فصلنام‌هی داروهای گیاهی

Journal homepage: www.ojs.iaushk.ac.ir

# اثر ریزنمونه ها و هورمون های رشد در باززائی مستقیم زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss.) با استفاده از تکنیک کشت بافت

**اطرشی محمود* و مرادی کوثر**

*پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور ( ABRII)، جاده فلاورجان (بلوار پژوهش)، اصفهان، ایران؛*

* *مسئول مکاتبات*: **E-mail: otroshy@yahoo.com**

**شناسه مقاله**

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۰ شهریور ۱۳۹۰

**تاریخ پذیرش مقاله:** ۲۰ بهمن ۱۳۹۰

**نوع مقاله:** علمی -پژوهشی

**موضوع:** زیست فن آوری

***کلید واژگان :***

- ✓ *Dracocephalum kotschyi*
- ✓ *تنظیم کننده های رشد*
- ✓ *ریزنمونه*
- ✓ *باززائی*

**چکیده**

**مقدمه و هدف:** در ایران 8 گونه از جنس *Dracocephalum* متعلق به تیره نعناعیان وجود دارد که اهمیت زیادی از نظر کاربرد در صنایع آرایشی، غذایی و به ویژه در صنایع دارویی دارند. *Dracocephalum kotschy* یکی از گونه های مهم انحصاری در ایران می باشد که با نام زرین گیاه مشخص می شود، در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد. به منظور بررسی اثر هورمون های مختلف رشد و ریزنمونه بر روی باززائی مستقیم زرین گیاه *D. kotschy* با استفاده از تکنیک کشت بافت، این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

**روش تحقیق:** در مطالعه حاضر تنظیم کننده رشد سیتوکینین BAP و اکسین های IBA و NAA با غلظت های متفاوت و همچنین ریزنمونه های نوک ساقه، هیپوکوتیل و برگهای کوتیلدونی در تکثیر زرین گیاه و ریزازدیادی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**نتایج و بحث:** نتایج نشان داد بهترین تیمار و ریزنمونه بر باززائی مستقیم زرین گیاه محیط کشت پایه MS حاوی ۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA بر ریزنمونه نوک ساقه می باشد. ریزنمونه های باززائی شده در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA رشد طولی داشتند و همچنین در همان محیط رشد طولی، ریزنمونه ها ریشه دار شدند. گیاهچه های ریشه دار شده سپس به مرحله مقاوم سازی منتقل شدند. پس از سازگاری گیاهچه های زرین گیاه حاصل از باززائی، ۹۵ درصد از گیاهچههای منتقل شده به گلخانه دارای رشد مناسب بودند.

**توصیه کاربردی/صنعتی:** با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان اقدام به تکثیر و تولید ماده موثره گیاه دارویی و بسیار ارزشمند زرین گیاه نمود البته یکی از مهمترین محاسن این روش جلوگیری از انقراض و حفاظت گونه در خارج از زیستگاه خواهد بود.

## ۱. مقدمه

تیره نعناعیان دارای بیش از ۳۲۰۰ گونه و حدود 200 جنس بوده که یکی از تیره های مهم گیاهی از نظر خواص دارویی و معطر می باشد و تنوع زیادی در منطقه مدیترانه دارد. در ایران 8 گونه از جنس *Dracocephalum* وجود دارند که اهمیت زیادی از نظر کاربرد در صنایع آرایشی، غذایی و به ویژه دارویی دارند *Dracocephalum kotschy* یکی از گونه های مهم انحصاری در ایران می باشد که با نام زرین گیاه مشخص می شود و در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد. زرین گیاه، گیاهی است نیمه چوبی به طول 20 سانتیمتر با ساقه های متعدد چوبی، برگهای دمبرگدار تخم مرغی شکل و گلهای سفید متمایل به زرد که گلهای این گیاه از اوایل اردیبهشت ماه ظاهر شده و تا تیرماه باقی می مانند. زرین گیاه به علت تأثیر درمانی در کاهش تب، ضد درد، ضد التهاب،



