دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۲۱۱-۲۰۱ (۱۳۹۶)

تأثیر پوترسین و تیدیازورون بر اندام‌زایی درون شیشه‌ای گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.)

سمیرا جعفری[۱]، محمدحسین دانشور[۲]، محمدرضا صالحی سلمی[۳*] و امین لطفی جلال آبادی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ایران
۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ایران
۳*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ایران پست الکترونیک: mrsalehisalmi@gmail.com
۴- استادیار گروه زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲

چکیده

مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) یکی از با ارزش‌ترین گیاهان تیره نعناع است و بومی ایران، مدیترانه، جنوب‌شرق آفریقا، آسیای مرکزی و جنوب آمریکا گسترش است. با توجه به قوه نامیه پایین بذر و پرهزینه و وقت‌گیر بودن تکثیر رویشی آن از یکسو و از سوی دیگر حفظ ذخایر ژرم‌پلاسم این گیاه دارویی در معرض انقراض، تکثیر انبوه آن توسط تکنیک‌های کشت بافت امری ضروریست. در این مطالعه اندام‌زایی غیرمستقیم مریم‌گلی مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های برگ (۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر) و میان‌گره (۱ سانتی‌متر)، از گیاهچه‌های ۴۵ روزه رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای، در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۱۲ ترکیب مختلف از 2,4-D یا NAA به‌همراه BAP قرار گرفتند. بهترین کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. بهترین شاخه‌زایی (۵/۶۶ عدد) از کالوس‌های به‌دست آمده از ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط کشت MS حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون به‌دست آمد. بهترین رشد طولی شاخه و ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ایجاد شد و گیاهان حاصل در گلخانه سازگار شدند. این روش می‌تواند به‌منظور باززایی گیاهان پس از انتقال ژن و بدون تغییر شیمری، مورداستفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌آمین، دارویی، ریشه‌دهی، شاخه‌زایی، کالوس، کشت بافت.

مقدمه

مریم‌گلی با نام علمی *Salvia officinalis* L. از گذشته مورد توجه بشر بوده و استفاده‌های زینتی، دارویی و غذایی داشته است (Heywood, 1985). این گیاه یکی از با ارزش‌ترین گیاهان تیره نعناع است و در نواحی مدیترانه، جنوب‌شرق آفریقا، آسیای مرکزی و جنوب آمریکا گسترش دارد (Kintzios *et al.*, 1999). بخش زیادی از اسانس برگ‌ها را اسیدهای چرب، آلفا توجن و بتا توجن تشکیل می‌دهند (Taarit *et al.*, 2010). پژوهش‌ها نشان داده است که اسانس مریم‌گلی در بهبود حافظه و درمان بیماری آلزایمر اثر دارد (Perry *et al.*, *2005*). همچنین گزارش شده است که عصاره این گیاه دارای خواص ضد اضطرابی (*et al.*,

Archive of SID
www.SID.ir

Kennedy 2006)، ضدالتهابی (Baricevic *et al*., 2001)، ضد قارچی (Pinto *et al*., 2007) و ضد میکروبی (Longaray *et al*., 2007) می‌باشد. علاوه بر این مریم‌گلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته (Walch *et al*., 2011) و قند خون را کاهش داده (Eidi *et al*., 2008) و به‌علاوه دارای خاصیت تسهیل‌کننده هضم، مدر، ضدتشنج و تب‌بر است (Chien *et al*., 2011).

مریم‌گلی را می‌توان به‌وسیله بذر تکثیر کرد ولی قوه نامیه بذر آن پایین است. همچنین می‌توان از طریق رویشی آن را تکثیر کرد، که این روش نیز پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد (2004 ,Tenerife)، از سوی دیگر استفاده گسترده از گیاهان دارویی در رویشگاه‌های طبیعی موجب نابودی آن شده است و حفظ ذخایر ژرم‌پلاسم این گیاه دارویی در معرض انقراض امری ضروریست. ریزازدیادی گیاهان در معرض انقراض، یکی از روش‌های حفاظتی مؤثر و سریع برای جلوگیری از نابودی آن‌هاست (Modares *et al*., 2012). در ریزازدیادی میزان تکثیر به‌طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد. همچنین امکان تولید گیاهان عاری از پاتوژن را فراهم می‌سازد. روش‌های کشت بافت امکان تولید گیاهان بدون تنوع ژنتیکی و تولید گیاه در حد انبوه را فراهم می‌سازد (Tripathati & Tripthi, 2003). با استفاده از ریزنمونه ریشه مریم‌گلی Ghasemi Lemraski و همکاران (۲۰۱۴) در محیط کشت MS همراه با ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر (Benzyl Amino Purin) BAP مقدار زیادی کالوس تولید کردند. همچنین Azza و همکاران (۲۰۰۷) باززایی مریم‌گلی را از طریق القای کالوس در سلول‌های مریستمی بررسی کردند. آنان برای باززایی از کالوس از محیط کشت MS همراه با ۴/۴ یا ۸/۸ میکرومولار BA و ۰/۴۵ آسکوربیک اسید استفاده کردند. در همین رابطه، Liuو همکاران (۲۰۱۲) از ریزنمونه برگ *Salvia splendens* در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های ۴ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون‌های (Naphthalene Acetic Acid) NAA و BAP کالوس تولید کردند. اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر میزان القای کالوس، رویان‌زایی و باززایی شاخساره مرزنجوش توسط Hosseini و Bighamat (۲۰۱۶) مورد مطالعه قرار گرفت و در ریزنمونه برگ حداکثر القای کالوس در ریزنمونه گره در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. همچنین در بین ریزنمونه‌ها نوک شاخه و گره بالاترین درصد رویان‌زایی را داشتند.

