



## باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی در خطر انقراض زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy Boiss*)

پریسا جنوبی، احمد مجد، میترا زمانی\*

گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

\* Email: Std.mitrazamani@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۳

### چکیده

زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy Boiss.*) یکی از گونه‌های دارویی و معطر نعنایان است که در ارتفاعات شمالی و شمال شرقی ایران یافت می‌شود. زرین گیاه به علت شرایط خاص رویشگاه و برداشت بی رویه انسانی این گیاه در خطر انقراض قرار دارد. در این مطالعه نتایج حاصل از کشت درون شیشه‌ای جداکشت‌های مختلف بدست آمده از دانه‌رست‌های سترون بدست آمد. کلیه تیمارهای بکار رفته برای محور زیر لپه تنها به کالوس زایی انجامید و باززایی مشاهده نشد. نتایج باززایی غیر مستقیم برگ لپه‌ای ۱۴ روزه نشان داد که بیشترین درصد کالوس زایی مربوط به ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت MS حاوی  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA و  $5.0 \text{ mg l}^{-1}$  NAA بود. کالوس‌های منتقل شده به محیط کشت باززایی حاوی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA و  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA میزان  $3/33\%$  باززایی شاخه را نشان داد. همچنین به منظور القای نوساقه از طریق باززایی غیر مستقیم با واکشت متوالی ریزنمونه برگ لپه ای در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA  $3/53\%$  باززایی گزارش شد. بهترین درصد ریشه‌زایی به میزان  $75\%$  از محیط القای ریشه حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر NAA بدست آمد. گیاهان باززایی شده پس از توسعه سیستم ریشه‌ای به گلدان‌های حاوی خاک و ورمیکولیت در شرایط گلخانه منتقل و سازگار شدند.

**کلیدواژه‌ها:** القای کالوس، بادرنجبویه دناپی، باززایی نو ساقه، ریز ازدیادی.

### مقدمه

گرگان، مازندران، همدان، سمنان، تهران، فارس، کاشان و کرج پراکنش دارد [۱۰]. زرین گیاه، گیاهی است چندساله، نیمه چوبی به ارتفاع ۱۰ تا ۲۰ سانتی متر، ساقه‌های چوبی، برگ‌ها دم‌برگ دار، تخم مرغی شکل

زرین گیاه یا بادرنجبویه دناپی با نام علمی *Dracocephalum kotschy* متعلق به تیره نعنائیان می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده و در کوه‌های

گیاه موجود است و درممانعت از رشد و سنتز پلی آمین ها در سلول های سرطانی انسان موثر است [۶]. در برگ های این گیاه ترکیبی بنام اسپینال زد وجود دارد که از سال های پیش در درمان سرطان مورد استفاده قرار می گرفته است. [۱۰]

با وجود ارزش دارویی بالای این گیاه تا کنون گزارشی از باززایی ساقه زرین گیاه دیده نشده است. تنها گزارش موجود بر روی تکثیر رویشی گونه زرین گیاه در ایران می توان به استفاده از روش کشت مرستم رأس ساقه در محیط کشت MS ترکیب با  $5 \text{ mg l}^{-1} \text{BA}$  و  $0.2 \text{ mg l}^{-1} \text{NAA}$  اشاره کرد. شاخه های رشد یافته در این محیط، برای طویل شدن و ریشه دار شدن به محیط کشت MS غنی شده با  $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{BA}$  و  $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{IBA}$  انتقال داده شدند [۱۴].

با توجه به شرایط خاص اقلیمی مورد نیاز برای رشد زرین گیاه و برداشت بی رویه آن، این گیاه دارویی و معطره بومی در معرض تهدید قرار گرفته است. به منظور حفظ ذخائر ژنتیکی کشور عزیزمان تکثیر و نگهداری این گیاه ارزشمند امری ضروری می باشد. از این رو هدف از این پژوهش بهینه سازی کشت در شیشه و باززایی مستقیم و غیرمستقیم نوساقه به منظور ریزازدیادی زرین گیاه می باشد.