Archive of SID

www.SID.ir

درد مفاصل و روماتیسم از قدیم مورد توجه مردم مناطق تحت رویش آن بوده است. در برگ های گیاه *D. kotschy* ترکیبی به نام Spinal-z وجود دارد که از سالها پیش در درمان سرطان مورد استفاده قرار میگرفته است (Jahanian *et al*., 2005). ۹ ترکیب فلاونوئیدی از این گیاه گزارش شده است (Gohari *et al*., 2003). از اندام های این گیاه دو مونوترپن گلیکوزید جدید به همراه ۷ ترپنویید و فیتواسترول جدا شده است (Saeidnia *et al*., 2004) که به عنوان ضددرد در موش مورد آزمایش قرار گرفته است (Golshani *et al*., 2004). رشد و تکثیر این گونه گیاهی به ندرت صورت می گیرد، تکثیر و ازدیاد زرین گیاه در ایران از طریق کاشت بذور صورت می گیرد. از طرفی برخی عوامل طبیعی مانند فرسایش و غیر طبیعی مانند بهره برداری بی رویه در حال انقراض می‌باشد و به گونهای کم یاب تبدیل شده است ( نجف پورنوایی و میرزا، ۱۳۸۶).

در کشور ما بخش قابل ملاحظه‌ای از گیاهان دارویی مورد استفاده از عرصه‌های طبیعی جمع‌آوری می‌گردد که از طرفی باعث تهدید و ناپایداری ذخایر ژنتیکی برخی از گونه‌های دارویی شده است و از طرف دیگر این گیاهان که از شرایط اکولوژیک متفاوت و در زمان‌های نامناسب جمع‌آوری می‌گردند نمی‌توانند نیاز کارخانه - های داروسازی را مرتفع سازند. روند رو به رشد جمعیت و نیاز مبرم به داروهائی با منشأ گیاهی، ضرورت کشت و تولید انبوه گیاهان دارویی با ارزش و استاندارد را مشخص می‌سازد. اگر چه مواد مؤثر گیاهان دارویی تحت هدایت ژنتیکی ساخته می‌شوند، شرایط اکولوژیک مناطق رویش آنها نیز روی کمیت و کیفیت مواد مؤثره اثرات چشمگیری دارد (اطرشی و همکاران، ۱۳۹۰). بنابراین استفاده از پتانسیل‌های ژنتیکی گونه‌های بومی همچنین شرایط اکولوژیک مناسب برای پرورش گیاهان دارویی مهم و با ارزش، ضرورت دارد. لذا یافتن روشی مناسب بر اساس تکنیک های کشت بافت که در آن تکثیر انبوه و آسان این گیاه (با کیفیت مطلوب و عاری ازعوامل بیماریزا) صورت پذیرد، امری ضروری به نظر می رسد. با توجه به بومی بودن این گیاه در ایران تاکنون هیچ نوع گزارشی از باززائی و ریزازدیادی با استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی موجود نمی باشد و تنها گزارش مربوط به تحقیق اطرشی و مرادی( Otroshy & Moradi, 2011) در ارتباط با ریزازدیادی با استفاده از تکنیک کشت تک گره می باشد. در این آزمایش تکثیر زرین گیاه و باززائی مستقیم آن از طریق کشت ریزنمونه های مختلف مورد ارزیابی قرار می گیرد.

## ۲. مواد و روشها

این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور در سال ۱۳۹۰ صورت پذیرفته است. بذرهای زرین گیاه ازکلکسیون مرکز تحقیقات شهید فزوه، اصفهان تهیه شد.

### ۲-۱. آمادهسازی و کشت بذرها

به منظور ضدعفونی نمودن سطحی بذور، بذرهای زرین گیاه به مدت ۶۰ ثانیه در الکل ۹۶٪ غوطهور گردیده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۲۰٪) به همراه یک قطره توین ۲۰ درصد قرار گرفتند. در مرحله بعد بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای جوانهزنی، بذرها در یک ارلن حاوی ۵۰ میلیلیتر محیط پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) استریل کشت داده شده و در اتاق رشد تحت تناوب نوری یا فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۴۰۰ لوکس و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ هفته نگهداری شدند.