پلی‌آمین‌های گیاهی در طیف گسترده‌ای از فرایندهای مهم از قبیل تقسیم سلولی، سنتز پروتئین و واکنش‌های مختلف مورفوژنز نقش دارند. پلی‌آمین‌ها را می‌توان به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بالقوه مورفوژنز در گیاهان تلقی کرد. مشخص‌شده است که بین دیواره سلولی و پلی‌آمین‌ها برهم‌کنش وجود دارد و ممانعت از بیوسنتز پلی‌آمین‌ها موجب جلوگیری از برخی فرایندهای مورفوژنی می‌شود (Bais *et al*., 2000). اثر پلی‌آمین‌ها در شاخه‌زایی خربزه توسط Thiruvengadam و همکاران (۲۰۱۲) بررسی شد و در نتیجه آن مشخص شد که بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت حاوی ۳ میکرومولار تیدیازورون (Thidiazuron) و ۱ میکرو مولار NAA و ۱ میکرومولار اسپرمیدین به‌دست می‌آید. در پژوهش دیگری Alessandra و همکاران (۲۰۰۹) در اندام‌زایی *Curcuma linga* L. از ترکیب پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین به‌نسبت مساوی با غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به‌همراه NAA استفاده کردند. ضمن اینکه Nurinas (۲۰۰۴) گزارش کرد که پلی‌آمین‌ها در فندق (*Corylus avellana*) تعداد جوانه‌ها و طول ساقه را افزایش داد. پلی‌آمین‌ها در تولید شاخساره از برگ گل ساعتی نیز مؤثرتر بودند (Desai & 1985 ,Mehta). اثر سایتوکینین‌ها، اکسین‌ها و پلی‌آمین‌های مختلف از قبیل پوترسین و اسپرمیدین در تکثیر درون شیشه‌ای پنبه توسط Ganesan و Jayabalan (۲۰۰۶) گزارش شد. آنان نشان دادند که غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین باعث افزایش تعداد شاخه شد. البته تاکنون پژوهشی در ارتباط با کاربرد پلی‌آمین‌ها بر اندام‌زایی غیرمستقیم مریم‌گلی گزارش نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و پلی‌آمین‌ها بر ریزازدیادی گیاه دارویی مریم‌گلی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش

جوانه‌زنی بذر و آماده‌سازی ریزنمونه

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۲ انجام شد. بذرهای مریم‌گلی را پس از ۳۰ دقیقه شستشو با آب جاری به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ و بی‌درنگ در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده، سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذرهای گندزدایی‌شده به شیشه‌های کشت (با طول ۱۵ سانتی‌متر) حاوی ۵ میلی‌متر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با pH= ۵/۸ و آگار ۰/۸٪ منتقل شدند و پس از ۷ روز شروع به جوانه‌زنی کردند. تقریباً ۲۵ روز پس از جوانه‌زنی بذر، از گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌هایی در قطعات ۱۵-۱۰ میلی‌متر تهیه شد.

شرایط کشت و محیط‌های کشت

از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و آگار ۰/۸٪ با pH= ۵/۸ استفاده شد. برای تنظیم pH از هیدروکسید پتاسیم و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال استفاده شد. کلیه شیشه‌های حاوی محیط کشت با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه، استریل شدند. ریزنمونه‌ها در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۵۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و رطوبت بین ۶۰ تا ۷۰ درصد نگهداری شدند.

القای کالوس

برای تولید کالوس از برگ و ساقه به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد، به‌این‌ترتیب که برگ‌ها از ناحیه دمبرگ گیاهان یک‌ماهه جدا شد. برگ‌ها به‌اندازه ۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر و همچنین ساقه در قطعات ۱ سانتی‌متر تهیه گردید و در محیط‌های MS حاوی ترکیبات مختلف هورمونی قرار گرفت. در این محیط‌ها از هورمون‌های NAA (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، 2,4-D (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و BAP ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. برای القاء و رشد کالوس، ریزنمونه‌ها (برگ و ساقه) در شرایط تاریکی کامل قرار داده شدند. زمان رشد کالوس مریم‌گلی در اتاقک رشد ۳۰ روز بود، ولی برای رشد بیشتر یک زیر کشت به‌مدت ۳۰ روز دیگر انجام شد و بعد درصد کالوس‌زایی اندازه‌گیری شد.

اندام‌زایی غیرمستقیم از کالوس

کالوس به‌دست آمده از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP از ریزنمونه میان‌گره در اندام‌زایی غیرمستقیم مورداستفاده قرار گرفت. از ۴ تیمار شامل تنظیم‌کننده رشد تیدیازورون (TDZ) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌تنهایی و همچنین در ترکیب با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ استفاده شد. به‌منظور ایجاد شاخساره، شیشه‌های کشت در شرایط روشنایی و دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از گذشت ۴۰ روز تعداد شاخساره و طول بلندترین شاخساره اندازه‌گیری شد.

تشکیل ریشه‌های نابجا

ساقه‌های به‌دست آمده در مرحله اندام‌زایی به‌طول ۴-۲ سانتی‌متر برای ریشه‌زایی به محیط کشت MS نیم غلظت حاوی هورمون‌های اکسین NAA و IBA با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند و پس از گذشت ۴۰ روز تعداد و طول ریشه اندازه‌گیری شد.

