مطالعه کشت بافت و اندام‌زایی در گیاه دارویی *Salvia nemorosa*

پریسا اورمزدی[1] و فیروزه چلبیان[1]

۱- دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، E-mail: Chalabian1969@yahoo.com

چکیده

گیاه *Salvia nemorosa* از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که دارای مصارف خوراکی، دارویی و زینتی می‌باشد. با توجه به عدم وجود اطلاعاتی در مورد کشت بافت این گیاه، کشت بافت و اندام *S. nemorosa* جهت ریزازدیادی آن بر روی محیط کشت مناسب صورت گرفت. کشت در شیشه این گیاه در محیط کشت MS با مقادیر مختلف هورمونی انجام شد. قطعات ریشه، محور زیر لپه، برگ و مریستم رأسی از دانه‌رست‌های سترون رشد یافته در محیط کشت MS فاقد هورمون، به عنوان جداکشت مورد استفاده قرار گرفت. جداکشت‌های برگ و مریستم رأسی در محیط کشت MS حاوی NAA $5mgl^{-1}$ و 2ip $5mgl^{-1}$، کالهای متراکم و سبز رنگ تشکیل دادند و بعد اندام‌زایی (تشکیل برگ و ریشه) کردند. محیط کشت MS دارای IBA $5mgl^{-1}$ و Kin $5mgl^{-1}$ تنها بر روی جداکشت‌های برگی مناسب بوده و قطعات کشت شده پس از کال‌زایی، اندام‌های برگی بوجود آوردند. درمحیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و 6-BAP $2mgl^{-1}$ جداکشت‌های مریستم رأسی پس از کال‌زایی اندام‌های برگ و ساقه را تولید کردند و با واکشت نمونه‌ها در محیط کشت تازه، تشکیل گیاه کامل صورت گرفت. این محیط کشت هورمون‌دار بهترین محیط برای گیاه *S. nemorosa* نسبت به دو محیط کشت دیگر محسوب شد. در محیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و 2ip $5mgl^{-1}$ محور زیر لپه کالهای زرد رنگ تولید نموده ولی جداکشت‌های ریشه‌ای بدون تولید کال باقی ماندند. در محیط کشت MS دارای IBA $5mgl^{-1}$ و Kin $5mgl^{-1}$ جداکشت‌های محور زیر لپه، کالهای زرد رنگ و جداکشت‌های ریشه‌ای با تولید کالهای سبز رنگ بدون تغییر در محیط باقی ماندند.

واژه‌های کلیدی: *Salvia nemorosa*، نعناعیان، کشت بافت، اندام‌زایی، کال و باززایی گیاه

مقدمه

جنس *Salvia* متعلق به تیره نعناعیان (lamiaceae) با پراکنش وسیع و گونه‌های متعدد یکی از بزرگترین دسته‌های گیاهی معطر و دارویی می‌باشد. این جنس در نقاط مختلف ایران حدود ٥٦ گونه و در جهان نزدیک به ۹۰۰ گونه دارد که عمده آنها در غرب آسیا، آمریکا به ویژه منطقه مکزیک و شمال آفریقا می‌باشند.

به طور اختصاصی گونه *S. nemorosa* در اکثر نقاط ایران از جمله: خوی، ارومیه، شرفخانه، مهاباد، تبریز، اردبیل، مرند، کوههای سبلان، میانه، زنجان، تاکستان، همدان، اراک، گلپایگان، دورود، خرم‌آباد، بروجرد، کوه بینالود، دامغان، سمنان، فیروزکوه، بستام، تهران، دره الموت، دره لار، توچال، شمشک، دیزین، دماوند، ساوه، طالقان، کرج، قزوین و تنگه گل در پارک گلستان و ... یافت می‌شود و زمان گلدهی آنها از اردیبهشت تا اواخر تیرماه می‌باشد (قهرمان، ١٣٦٥a،b). *Salvia* به دلیل داشتن کرکهای ترشحی که سرشار از روغن‌های اتری و اسانس می‌باشند به عنوان گیاه زینتی، دارویی، مغذی و معطر کاربرد دارد. وجود انواع ترپن‌ها در این جنس آن را به عنوان یک گیاه دارویی مفید، مجزا ساخته است و با بررسیهای انجام شده بر روی این گیاه اخیراً مشخص شده است که بعضی ترکیبهای سالویا، سنتز DNA در سلول را کاهش می‌دهند و از همین خاصیت برای شناسایی و درمان سرطان می‌توان استفاده کرد (Ozdamir & Sensel, 1999).

پیشینه تاریخی گیاه *Salvia*

این گیاه دارای پیشینه تاریخی و کاربردی بسیار قدیمی حتی دورتر از نعناع می‌باشد. به‌ویژه در مکزیک پیش از