### ۲-۲. واکشت گیاهچه ها در محیط باززائی

ظروف حاوی گیاهچههای ۵-۴ هفتهای حاصل از کشت بذرها در شرایط استریل از ارلن کشت خارج شدند. در مرحله بعد، ریز - نمونههای کوتیلدون، هیپوکتیل و نوک ساقه در شرایط استریل در ظروف کشت حاوی محیط پایه MS و غلظتهای متفاوت از تنظیم - کنندههای مختلف رشد گیاهی شامل سیتوکینینهای BAP (۶-۵-۴-۳-۲-۱-۰ میلی گرم بر لیتر) و اکسین های NAA و IBA (۱-۰/۵-۰ میلی گرم بر لیتر) به همراه ۳ درصد ساکارز و ۵/۸ گرم در لیتر آگار بودند جهت باززائی مستقیم کشت شدند. عمل سترون - سازی آنها در اتوکلاو با فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۰ دقیقه انجام گردید. ریزنمونههای کشت شده در اتاق رشد با شرایط ذکر شده در بالا و به مدت ۳۰ روز نگهداری

Archive of SID

www.SID.ir

شدند. پس از آن ریزنمونههای باززائی شده به محیط رشد طولی حاوی محیط پایه MS به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA منتقل شدند. پس از ۲۰ روز گیاهچههای باززائی شده در همان محیط رشد طولی ریشه دار شدند. در نهایت صفاتی مانند درصد ریشه زائی، طول ساقه و تعداد شاخه فرعی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

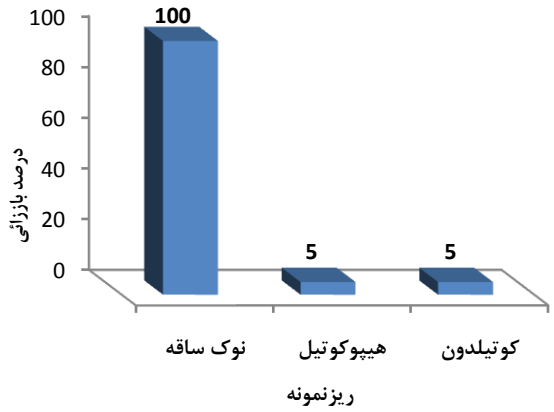
### ۳-۲. سازگار سازی و انتقال به گلخانه

قبل از کشت گیاهچههای حاصل در شرایط *In vitro* به گل-خانه منوط به انجام عمل مقاوم سازی می باشد. جهت انتقال بعدی آنها به گلخانه ضروری است. به این منظور ریشه گیاهچهها پس از خروج از ارلنها با آب شستشو داده شد، به طوری که تا محیط جامد اطراف ریشه به طور کامل حذف گردد. سپس این گیاهچهها در گلدانهای حاوی ترکیب پیتماس و کوکوپیت با نسبت ۳/۱ کشت گردیده و در اتاق رشد فیتوترون تحت شرایط رطوبت نسبی ۷۵ درصد، دمای ۲۵ °C و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس برای مدت ۲۰ روز نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت، روی گلدانها با یک لیوان پلاستیکی شفاف به مدت یک هفته پوشانده شد. در طول این دوره ۲۰ روزه گیاهان با محلول مغذی فوسامکو (با غلظت ۲ در هزار) آبیاری شدند .پس از دوره ۲۰ روزه مقاومسازی گیاهان ۱۰ تا ۱۵ برگی به گلخانه انتقال داده شدند. شرایط خاک گلخانه باید نیمهسنگین باشد. گیاهچه های مقاوم سازی شده در گلخانه و با فواصل بین گیاهچهای ۵۰ سانتیمتر کشت شدند. دمای بستر گل - خانه بین ۱۸ تا ۲۰ درجه و دمای فضای گلخانه در شب ۱۹ درجه و در روز ۲۱ درجه سانتیگراد و بهینه میزان رطوبت نسبی در این شرایط ۵۵ تا ۶۰ درصد بود.

این طرح به صورت چند آزمایش فاکتوریل مجزا با طرح پایهٔ کاملاً تصادفی و ۳ تکرار به اجرا در آمد. ظروف حاوی گیاهچه های کشت شده به صورت تصادفی (نقشه چیدن تصادفی ظروف با استفاده از برنامه نرم افزاری Excel تهیه گردید) در داخل اتاق رشد قرار گرفتند.