سازگاری

برای حذف آگار و باقیمانده کالوس، گیاهک‌های ریشه‌دار با آب مقطر استریل شسته شدند. گیاهچه سپس به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۷ سانتی‌متر حاوی مخلوط ورمی‌کولیت، شن و ماسه (۱:۱:۲) انتقال یافتند. برای حفظ رطوبت نسبی، گلدان-های پلاستیکی با کیسه‌های پلی‌اتیلن شفاف پوشیده و در دمای

Archive of SID

www.SID.ir

۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۲۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه به‌مدت ۲ هفته در اتاق رشد نگهداری شدند. پس از ۳ هفته گلدان‌ها به محیط نیمه سایه با شدت نوری ۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل و در هفته چهارم به گلخانه منتقل گردیدند.

طرح آزمایشی و واکاوی داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تمامی آزمایش‌ها ۳ تکرار و در هر تکرار از ۲۵ ریزنمونه استفاده شد. واکاوی داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد. میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه و شکلها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

اثر نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر تشکیل کالوس

اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد تولید کالوس در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل دو عامل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر تشکیل کالوس در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اختلاف معنی‌داری میان نوع ریزنمونه از نظر درصد تشکیل کالوس وجود داشت و ریزنمونه‌های میانگره کالوس بیشتری تولید کردند. زمانی‌که NAA در ترکیب با BAP در محیط کشت اضافه شد، به‌طور قابل‌توجهی درصد تشکیل کالوس افزایش یافت (نمودار ۱، شکل ۱- A). در همین رابطه Rajeswaril و Paliwal (۲۰۰۸) مقایسه‌ای بین ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، دمبرگ و کوتیلدون *Albizia odoratissima* انجام دادند و بهترین پاسخ از نظر درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه اپی‌کوتیل در محیط کشت MS همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد. درحالی‌که بالاترین تعداد شاخه در هر ریزنمونه در محیط کشت MS همراه با ۷ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. ریزنمونه‌های مختلف در گیاه خار مریم توسط Gikloo و همکاران (۲۰۱۲) بررسی شد و بهترین نتیجه کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ به‌دست آمد. در مقابل در گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) بین ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه، بهترین منبع برای تولید کالوس با بافت فشرده و بهتر، ریزنمونه کوتیلدون بود (Neena & Pardha Sarathi,1992).

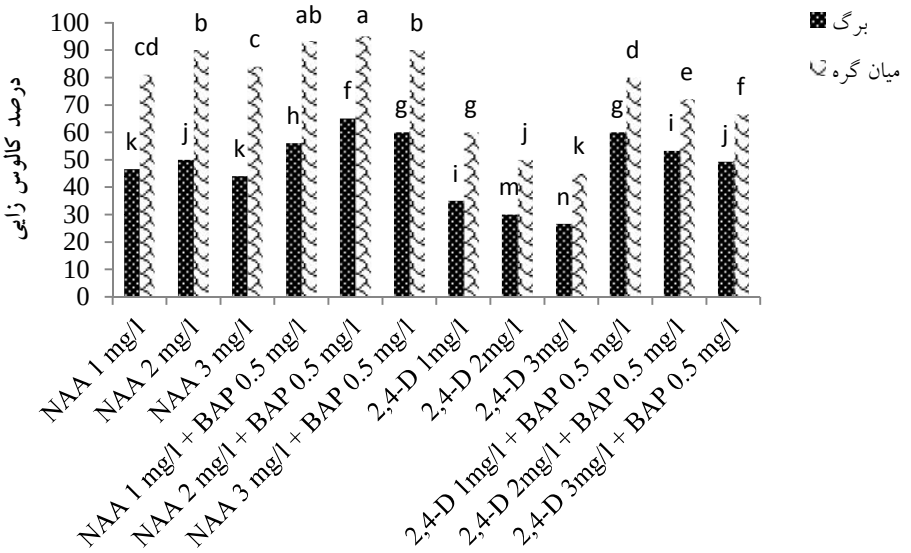
نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد نیاز برای حداکثر درصد القای کالوس با نوع ریزنمونه متفاوت بود. حداکثر تولید کالوس (۹۵٪) از ریزنمونه میانگره، زمانی که در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار داده شد به‌دست آمد. درحالی‌که در ریزنمونه برگ، حداکثر تولید کالوس (۶۵٪) در محیط کشت حاوی همان تنظیم‌کننده‌های رشد به‌دست آمد (نمودار۱). پاسخ‌های مختلف ریزنمونه‌ها روی یک محیط کشت ممکن است به‌دلیل تفاوت در سطح درون‌زای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ریزنمونه‌های مختلف باشد (Quoirin *et al.*,1998). بدیهی است، مورفولوژی کالوس در میان ریزنمونه‌های مختلف متفاوت است. کالوس‌های تشکیل‌شده از میانگره دارای رنگ سبز، بافت فشرده و سریع‌الرشد بود، درحالی‌که کالوس‌های تشکیل‌شده از برگ سبز مایل به سفید، بافت نرم و کند رشد بودند. با توجه به سرعت رشد، اندازه کالوس پس از ۴۵ روز از کشت، در ریزنمونه میانگره بزرگ‌تر از برگ بود.

