia leriifolia (Lamiaceae) is endemic of Khorasan and Semnan provinces and is an endangered plant. In this research, for the first time, micropropagation of this plant was studied through shoot tip proliferation. Plantlets were obtained via embryo culture in 1/2 MS culture medium supplemented with 1 mg/L BAP and 1 mg/L NAA .For micropropagation, shoot tips of the plantlet were cultured on MS medium supplemented with different concentration of BAP and KIN alone or in combination with IBA. For rooting, MS medium containing different concentration of IBA, NAA and 2,4-D was used. Statistical analysis was performed according to the JMP and MSTAT-C software. The results showed that combination of BAP and IBA was appropriate for shoot proliferation and MS medium containing 2 mg/L BAP and 0.5 mg/L IBA was optimum for proliferation. Also, auxin was necessary for root formation and the best treatment for rooting was MS medium supplemented with 1 mg/L IBA. It could be concluded that, this treatment might be recommended for micropropagation of *Salvia leriifolia* via shoot tip culture.

Key words: Shoot tip, Micropropagation, *Salvia leriifolia*

* Corresponding Author: masoomeh.modarres@stu-mail.um.ac.ir

www.SID.ir