شکل ۱: زرین گیاه ( *Dracocephalum kotschy Boiss.* )

و گل های بزرگ سفید یا متمایل به زرد است که بصورت خوشه های انتهایی و حامل براکته پهن و دراز می باشد [۱]. بذرهای زرین گیاه دارای خواب پیچیده و طولانی هستند. جوانه زنی بذور این گیاه دشوار می باشد. Moradi و Otrshy (۲۰۱۲) گزارش کردند که  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  از BA در محیط کشت MS منجر به درصد بالایی از جوانه زنی بذر می شود از طرفی سرما نقش بسزایی در شکستن خواب بذر ندارد [۱۳]. بررسی اطلاعات آب و هوایی مراتعی که گونه زرین گیاه در آن پراکنش یافته است نشان می دهد که میزان بارش حدود  $320$  میلی لیتر و درجه حرارت سالانه  $10/22$  درجه سانتی گراد با اقلیم نیمه خشک سرد در ارتفاعات بیش از  $1800$  متری می تواند بعنوان یکی از رویشگاه های گونه زرین گیاه مطرح باشد. ارتفاع بالا و آب و هوای سرد رویشگاه از جمله عوامل محدودیت رویش این گونه و خواب بذر آن بوده که موجب در خطر انقراض قرار گرفتن زرین گیاه می باشد [۱]. از اینرو کشت در شیشه این گیاه راهکار مناسبی برای تکثیر آن می باشد.

زرین گیاه با داشتن بیش از  $55$  نوع ترکیب در اسانس آن بعنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد. در درمان بیماری های رو ماتوئیدی، ام اس، سرگیجه و تقویت حافظه از آن استفاده می شود. با بررسی های بیوشیمیایی که روی عصاره زرین گیاه صورت گرفته است ترکیبات بسیار ارزشمندی شناسایی شده است. لیمونن که یکی از اجزای اصلی عصاره زرین گیاه است به عنوان یک مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین عمل کرده و اثرات ضد تومور، ضد ویروس، باکتری کش، مهارکننده رشد قارچ ها، ضد اسپاسم و مسکن را موجب می گردد. ژرانیول نیز یکی از ترکیباتی است که در اسانس زرین

## مواد و روش‌ها

سترون سازی و جوانه زنی بذور:

بذرهای گونه زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) از شرکت رهنما کشت پرتیکان اصفهان تهیه گردید. تعدادی بذر بصورت تصادفی از میان بذرها انتخاب شد. میانگین طول بذرها ۳ میلی‌متر و وزن ۴۰۰ دانه آن ۱ گرم بود. تیمارهای مختلفی جهت سترون سازی بکار گرفته شد، تا در نهایت بذور به روش زیر سترون سازی شدند. بذرها بعد از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه در آب جاری، به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار داده می‌شود. سپس با محلول ۱/۵٪ هیپوکلریت سدیم و دو قطره Twine به مدت ۲۰ دقیقه با لرزش شدید استریل و در نهایت با آب مقطر سه مرتبه شسته می‌شود. به منظور بررسی جوانه‌زنی بذرو شرایط و محیط‌های کشت بسیار متعددی بکار رفت. از آن جایی که جوانه‌زنی بذر زرین گیاه همراه با دشواری بود.

بذرهای سترون شده جهت رویش و تولید دانه رست به محیط‌کشت پایه MS فاقد هورمون انتقال یافتند. در هر شیشه ۵ عدد بذر کشت گردید. بهترین زمان جوانه‌زنی بذرها در شرایط کشت در شیشه و بدون اعمال تیمار در فصل سرد سال نتیجه می‌شود. بر این اساس بعد از ۱۲ روز یک یا دو بذر در هر شیشه جوانه‌زده و در روزهای بعد بذرها با تناسب نامشخصی جوانه زدند. به این ترتیب تعیین سن برای دانه‌رست‌ها مشکل بود و طی بررسی جوانه‌زنی بذرها مشخص شد که وقتی لپه‌ها از بذر بطور کامل خارج شوند نمونه‌ها ۷ روزه در نظر گرفته شدند. به این ترتیب با در نظر گرفتن هفت روزه شدن نمونه‌ها سن تک تک نمونه‌ها بطور جداگانه بررسی و اندازه‌گیری شد.

## القای کالوس و باززایی نوساقه:

جدا کشت‌های برگ لپه‌ای و محور زیر لپه از دانه‌رست‌های استریل شده، جدا و مورد استفاده قرار گرفتند. جداکشت‌های برگ لپه‌ای وارد محیط‌کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) ( $0/5 \text{ mg l}^{-1}$  و ۱) همراه با غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید (NAA) ( $0/5 \text{ mg l}^{-1}$  و ۱) شدند. جداکشت‌های محور زیر لپه‌ای به محیط القای کالوس حاوی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA همراه با  $0/5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA و یا  $0/5 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D منتقل شدند. توده‌های کالوسی ایجاد شده پس از ۱۴ روز به محیط القای نوساقه انتقال یافتند.