اندام‌زایی غیرمستقیم از کالوس

نتایج نشان داد که اثر محیط‌های کشت اندام‌زایی روی تعداد و طول بلندترین شاخساره معنی‌دار بود. اثر نوع محیط کشت بر تعداد شاخه باززایی شده نشان داد که بیشترین تعداد شاخه تولیدشده مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین (۵/۶۶ عدد) بود، که اختلاف معنی‌داری با تعداد شاخه تولیدشده در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین نداشت (شکل۲).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- القای کالوس از ریزنمونه‌های برگ و میانگره در شرایط کشت درون شیشه‌ای در محیط کشت MS حاوی اکسین و سیتوکینین، پس از ۴۵ روز ، ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

اثر محیط‌های کشت باززایی بر طول بلندترین شاخساره نشان داد که بیشترین اثر بر این شاخص مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پوتریسین (۲/۶۶ سانتی‌متر) بود، با این‌حال بین این تیمار با محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل۳). تیدیازورون فعال‌ترین ماده شبه سیتوکینینی است (Huetteman & Preece, 1993) که باعث شاخه‌زایی و تولید جوانه‌های نابجا می‌شود *et* (Murthy *al*.,1998). سطوح بهینه آن برای باززایی شاخه وابسته به ژنوتیپ گیاه و نوع ریزنمونه می‌باشد (Tomsone & Gertnere, 2003). پوترسین ازجمله پیش‌سازهای اصلی پلی‌آمین‌ها در گیاه می‌باشد که در فرایندهای مختلف مانند تکثیر سلول، رشد، ریخت‌زایی و تمایز نقش دارد (*et al*., Ali 2009). مقادیر بالای پلی‌آمین‌ها باعث تحریک تقسیم سلولی و افزایش رشد می‌شود (Egea-Cortines & Mizrahi, 1991). نتایج این پژوهش نشان داد که تعداد و طول شاخساره با افزودن پوترسین به محیط کشت حاوی تیدیازورون نسبت به محیط کشت دارای تیدیازورون به‌تنهایی افزایش پیدا کرد و بیشترین تعداد و طول شاخساره در غلظت پایین پوترسین همراه با تیدیازورون به‌دست آمد و با افزایش غلظت پوترسین، تعداد و طول شاخساره کاهش یافت. در همین‌رابطه Ali و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که پوترسین در غلظت‌های مناسب بر محتوای پروتئین گیاه و تمایز سلول اثر می‌گذارد ولی افزایش آن تأثیری بر رشد و تمایز آن ایجاد نمی‌کند. در ضمن Walden و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند پلی‌آمین‌ها در ایجاد شاخساره نقش دارند ولی اثر پلی‌آمین اسپرمیدین در شاخه‌زایی خیار گزارش شده است (Vasudevan *et al*., 2008). همچنین اثر دیگر پلی‌آمین‌ها مانند پوترسین و اسپرمین در تشکیل شاخساره‌های نابجا از کوتیلدون خیار نیز گزارش شد (Zhu & Chen, 2005). در همین رابطه Bais و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که کاربرد پلی‌آمین پوترسین باعث کاهش اتیلن ناخواسته و افزایش مورفوژنز می‌شود. افزایش اثر پلی‌آمین‌ها در افزایش طول ساقه و تعداد جوانه در هر ساقه مربوط به اثر تحریکی در تقسیم سلولی و یا به کاهش تولید اتیلن (2000 Bais *et al*.,) نسبت داده شد. پلی‌آمین‌ها ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یا پیام‌برهای هورمونی ثانویه

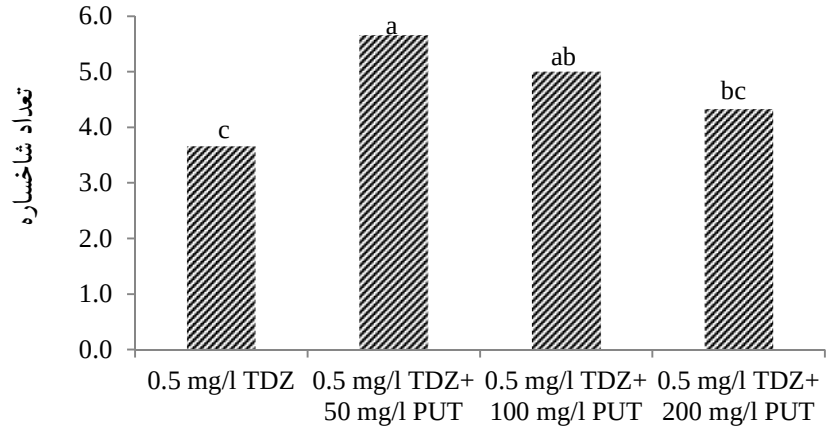
Archive of SID

www.SID.ir

عمل‌کنند (Bagni & Torrigiani, 1982). پوترسین در متابولیسم‌های ثانویه و اولیه، پیش ماده‌ای معمول است و می‌تواند به پلی‌آمین‌های دیگری همانند اسپرمیدین و اسپرمین تبدیل شود و همراه با این ترکیبات در فرایندهای متابولیسمی اولیه ضروری مربوط به نمو و رشد گیاه شرکت کند (Paschalidis & Roubelakis-Anelakis, 2005).