## ۳. نتایج و بحث

تاکنون مطالعاتی در زمینه باززایی گیاه داروئی زرین گیاه و اثر هورمون های مختلف بر ریزازدیادی آن با روشهای متنوع کشت بافت گزارش نشده است، اما از گیاهان هم تیره آن گزارشاتی متعددی موجود می باشد (Luciana & Dode, 2003; Agostini & Echeverrigaray, 2006; Ewa & Halina, 2004; Sebastiana, 2004; Irina & Constantin, 2004; Naima & Taoufik, 2007). در این مطالعه اثر غلظتهای مختلف هورمون سیتوکینین BAP به تنهایی یا در ترکیب با هورمونهای اکسین (IBA ،NAA) به محیط پایه MS در رشد ریزنمونه های زرین گیاه مورد بررسی قرار گرفت. با گذشت ۳۰ روز از کشت ریزنمونههای زرین گیاه در محیطهای مختلف، هر ریزنمونه واکنش متفاوتی را نسبت به باززائی نشان دادند (شکل ۱). به طوریکه ریز نمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی هورمونها هیچ نوع باززائی از خود نشان ندادند جوانههای باززائی شده نرمالی نداشتند و پس از مدتی تبدیل به کالوس شدند (شکل ۲).

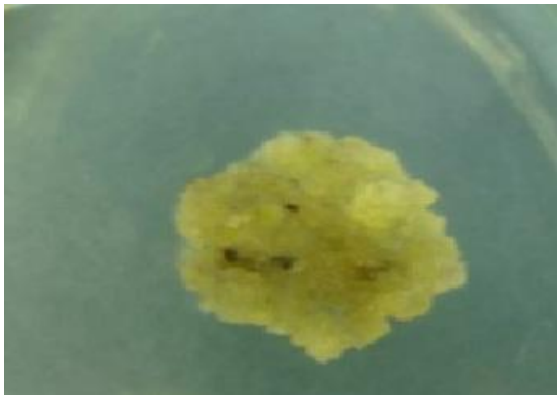



**شکل ۱:** درصد باززائی ریزنمونه های مختلف در ریزازدیادی زرین گیاه

نتیجه مهم در آزمایش ما نشان داده شد که در هفته چهارم پس از کشت حداکثر تعداد جوانه ها در محیط پایه MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر BAP و۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA بر ریزنمونه نوک ساقه به دست آمد (شکل ۳) .این نتیجه، با نتایج سایر مطالعات انجام شده توسط دیگر پژوهشگران مطابقت دارد (Luciana & Dode, 2003; Agostini & Echeverrigaray, 2006; Ewa & Halina, 2004).



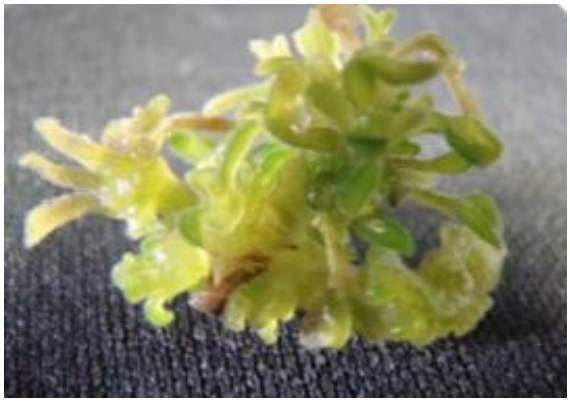
www.SID.ir



الف)

ب)

**شکل ۲.** کالوس زائی ریزنمونه های هیپوکوتیل (الف) و کوتیلدون (ب) در محیط کشت باززائی گیاه زرین گیاه



**شکل ۳.** باززائی مستقیم نوک ساقه در محیط کشت حاوی هورمون های مختلف رشد در گیاه زرین گیاه

نتایج آزمایشها نشان داد که نوع هورمونها و غلظتهای مختلف آنها اثرات متفاوتی بر صفات رشدی نظیر طول ساقه، تعداد شاخه فرعی و درصد ریشهزایی ریزنمونههای مختلف کشت شده زرین گیاه داشته است. ریزنمونه های باززائی شده در محیط کشت پایه MS حاوی هورمونهای BAP ۱ میلی گرم بر لیتر و IBA ۰/۵ میلی گرم بر لیتر رشد طولی مناسبی را نشان دادند و در همان محیط با همان ترکیبات هورمونی تمام گیاهچه ها ریشه دار شدند (شکل ۴).