به منظور باززایی نوساقه از کالوس‌های ایجاد شده، محیط القای باززایی نوساقه حاوی محیط‌کشت پایه MS تکمیل شده با غلظت‌های متفاوت از هورمون NAA ( $0/2$  و  $0/5$  و  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و BA ( $0$  و  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و ۱/۵ و ۲) بکار رفت. هر دو هفته یک بار، واکشت در محیط مشابه صورت گرفت.

## رشد و توسعه نوساقه‌ها و القای ریشه:

برای طویل شدن و رشد نوساقه‌هایی باززا شده محیط‌کشت پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوت هورمون BA ( $0$  و  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و NAA ( $0/5$  و  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) استفاده شد.

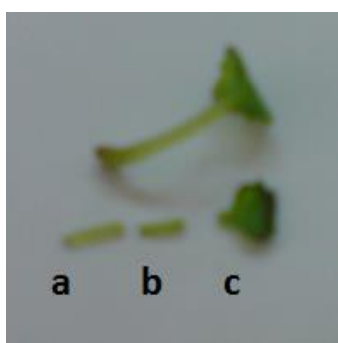
به منظور ریشه‌دار شدن نوساقه‌ها، محیط‌کشت ریشه‌زایی با استفاده از هورمون‌های NAA ( $0 \text{ mg l}^{-1}$ ) و ۱ و ۲) ترکیب با غلظت‌های متفاوت از BA ( $0$  و  $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) بکار گرفته شد.

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجراء گردید. تجزیه و

جداکشت‌های برگ لپه ای از دانه رست‌های ۱۴ روزه برداشت شدند. به منظور مشخص نمودن دقیق ناحیه‌ی تشکیل کالوس با توان باززایی نوساقه، برگ لپه‌ای به سه قسمت تقسیم شد و به صورت افقی بر روی محیط‌های کالوس زایی قرار گرفتند (شکل ۳-۳). کالوس‌های کوچک بعد از ۷ روز در انتهای دم‌برگ (شکل ۳ a-۳)، برگ لپه‌ای تشکیل شدند. مشاهدات نشان داد که انتهای برگ لپه ای (شکل ۳ a-۳) تنها محلی است که توان تولید کالوس با توان باززایی نوساقه را دارد.



شکل ۲: ریزنمونه‌های محور زیر لپه که به حالت ایستاده کشت شده در محیط کشت القای کالوس حاوی  $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  و  $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ 2,4-D}$



شکل ۳: تقسیم جداکشت برگ لپه‌ای به منظور تعیین محل تشکیل کالوس. a: قطعه دم‌برگ نزدیک به محور زیر لپه، b: قطعه دم‌برگ نزدیک به پهنک، c: پهنک

به این ترتیب برگ‌های لپه‌ای بهترین جداکشت برای تشکیل کالوس و باززایی غیرمستقیم نوساقه در نظر گرفت شد. در بین محیط‌کشت‌های تعریف شده

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون LSD نرم‌افزار آماری SAS انجام شد.

### استقرار گیاهان باززا شده در شرایط گلخانه

گیاهان باززایی شده زرین گیاه که دارای سیستم ریشه‌ای گسترده بودند، از شیشه‌های محتوی محیط‌کشت خارج شدند. آگار و محیط کشت اطراف سیستم ریشه‌ای بطور کامل شسته شده و به گلدان‌های خاک حاوی ورمیکولیت ۵۰٪ سترون انتقال یافتند. بمنظور حفظ رطوبت بالا در اطراف گیاهان بر روی گلدان‌ها پوشش پلاستیکی کشیده شد. پس از یک هفته با ایجاد منفذ به تدریج از رطوبت اطراف گیاه کاسته شد تا گیاهان بتوانند با شرایط رطوبتی محیط گلخانه سازگاری پیدا کنند. در این مدت گیاهان با محلول غذایی هوگلدن آبیاری شدند.