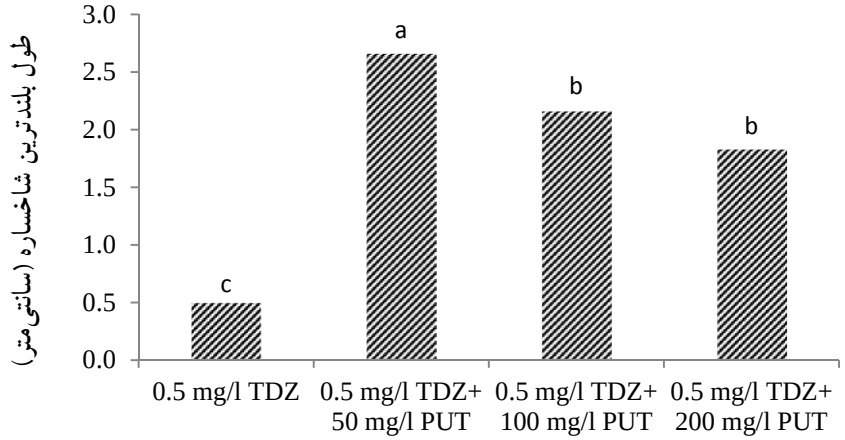
ریشه‌زایی از ساقه‌های باززایی شده

ساقه‌های برگ‌دار برای ریشه‌زایی به محیط کشت MS نیم-غلظت حاوی مقادیر مختلف IBA و NAA انتقال داده شدند. ۴۵ روز پس از قرار گرفتن ساقه‌ها در محیط کشت تشکیل ریشه از بخش پایه آنها مشاهده شد. درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر ساقه اندازه‌گیری شد.



شکل ۲- اثر تیدیازورون و پوتریسین بر باززایی غیرمستقیم بر تعداد شاخساره

ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

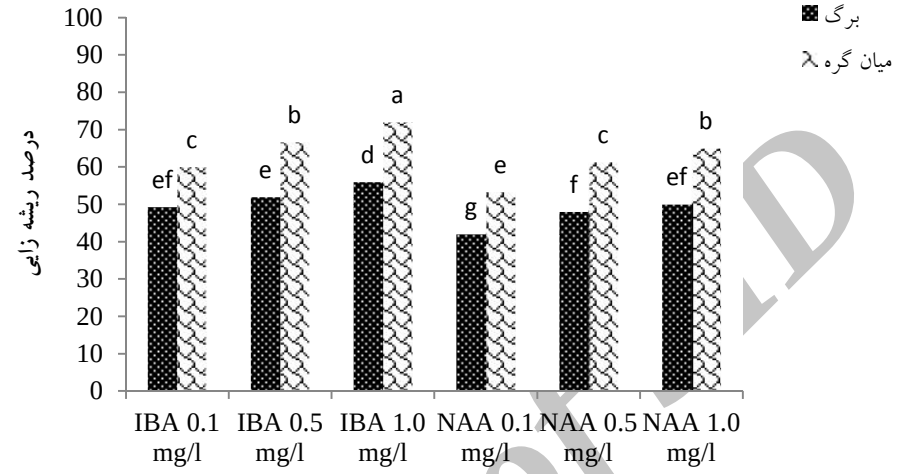


شکل ۳- اثر تیدیازورون و پوتریسین بر طول بلندترین شاخساره ، ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

در بسیاری از محیط‌های کشت پس از ۲۰ روز ریشه‌زایی از ساقه شروع شد. بنابراین داده‌ها برای درصد ریشه و تعداد ریشه پس از ۴۵ روز از کشت ثبت شد. تفاوت معنی‌داری در پاسخ به ریشه‌زایی ساقه‌های کوچک ایجادشده از ریزنمونه میانگره و برگ مشاهده شد اما بیشترین درصد ریشه‌زایی (۷۲٪) و حداکثر تعداد ریشه (۳/۹) در ساقه‌های به‌دست آمده از ریزنمونه ساقه مشاهده شد (شکل ۴، شکل ۵، شکل ۶-D). محیط کشت MS نیم

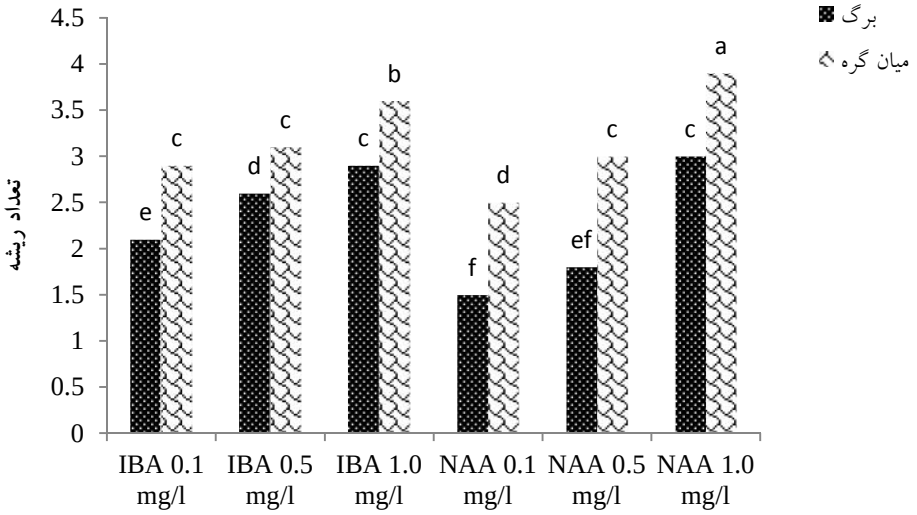
www.SID.ir

غلظت همراه با غلظت بالای IBA در شرایط کشت درون شیشه‌ای برای ریشه‌زایی از ساقه‌های حاصل از کالوس میانگره بهتر بود. در گونه‌ای از بلوط به نام *Quercus leucotrichophora* ریشه‌های زیادی با استفاده از IBA توسط Pandey و Sushma (۲۰۱۲) به‌دست آمد. باوجوداین NAA ریشه‌های ضعیفی در سطح کالوس ایجاد کرد. نتایج مشابهی در پژوهش‌های Shriram و همکاران (۲۰۰۸) در گیاه *Helicteres isora* L. ، Hoseinpanahi و همکاران (۲۰۱۶) در گیاه سیاهدانه و Nowruzian و همکاران (۲۰۱۶) در گیاه آنغوزه به‌دست آمد.