**جدول ۱.** اثر هورمون های BAP, IBA, NAA بر صفات رشدی نظیر طول ساقه، تعداد شاخه فرعی و درصد ریشه زائی در ریزنمونه نوک ساقه

| BAP (mg/l) | NAA (mg/l) | تعداد شاخه فرعی | طول ساقه (cm) | درصد ریشه زائی |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۰/۲ | ۱/۶۱ b† | ۳/۴۰ c | ۴۸/ ۹ b |
| ۱ | ۰/۵ | ۱/ ۲۳b | ۳/۰۰ c | ۳۰/ ۰ bc |
| ۲ | ۰/۲ | ۲/۱۷ ab | ۱/۵۷ d | ۱۴/ ۲ d |
| ۲ | ۰/۵ | ۱/۱۶ b | ۴/۴۷ b | ۳۴/ ۴ bc |
| ۳ | ۰/۲ | ۲/ ۱۱ ab | ۳/۱۱ c | ۲۸/ ۴ c |
| ۳ | ۰/۵ | ۱/ ۷۲b | ۳/۲۲ c | ۳۲/ ۷ bc |
| ۴ | ۰/۲ | ۲/۰۰ ab | ۲/۴۰ cd | ۱۸/ ۹ d |
| ۴ | ۰/۵ | ۲/۰۱ ab | ۲/۶۱ cd | ۱۸/ ۴ d |
| ۵ | ۰/۲ | ۵/۷۱ a | ۷/۵۷ a | ۶۱/ ۳ a |
| ۵ | ۰/۵ | ۱/۱۶ b | ۵/۴۷ ab | ۳۴/ ۴ bc |
| شاهد | - | ۱/ ۰۰ c | ۲/۴۰ cd | ۱۰/ ۰۰d |

†میانگین های دارای حروف مشترک از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری نمی باشند.

www.SID.ir

**شکل ۴.** گیاهچه باززائی شده زرین گیاه در محیط رشد طولی حاوی هورمونهای اکسین و سیتوکنین

همچنین در این آزمایش نشان داده شد هورمون BAP نقش بسزائی در باززائی گیاه زرین گیاه دارد (شکل ۳). نتایج مطالعه دیگری (Irina & Constantin, 2004) نشان می دهد که BAP نقش اساسی در باززایی *Hyssopus* از خانواده نعناع دارد. در یک بررسی دیگر نیز مشخص شد که بهترین تیمار برای تولید انبوه گیاه ریحان استفاده از جوانه های ر أسی، درمحیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم بر لیتر NAA می باشد که بیشترین درصد تولید شاخساره به‌دست آمده است ( Luciana & Dode, 2003). همچنین محققان دیگر گزارش کردند که امکان ریزازدیادی گیاه Cunila از خانواده نعناع در محیط حاوی سیتوکنین ۴/۴ میکرومول در لیتر BAP بدون استفاده از اکسین وجود دارد ( Agostini & Echeverrigaray, 2006 ).

در تحقیقی دیگر ( Ewa & Halina, 2004) بیشترین باززایی گیاه مریم گلی در محیط MS به همراه هورمون های BAP با غلظت ۸/۹ میکرومول در لیتر و IAA ۲/۹ میکرومول در لیتر به دست آمد. جهت واکشت نمودن گیاهچهها از بهترین محیط حاصل از نتایج به دست آمده استفاده گردید. این امر باعث شد که در مدت زمان نسبتاً کوتاهی تعداد زیادی گیاهچه باززایی شده زرین گیاه تولید شود (شکل ۵). این گیاهچهها پس از سازگاری در اتاق رشد فیتوترون برای سازگار شدن به محیط طبیعی، به گلخانه منتقل شدند (شکل ۶).

**شکل ۵.** کشت تک گره گیاه زرین گیاه در محیط کشت MS با تیمارهای هورمونی در شرایط *in vitro*

**شکل ۶.** مرحله مقاوم سازی گیاهچه های تولیدی حاصل از کشت بافت در فیتوترون

حدود ۹۵-۹۰ ٪ از گیاهچههای تولید شده در شرایط کشت بافت مورد اشاره، در شرایط گلخانه نیز زنده ماند ند و رشد مطلوبی از خود نشان دادند (شکل ۷).