### نتایج

#### کالوس‌زایی از جداکشت‌های محور زیر لپه و برگ‌های لپه‌ای

به‌علت ناهمزمانی شروع جوانه‌زنی، سن دانه رست‌ها پس از خروج کامل لپه‌ها موردنظر قرار گرفت. جداکشت‌های محور زیر لپه از دانه رست ۱۴ روزه به طول ۰/۵ سانتی‌متر جدا شدند و بصورت عمودی و افقی بر روی محیط‌های القای کالوس، قرار گرفتند. موثرترین نحوه قرارگیری جداکشت‌های محور زیر لپه برای تولید کالوس، شکل عمودی آن بود که کالوس بعد از ۱۲ روز از ناحیه راس محور زیر لپه، نمایان شد. بهترین محیط برای القای کالوس محیط حاوی  $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  و  $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ 2,4-D}$  بود که کالوس‌های حاصل بزرگ و به رنگ سبز روشن بودند (شکل ۲-۲).

$0.5 \text{ mg l}^{-1}$  که از انتهای دمبرگ (شکل a-۳)، محلی که از محور زیر لپه جدا شده بود، کالوس پس از ۷ روز بخوبی رشد کردند و بعد از گذشت ۱۲ روز در سرتاسر دمبرگ، کالوس‌های شکننده به رنگ سبز روشن شکل گرفتند. این محیط‌کشت بهترین محیط برای تولید کالوس در نظر گرفته شد.

برای القای کالوس از جداکشت برگ لپه‌ای، تنها محیط‌کشت پایه MS با ترکیب هورمونی  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA و ۱ و  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA برای تشکیل کالوس مناسب نبود و در دیگر محیط‌ها کالوس با ویژگی‌های ریختی متفاوت ایجاد گردید که در جدول ۱- آمده است. از بین تیمارهای هورمونی اعمال شده کالوس‌های تشکیل شده در محیط حاوی  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA و

جدول ۱- موقعیت قرارگیری و وضعیت کالوس‌های تولید شده در محیط القای کالوس (CIM) از جداکشت‌های برگ لپه ای

شکل کالوس انتهای دمبرگ	محل تشکیل کالوس بعد از ۷ روز	رنگ کالوس	تشکیل کالوس	تیمار (mg/l)
	انتهای بریدگی دمبرگ و سرتاسر آن	سبز روشن	+++	0/5 BA + 0/5 NAA
	انتهای بریدگی دمبرگ و لبه‌های پهنک	سبز روشن	++	0/5 BA + 1 NAA
	انتهای بریدگی دمبرگ	سبز	+	1 BA + 0/5 NAA
	انتهای بریدگی دمبرگ	سبز روشن	++	1 BA + 1 NAA

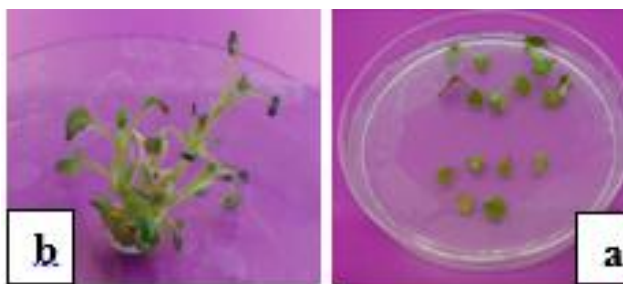
بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد باززایی در تیمار  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA بدست آمد، هر چند که اختلاف معنی‌داری با تیمار  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA نداشت. در بین ۱۰ تیمار استفاده شده برای باززایی، فقط در سه تیمار  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA،  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA و  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  BA باززایی مشاهده گردید.

#### باززایی غیر مستقیم نوساقه

واکشت کالوس‌های حاصل از جداکشت‌های محور زیر لپه به محیط‌کشت القای نوساقه نتیجه‌ای را دربرنداشت. در مقابل کالوس‌های حاصل از برگ لپه‌ای با انتقال به محیط‌کشت القای نوساقه منجر به باززایی نوساقه شدند. بهترین نتیجه ساقه‌زایی از واکشت کالوس‌ها به محیط‌کشت القای نوساقه با ترکیب هورمونی  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA +  $2 \text{ mg l}^{-1}$  BA بود که  $Sd \pm 33/3\%$  ساقه‌زایی را نشان داد. میانگین تعداد ساقه باززا شده در هر کالوس  $Sd \pm 4$  عدد بود.