شکل ۴- درصد ریشه‌زایی از ساقه‌های رشد کرده در شرایط کشت درون شیشه‌ای در محیط کشت MS حاوی اکسین

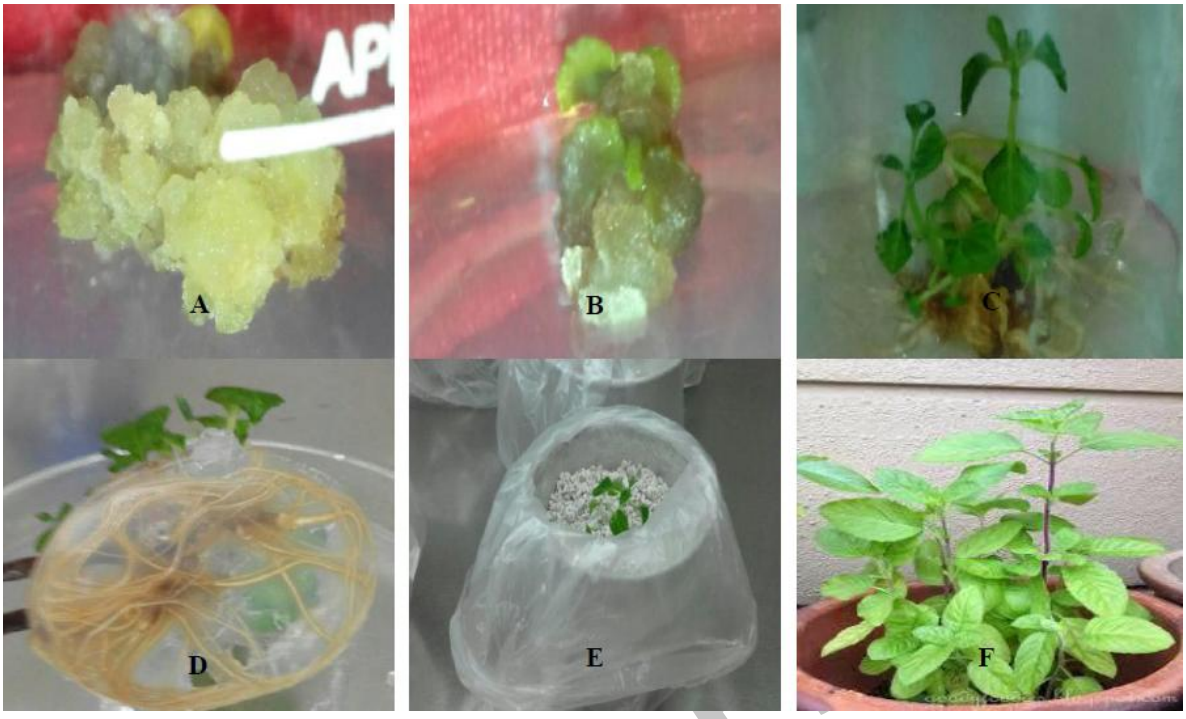
ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۵- تعداد ریشه تشکیل‌شده از ساقه‌های رشد کرده در شرایط کشت درون شیشه‌ای در محیط کشت MS حاوی اکسین

ستون‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir



شکل ۶- مراحل اندام‌زایی غیرمستقیم در مریم‌گلی

سازگاری

گیاهک‌های ایجادشده در شرایط کشت درون شیشه‌ای به مخلوط خاک، ماسه و ورمی‌کولایت با نسبت (۱:۱:۲) انتقال داده شدند و در اتاقک رشد زیر پوشش پلاستیکی به‌مدت ۳۰ روز نگهداری شدند، سپس به‌تدریج پلاستیک‌ها حذف شدند تا رطوبت کمتر شود. در طول مراحل سازگاری ۸۰ ٪ از گیاهان باقی ماندند. گیاهک‌ها با محیط کشت پایه MS ۱/۴ قدرت بدون ساکارز و میواینوسیتول در فواصل ۳ روز به‌مدت ۳ هفته تغذیه شدند (شکل ۶-E). گیاهک‌های سازگار شده به گلدان محتوی خاک انتقال داده شدند و قبل از اینکه به زمین اصلی انتقال داده شوند به‌مدت ۵ هفته در سایه نگهداری شدند، بیش از ۹۵٪ گیاهک‌ها به خاک انتقال‌یافته زنده ماندند (شکل ۶-F). در گیاه *Albizia odoratissima*، Rajeswari و Paliwal (۲۰۰۸) ۷۵٪ زنده‌مانی را در بستر ورمی‌کولایت به‌دست آوردند، درصورتی‌که Ndiaye و همکاران (۲۰۰۶) در گیاه *Bambusa vulgaris* ۱۰۰٪ زنده‌مانی را در گلدان‌های محتوی پیت و پرلایت به‌دست آوردند. پس از یک ماه، گیاهک‌های ریشه‌دار شده به گلدان بزرگ‌تر حاوی همان خاک انتقال و بعد به گلخانه منتقل شدند. گیاهان باززایی شده نسبت به گیاه مادری تنوع قابل تشخیص در ویژگی‌های مورفولوژیک نداشتند.