**شکل ۷.** زرین گیاه پس از مرحله مقاوم سازی و سازگاری



www.SID.ir

## ۴. نتیجه گیری

با توجه به ارزشمند بودن گیاه داروئی زرین گیاه و اهیت بالای این گیاه داروئی در درمان بیماریهای روماتیسم، ام اس، تقویت سیستم ایمنی بدن، ضد التهاب و درمان ناراحتی های گوارشی و اعصاب و همچنین کاربردهای چشمگیری که می تواند در صنعت داروسازی داشته باشد می توان از این گیاه استفادههای فراوانی کرد و متابولیت های ثانویه موجود در گیاه را استخراج نمود و در صنعت داروسازی از آن بهره مند شد. با توجه به خطر انقراض و نابودی این گیاه داروئی، یافتن روشی مناسب بر اساس تکنیک های کشت بافت که در آن تکثیر انبوه و آسان این گیاه (با کیفیت مطلوب و عاری ازعوامل بیماریزا) صورت پذیرد، امری ضروری به نظر می رسد. در این آزمایش تکثیر زرین گیاه و ریز ازدیادی از طریق کشت ریزنمونه مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد بهترین تیمار برای باززائی مستقیم زرین گیاه محیط کشت پایه MS حاوی ۵ میلی گرم در لیتر BAP و۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA میباشد. گیاهچه های ریشه دار شده سپس به مرحله مقاوم سازی منتقل شدند. پس از سازگاری گیاهچه های زرین گیاه حاصل از باززائی، ۹۵ درصد از گیاهچه ها ی منتقل شده به گلخانه زنده مانده و رشد نمودند.

## ۵. سپاسگزاری

شایسته است از جناب آقای دکترسید علی حسینی تفرشی که در ایجاد زمینه علمی و ارائه برخی از پیشنهادات علمی نهایت سپاس و تشکر را داشته باشیم.

## ۶. منابع

اطرشی، م.، توکلی دینانی، ا.، درزی، م.ت.، هاشمی، ج.، روزبه، ش. و معصومی، ا. ۱۳۹۰. تاثیر امواج فراصوت بر کارون در کالوس حاصل از کشت بافت زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.). *فصلنامه داروهای گیاهی*، ۲: ۱۳۶-۱۲۹.

نجف پورنوائی، م. و میرزا، م. ۱۳۸۶. بررسی مقایسه ای ترکیبهای شیمیائی اسانس نمونه زراعی و رویشگاهی گیاه *Dracocephalum kotschy*. *فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان داروئی و معطر ایران*، ۲۳: ۱۳۳-۱۲۸.

Agostini, G. and Echeverrigaray, S. 2006. *Micropropagation of Cunila incisa Benth., a potential source of 1,8-cineole*. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, CP 1352, CEP 95001-970, Caxias do Sul,RS, Brasil Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu 8:186-189.

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

Gohari, A., Saeidnia, S., Matsuo, K., Uchiyama, N., Yagura, T. and Michiho, K. 2003. Flavonoid constituents of *Dracocephalum kotschy* growing in Iran and their trypanocidal activity. *Natural Medicines.*, 57(6):250-252.

Golshani, S., Karamkhani, F., Monsef Esfehani, H.R. and Abdollahi, M. 2004. Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschy* in the mouse writhing test. *Journal of Pharmaceutical Sciences*., 7(1):76-9.

Irina, T., and Constantin, T. G. 2004. Histo-anatomy and *in vitro* morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae). *Acta Botany Croat.*, 63:59–68.

Jahanian, F., Ebrahimi, S.A., Rahbar-Roshandel N. and Mahmoudian, M. 2005. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschy* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry*., 66 (13):1581-92.

Luciana, B. and Dode. 2003. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences.*, 2: 435-437.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant physiology*., 15: 473–497.

Archive of SID

www.SID.ir

Naima, B., and Taoufik, K. 2007. An efficient *in vitro* plant regeneration system for the medicinal plant *Teucrium stocksianum* Boiss *Plant Biotechnology Reports*., 1: 179-184.

Sebastiana, M. 2004. *In vitro* Callus Induction and Plants from Stem and Petiole Explants of *Salvia canariensis* L. *Plant Tissue Culture.*, 14:167-172.

Saeidnia, S., Gohari, A., Ito, M. and Kiuchi, F. 2005. Bioactive constituents from *Dracocephalum kotschy*. *Zeitschrift fur Naturforschung, C-Journal of Biosciences* 60(1-2): 22-24.

Archive of SID



www.SID.ir