جدول-۲: وضعیت رشد و کیفیت کالوس‌ها در محیط القای نوساقه (SIM)

رنگ کالوس در محیط SIM	رشد کالوس در محیط SIM	SIM	
		BA	NAA
قهوه ای	-	۰	۰
قهوه ای	+	۱	۰
سبزروشن	++	۱/۵	۰
قهوه‌ای	+	۲	۰
قهوه‌ای	+	۱	۰/۲۵
قهوه‌ای	+	۱/۵	۰/۲۵
سبزی تیره	++	۲	۰/۲۵
قهوه ای	+	۱	۰/۵
سبزروشن	++	۱/۵	۰/۵
قهوه ای	+	۲	۰/۵

شکل ۴: (a) تشکیل کالوس در انتهای قطعه دمبرگ نزدیک به محور زیر لپه در محیط کشت  $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ (b) باززایی غیر مستقیم نوساقه در محیط کشت القای نوساقه با ترکیب هورمونی  $0.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ 

$1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  (شکل ۵-۵) پس از ۱۴ روز با  $0.53/3 \pm \text{Sd} \%$  باززایی نوساقه با میانگین تعداد  $4 \pm \text{Sd}$  ساقه در هر کالوس بیشترین درصد باززایی نوساقه را در بر داشت.



شکل ۵-۵: باززایی غیر مستقیم نوساقه در محیط کشت کالوس زایی با

ترکیب هورمونی  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$ 

همچنین بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد شاخه باززا شده در تیمار  $0.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  به میزان  $4 \pm \text{Sd}$  بدست آمد. بنابراین برای بدست آوردن بیشترین تعداد باززایی و تعداد شاخه این تیمار مناسب است.

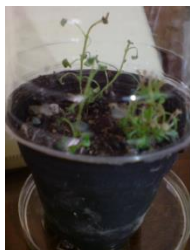
#### باززایی نوساقه از کشت پیوسته بر روی محیط کشت القای کالوس

نتایج حاصل از واگشت متوالی کالوس‌های حاصل از جداگشت برگ لپه‌ای بر روی محیط کشت‌های حاوی اکسین و سیتوکینین‌ها نشان داد که کشت پیوسته در محیط القای کالوس حاوی ترکیب هورمونی

ساقه‌های باززا شده از طریق باززایی غیرمستقیم به محیط‌کشت القای ریشه حاوی ترکیب های مختلف هورمونی وارد شدند و تنها در محیط‌کشت پایه MS با ترکیب هورمونی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA طی دو هفته ریشه‌دار شدند (شکل-۸). بعد از گذشت یک ماه از واگشت نوساقه‌ها در محیط ریشه‌زایی، ساقه‌های ریشه‌دار به داخل گلدان منتقل شدند. همانطور که در قسمت مواد و روش توضیح داده شد در هفته اول برای حفظ رطوبت هوا با پوشش پلاستیکی اطراف گلدان را پوشاندیم. کم‌کم برای سازگاری گیاه با رطوبت هوای بیرون با ایجاد منفذ در پوشش به تدریج از رطوبت اطراف گیاه کاسته شد. همواره با آبیاری منظم در این مرحله رطوبت را برای خاک حفظ کردیم.



شکل-۸: ریشه زایی ساقه باززا شده در محیط کشت القای ریشه با ترکیب هورمونی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA پس از ۱۴ روز از واگشت

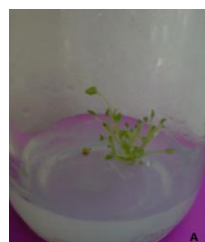


شکل-۹: سازگاری گیاه باززا شده در شرایط گلخانه

### رشد و توسعه نوساقه و ریشه زایی

پس از باززایی نوساقه‌ها، به منظور افزایش رشد و طول شدن ساقه‌ها، ساقه‌های باززا شده را با احتیاط از کالوس جدا نموده به محیط‌های حاوی ترکیبات مختلف هورمونی منتقل شدند. بهترین محیط برای رشد نوساقه در کمترین زمان، محیط‌کشت پایه MS با ترکیب هورمونی  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA بود (شکل-۶).

برای ریشه‌دار شدن ساقه‌های باززا شده، نوساقه‌ها پس از طول شدن به محیط‌کشت القای ریشه که در جدول ۲-۴ آورده شد انتقال یافتند. تنها محیط مناسب برای ریشه زایی محیط کشت پایه MS با ترکیب هورمونی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA بود که پس از ۱۴ روز ریشه در قاعده ساقه‌ها نمایان شد (شکل-۷). درصد ریشه‌زایی در این محیط کشت ۷۵٪ است.