نتیجه‌گیری

این بررسی یک پروتکل ساقه‌زایی، ریشه‌زایی نابجا و سازگاری گیاه دارویی مریم‌گلی می‌باشد. به‌طورکلی، بر اساس نتایج این پژوهش برای ریزازدیادی مریم‌گلی استفاده از غلظت‌های تعیین‌شده تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی پیشنهاد می‌شود. همچنین برخلاف بیشتر تحقیقات انجام‌شده پیشین روی مریم‌گلی، پلی‌آمین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی بسیار مناسب برای افزایش تقسیم سلولی و مورفوژنز روی محیط کشت معرفی می‌شوند. روش ارائه‌شده در این پژوهش می‌تواند علاوه بر تکثیر گیاه برای حفظ ژرم‌پلاسم و انتقال ژن استفاده شود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع مورداستفاده

- Alessandra, F.M., Marco, A.O., Armando, R.T., Fabio, V. and Giuseppina, P.P.L., 2009. Endogenous and exogenous polyamines in the organogenesis in *Curcuma longa* L. Scientia Horticulturae, 121 (4): 501-504.
- Ali, R.M., Abbas, H.M. and Kamal, R.K., 2009. The effect of treatment with polyamines on dry matter and some metabolites in salinity stressed chamomile and sweet majoram seedlings. Plant and Soil Environment, 55 (11): 477-483.
- Azza, A., Tawfic, M. and Mohamed, F., 2007. Regeneration of Salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 43 (1): 21-27.
- Bagni, N. and Torrigiani, P., 1982. Polyamines: A new class of growth substances. Progress in plant growth regulation, 13: 264-275.
- Bais, H.P., Sudha, G. and Ravishankar, G.A., 2000. Putrecine and Silver nitrate influence shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknowlocal. Plant Growth Regulator, 19 (2): 238-248.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B. and Krasna, A., 2001. Topical inflammatoty activity of *Salvia officinalis* L. Leaves: the relevance of ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology, 75 (2-3): 125-132.
- Chien, C.F., Wu, Y.T. and Tasi, T.H., 2011. Biological analysis of herbal medicines used for the treatment of liver diseases. Biomedical Chromatography, 25(1-2): 21-38.
- Desai, H.V. and Mehta, A.R., 1985. Changes in polyamine levels during shoot formation, root formation and callus induction in cultured Passiflora leaf discs. Journal of Plant Physiology, 119 (1): 45-53.
- Egea-Cortines, M. and Mizrahi, Y., 1991. Polyamines in cell division, fruit set and development, seed germination. In: R.D., Slocum. and H. Flores. (eds.) Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants, 143-158.
- Eidi, A., Eidi, M. and Badie, M., 2008. Antinociceptive effect of *Salvia officinalis* L. leaf essential oil using formalin test in male mice. Journal of Medicinal Plants, 7(4): 94-99.
- Ganesan, M. and Jayabalan, N., 2006. Influence of cytokinins, auxins and polyamines on *in vitro* mass multiplication of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2). Indian Journal of Exprimental Biology, 44 (6): 506-513.
- Ghasemi Lemraski, M., Eftekhari, M., Faraji, M. and Samadi Zarrini, S., 2014. Study of Callus Induction in common sage (*Salvia Officinalis* L.). International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 7(7): 386-389.
- Gikloo, T.S., Elhami, B. and Khosrowchahli, M., 2012. Effects of explants type, plant growth regulators and activated charcoal on direct organogenesis of *Silybum marianum*. African Journal of Biotechnology, 11: 9023– 9027.
- Heywood, V.H. 1985. Flowering plants of the world. Oxford University Press. pp 309–311.
- Hosseini, B. and Bighamat, A., 2016. Effects of different concentrations of growth regulators and explants type on callus induction, embryogenesis and shoot regeneration of *Origanum vulgare* ssp. *Gracile*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24: 264-276.
- Hoseinpanahi, S., Majdi, M. and Mirzaghaderi, Gh., 2016. Effects of growth regulators on *in vitro* callogenesis and regeneration of black cumin (*Nigella sativa*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24: 232-242.
- Huetteman, C.A. and Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 33 (2): 105-119.
- Kennedy, D.O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E.J., Milne, A. and Scholey, A.B., 2006. Effect of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis* L.) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. Neuropsychopharmacology, 31(4): 845-852.
- Kintzios, S., Nicolaou, A. and Skoula, M., 1999. Somatic embryogenesis and *in vitro* rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *Salvia friticosa* leaf callus cultures. Plant Cell Reports, 18 (6): 462-466.
- Liu, H., Guoping, Z., Guozheng, S., Songlin, R. and Qiaojuan, F., 2012. Callus induction and plant regeneration from mature seeds of *Salvia splendens*. International Journal of Agriculture and Biology, 14 (3): 445-452.
- Longaray, P., Delamare, A., Moschen-Pistorello, I., Liaane, A., Lusiana, A. and Echeverrigaray, S., 2007. Antibacterial activity of the rssential oils *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chemistry, 100

Archive of SID

www.SID.ir

- Rajeswari, V. and Paliwal, K., 2008. *In vitro* adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from seedling explants of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth.) *In vitro* Cellular and Development Biology-Plant 44: 78–83.
- Shriram, V., Kumar, V. and Shitole, M.G., 2008. Indirect organogenesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 44: 186–193.
- Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B., 2010. Changesin fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl strees. Food Chemistry, 119 (3): 959-951.
- Tenerife, L., 2004. *In vitro* callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis*. Plant Tissue Cultre, 14(2): 167-172.
- Thiruvengadam, M., Chung, I. and Chun, S., 2012. Influence of polyamines on *in vitro* organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia* L.). Journal of Medicinal Plants Research, 6(19): 3579-3585.
- Tomsone, S. and Gertnere, D., 2003 *In vitro* shoot regeneration from flower and leaf explants in Rhododendron. Biologia Plantarum, 46 (3): 463-465.
- Tripthi, L. and Tripathati, J.N., 2003. Role of biotechnology in mediacinal plants. Pharmaceutical Reserch, 2 (2): 243-253.
- Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapthi, A., Kasthurirengan, S., Ramesh Anbazhagan, V., Manickavasagam, M. and Choi, C.W., 2008. Leucine and spermidine enhance shoot differentiation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *In vitro* Cellular and Developmental Biology, 4: 300-306.
- Walch, S.G., Tinzoh, L.N., Zimmermann, B.F., Stuhlinger,W. and Lachenmeier, D.W., 2011. Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality Indicators for aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). Frontiers in Pharmacology, 19: 72-79.
- Walden, R., Cordeiro, A. and Tiburcio, A.F., 1997. Polyamines: Small molecules triggering pathways in plant growth and development. Plant Physiology, 113: 1009-1013.
- Zhu, C. and Chen, Z., 2005. Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81: 45-53.

(2): 603-608.

- Modares, M., Lahuti, M., Gangali, A. and Asili, G., 2012. Studies micropropagation *Salvia leriifolia* using cultured. Journal of Plant Biology, 14 (4): 89-100.
- Murthy, B.N., Murch, S.J. and Praveen, K., 1998. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. Biologica Plantarum, 34 (4): 267-275.
- Ndiaye A., Diallo, M.S., Niang, D. and Gassama-Dia, Y.K., 2006. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. African Journal of Biotechnology, 5 (3): 1245-1248.
- Neena, K. and Pardha Sarathi, P., 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L. Plant Cell Reports, 11: 476-479.
- Nurinas, M., 2004. Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 28: 189-194.
- Nowruzian, A., Masoumian, M., Ebrahimi, M.A. and Bakhshi Khaniki, G.R., 2016. Micropropagation of *Ferula assa-foetida* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24: 123-133.
- Pandey, A. and Sushma, T., 2012. Influence of kinetin on *in vitro* rooting and survival of banj oak (*Quercus leucotrichophora* L.). African Journal of Biotechnology, 1: 12538-12545.
- Paschalidis, K.A. and Roubelakis-Anelakis, K.A., 2005. Spatial temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacoo plant. Plant Physiology, 138(1): 142-152.
- Perry, E.K., Pickering, A.T., Wang, W.W., Houghton, P.J. and Perry, N.S.L., 2005. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. Journal of Pharmacological. 51 (5): 527–534.
- Pinto, E., Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Palmeira, A., and Goncalves, J., 2007. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi of essential oils of *Salvia officinalis*. Industrial Crops and Products, 26(2): 135-141.
- Quoirin, M., Bittencourt, M.J., Zanette, F. and De Oliveria D.E., 1998. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured *in vitro*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 10: 101-105.

Archive of SID

www.SID.ir

Influence of putrescine and thidiazuron on *in vitro* organogenesis in *Salvia officinalis* L.

S. Jafari[1], M.H. Daneshvar[2], M.R. Salehi Salmi[3*] and Amin Lotfi Jalal-Abadi[4]

1- M.Sc., Department of Horticulture Science, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, I.R. Iran.
2- Prof., Department of Horticulture Science, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, I.R. Iran,
3*- Corresponding author, Assist. Prof., Department of Horticulture Science, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, I.R. Iran. Email: mrsalehisalmi@gmail.com
4- Department of Agronomy, Ramin University of Agriculture and Natural Resources, Khoozestan, I.R. Iran

Received: 05.02.2017 Accepted: 21.04.2017

Abstract

In this study, an indirect organogenesis regeneration protocol for Salvia officinalis L. is described. Leaf (0.5 × 0.5 cm) and internode (1 cm in length) explants sections, from 45 day old in vitro germinated plant, were cultured in Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 12 different combinations of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) or 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzylaminopurine (BAP). The best calli induction response was observed when 1 mg/l NAA and 0.5 mg/l BAP combination was applied to the internode explants. Also, results showed an interesting possibility for the stimulation of shoot regeneration (5.66) through internode segments cultured on MS medium containing 50 mg/l putrescine and 0.5 mg/l TDZ. Shoot elongation and rooting were achieved on MS medium with 1mg/l IBA. Excellent acclimatization to greenhouse conditions was observed for all transferred plantlets. By this procedure no morphological differences were observed between the regenerated and mother plants. This protocol may be also utilized to carry out plant regeneration after genetic transformation, in order to develop transformed plants without the presence of chimeric zones.

Keywords: Callus, Medicinal, Polyamine, Rooting, Shoot regeneration, Tissue culture.

Archive of SID

www.SID.ir