شکل-۶: A: محیط کشت با ترکیب هورمونی  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BA +  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  NAA



شکل-۷: نوساقه ریشه دار شده در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی  $2 \text{ mg l}^{-1}$  NAA

### بحث و تفسیر

به منظور انتخاب بهترین مسیر برای باززایی غیرمستقیم نوساقه گونه زرین گیاه، کشت پیوسته از طریق واکشت متوالی کالوس در محیط القای کالوس توصیه می شود. بیشترین درصد باززایی (۳/۵۳٪) از طریق واکشت کالوسها در محیط کشت القای کالوس حاوی  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  طی ۳۰ روز با میانگین تعداد چهار ساقه در هر کالوس نتیجه شد. البته به نظر می رسد واکشت کالوسهای حاصل از محیط القای کالوس با ترکیب هورمونی  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  با ۵۰٪ باززایی غیرمستقیم نوساقه در مدت ۱۴ روز مسیر بهینه تری برای باززایی گونه زرین گیاه باشد. در اهداف ریز ازدیادی که ساخت محیطهای متنوع با دشواری همراه است بکار گیری کشت پیوسته بر روی محیط القای کالوس برای این گیاه توصیه می شود.

به منظور طولی شدن و رشد ساقه، محیط کشت MS با غلظت های متفاوت BA تعریف گردید که نوساقه ها در محیط کشت MS ترکیب با غلظت  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  بیشترین رشد طولی را داشته و علاوه بر آن شاخه های جانبی بیشتری تولید کردند. اثر سیتوکینین ها بر رشد ساقه و تولید جوانه های جانبی بر روی ساقه متفاوت است. هورمون BA موثرترین سیتوکینین در افزایش طول و وزن تر ساقه است [۴]. در بسیاری از گیاهان دارویی خانواده نعنا مثل جنس *Mentha* و *Lavendula* اثر مثبت هورمون BA بر رشد ساقه و تکثیر جوانه های جانبی گزارش شده است [۷، ۲]. این موضوع از اثر هورمون BA بر تکوین جوانه ها و افزایش تعداد گیاهچه ها ناشی می شود. این اثر مثبت BA بر نوساقه ها در شرایط *in vitro* به علت دخالت کردن آن در متابولیسم عمومی گیاه بویژه فعالیت آنزیم ها و

موفقیت ریزازدیادی به ترکیبات غذایی محیط کشت، غلظت و ترکیبات تنظیم کننده های رشد، شرایط آب و هوایی بهینه گلخانه، ژنوتیپ و حالت های فیزیولوژیک گیاه اصلی و انتخاب نوع جداکشت وابسته است. انتخاب نوع جداکشت به هدف مطالعه و نوع گونه مرتبط است [۵]. به منظور باززایی غیرمستقیم گیاه *D. kotschy* از جداکشت های برگ لپه ای ۱۴ روزه برای تشکیل کالوس استفاده شد. اثر غلظت هورمون BA بر روی برگ لپه ای نشان داد که غلظت  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  و  $1 \text{ mg l}^{-1}$  ترکیب با هورمون اکسین NAA منجر به تولید کالوس هایی باتوان باززایی می شود. اهمیت هورمون BA روی باززایی جداکشت های برگگی گونه های مختلفی از تیره نعنا اثبات شده است. در جنس *Pogostemon* غلظت  $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  همراه با هورمون اکسین NAA در محیط کشت پایه MS در تشکیل کالوس و باززایی ساقه موثر بوده است [۱۲]. در گونه *Salvia splendens* از تیره نعنائیان نیز غلظت های ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BA موثر در تولید کالوسهایی با توان باززایی نوساقه از جداکشت برگ شد [۸] که با یافته های ما در مورد زرین گیاه از این تیره مطابقت دارد.

هورمون سیتوکینین در پیدایش ساقه موثر است اما همواره نسبت مناسب بین سیتوکینین و اکسین در تشکیل نوساقه از کالوس از اهمیت بالایی برخوردار است اکسین همیشه مانع از تشکیل ساقه نیست. از طرفی رشد سلولها با حضور سیتوکینین ادامه می یابد اما برای تقسیم سلولها، حضور اکسین ضروری است. هورمون اکسین NAA به همراه سیتوکینین در القای کالوس ضروری هستند [۹].



- dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biol Plant*, 49: 439-42.
- [4] George E F., Hall M A., Klerk G J D. 2008, Plant propagation by tissue culture. Third Edition Springer Publisher, Vol. 1 .
- [5] Gonçalves S., Romano A. . 2013, In vitro culture of *lavenders* (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 31: 166-174.
- [6] Gohari A R., Saeidnia S., Matsuo K., Uchiyama N., Yagura T., Ito M., Kiuchi F., Honda G. 2003, Flavonoid constituents of *Dracocephalum kotschy* growing in iran and their trypanocidal activity. *Natural medicines*, 57(6): 250-252.
- [7] Hirata T., Kukreja A K. 1990, Volatile monoterpenoids constituents of the plantlets of *Mentha spicata* produced by shoot tip culture. *Phytochemistry*, 29: 955-959.
- [8] Huii L., Guoping Z., Guozheng S., Songlin R., Qiaojuan F. 2012, Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Seeds of *Salvia splendens*. *Agriculture and Biology*, 14: 445-449.
- [9] Jiménez V M. 2005, Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47: 91-110.
- [10] Jahanian F., Ebrahimi S A., Rahbar Roshandel N., Mahmoudian M. 2005, Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschy* and a potential ant. *Phytochemistry*, 66: 1581-1592.
- [11] Jalali, A . Jamzad, Z. 1999. Red data book of Iran. Tehran. research institute of forests and rangelands Iran.
- [12] Kumaraswamy M., Anuradha M. 2010, Micropropagation of *Pogostemon cablin* Benth. through Direct Regeneration for Production of True to Type Plants. *Plant Tissue Cult. and Biotech*, 20(1): 81-89.
- [13] Moradi k., Otrshy m. 2012, A combination of chemical scarification and 6-benzylaminopurine (BAP) treatment promote seed germination in *Dracocephalum kotschy* seeds. *Trakia Journal of Sciences*, 10(3): 26-29.
- [14] Moradi k., Otrshy M. 2012, Trichomes and Regeneration by Direct Organogenesis of Medicinal Plant *Dracocephalum* کوآنزیم‌های موثر در بیوسنتز متابولیت‌ها و رشد گیاه است.
- محیط‌کشت پایه MS ترکیب با غلظت NAA  $2 \text{ mg l}^{-1}$  موثرترین محیط برای القای ریشه نوساقه‌های زرین گیاه بود. در گونه‌های دیگر از تیره نعنا از محیط‌کشت پایه MS ترکیب با غلظت‌های متفاوت از هورمون NAA برای ریشه‌دار کردن ساقه‌های باززا شده استفاده شده است. Nordine و همکاران (2013) با استفاده از محیط‌کشت MS حاوی NAA  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  موفق به ریشه‌دار کردن ۹۳/۷۵٪ از نوساقه‌های گونه *Thymus hyemalis* شدند [۱۵]. Echeverrigaray و همکاران (۲۰۰۵) برای ریشه‌دار کردن نوساقه‌های گونه *Lavandula dentata* از محیط القای ریشه MS با ترکیب هورمونی NAA  $1 \text{ mg l}^{-1}$  موفق به ۱۰۰٪ ریشه‌زایی شدند [۳]. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش برای باززایی غیر مستقیم زرین گیاه استفاده از ریزنمونه برگ لپه‌ای در محیط MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین درصد باززایی مشاهده می‌شود.

## منابع

- [1] Asaadi A M., KhoshnodYazdi A. 2010, Study of ecological characters of *Dracocephalum kotschy* Boiss. In Bojnourd rangelands. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26(3): 406-410.
- [2] Dias M C., Nickell G L. 2002, Rapid multiplication of *Lavandula viridis* L. through *in vitro* axillary shoots proliferation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 68: 99-102.
- [3] Echeverrigaray S., Basso R., Andrade L B. 2005, Micropropagation of *Lavandula*

*kotschy* L. Using Shoot Tips (Lamiaceae).  
J. Crop Sci. Biotech, 15: 15 (3): 251 – 257.  
[15] Tlemcani C R Nordine A., EL Meskaoui A.  
2013, Micropropagation of *Thymus*

*satureioides* Coss. an endangered  
medicinal plant of Morocco. Journal of  
Agricultural Technology, 9(2): 487-501.