اینکه مستعمره اسپانیا گردد و ذرت گیاه غالب منطقه شود، *Salvia* گیاه خوراکی و مقدس مردم این منطقه بود، به‌طوری‌که از تمام اجزای سالویا استفاده خوراکی و دارویی می‌شد. در حال حاضر نیز کاربرد خود را هنوز تا حدودی حفظ نموده، به‌عنوان مثال از لعاب دانه‌های گونه *S. hispanica* در مکزیک در منطقه‌ای به نام Cordova نوشابه‌های مفرح تهیه می‌شود و اسم عامی این دانه‌ها در این منطقه، chilo است. همچنین در بعضی از قبایل بومی مکزیک از بخور*S. divinorum* برای رفع چشم زخم استفاده می‌شود که البته این گونه سالویا به شدت تخدیر کننده است و شیره آن همچون ماری‌جوآنا و LSD عمل می‌کند و به همین دلیل کشت و مصرف آن در ایالات مختلف آمریکا نیاز به مجوز دارد (InformationBulletin, 2003) در افغانستان و پاکستان از دم کرده برگهای *S. cabulica* جهت رفع عرق شبانه و تب‌بر استفاده می‌شود. در چین، منچوری و ژاپن از دم کرده ریشه *S. miltiorhiza* برای مرتفع ساختن دردهای معده و رفع سوءهاضمه استفاده می‌گردد. اخیراً در کشورهای اروپای جنوبی و آلمان برگهای تازه سالویا به خصوص گونه *S. officinals* جهت معطر و ترد ساختن انواع گوشت و همچنین نوشیدنی‌ها بکار می‌رود. از سوی دیگر این گیاه به دلیل کرکینه پوش بودن، ظاهری نقره‌ای و درخشنده دارد که بسیار فریبنده بوده و برای تزیین در باغها کشت می‌گردد، همچنین توسعه سیستم ریشه‌ای آن به گونه‌ای است که به حاصلخیزی خاک کمک می‌کند. در ضمن به دلیل داشتن تنوع رنگی در جام گل، نوش فراوان و شکل و ظاهر فریبنده خود به شدت مورد پسند و توجه حشرات به ویژه زنبورهای عسل می‌باشد که عسل حاصل از این گیاه بسیار معطر و سرشار از خواص دارویی و مؤثر بر بیماریهای معده و دستگاه گوارش است (زرگری ۱۳۷۲، کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی، ۱۳۸۱ و Newall *et al*, 1996).

خواص درمانی گیاهان *Salvia*

استفاده درمانی از این گیاه به زمانهای خیلی قدیم نسبت داده می‌شود. در قرون وسطی مردم آنرا داروی همه دردها می‌دانستند. طرفداران مکتب سالرن (Salerne) برای آن اثرات درمانی شگفت‌انگیز قائل بودند. از عمده خواص درمانی این گیاه که با ارزش‌ترین گیاه دارویی تیره نعناع محسوب می‌شود و اثرات درمانی قاطع دارد، به شرح زیر است: برگ آن به علت دارا بودن اسانس، دارای اثر نیرودهنده و به سبب داشتن تانن مقوی است، به‌علاوه دارای خاصیت تسهیل‌کنندگی عمل هضم، مدر بودن، ضد تشنج، تب بر، ضدعفونی کننده، کم کننده قند خون و قاعده‌آور می‌باشد. در استعمال خارجی آن جهت التیام و ضدعفونی کردن زخم‌ها و جراحات استفاده می‌شود. معمولاً برگ این گیاه را به صورت عصاره آبی یا به شکل تنتور و به‌ندرت به صورت دم کرده در رفع التهاب لثه و لوزه مورد استفاده قرار می‌دهند و باعث از بین رفتن آلودگی‌های مخاط دهان، درمان آفت (Aphte) و پرخونی لثه‌ها ناشی از کمبود ویتامین C در بدن می‌شود، چون به شدت دارای خاصیت باکتریواستاتیک می‌باشد. مصرف فرآورده‌های این گیاه موجب فعال شدن اعمال گردش خون و پوست بدن می‌گردد به‌علاوه بر روی دستگاه هضم تأثیر مفید می‌نماید. پزشکان قدیم مانند Cazin و پزشکان معاصر مانند دکترLeclerc آنرا در رفع ضعف مفرط منشأ عصبی، ضعف اعصاب، خستگی عمومی، سرگیجه‌های عصبی، لرزش اندام‌ها و فلج مؤثر تشخیص داده‌اند. استفراغهای تشنج‌آور، آرام می‌شود و اسهال‌های ساده ولی مقاوم درمان می‌پذیرد، به‌علاوه سرفه‌های مزمن قطع و ترشح شیر، در موقع از شیر گرفتن کودک، متوقف می‌گردد. همچنین در درمان بیماری‌های نقرس، رماتیسم‌های مزمن، سردردهای منشأ عصبی، آب آوردن و خیز اعضاء مؤثر می‌باشد. استعمال خارجی، برگ و سرشاخه‌های گلدار گیاه اثر ضدعفونی کننده دارند. به‌علاوه بهترین داروی موضعی جهت حفاظت و

جلوگیری زخم‌ها و جراحات، از آلودگی‌ها می‌باشد. اثر التیام دهنده آن نیز قوی است، ریشه این گیاه طعمی تلخ و قابض دارد و برای درمان دردهای معدی، رفع التهاب سینه و پستان استفاده می‌شود. از لعاب دانه‌های گیاه *Salvia* در درمان درد چشم، اسهال‌های ساده، رفع التهاب و ترشح چرکین مجرای دفع ادرار در سوزاک و معالجه بواسیر استفاده می‌شود (چلبیان و همکاران، ١٣٨٢، زرگری، ١٣٧٢ و کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی، ١٣٨١). شایان ذکر است که این گیاه به واسطه داشتن ترکیب سمی‌توجون در مقادیر زیاد ایجاد مسمومیت کرده و باعث افزایش ضربان قلب، بالا رفتن دمای بدن و سرگیجه می‌شود (مهرابیان و همکاران، ١٣٧٥).

مقدمه‌ای بر کشت و بافت

کشت بافت بنا به تعریف Street در سال ١٩٧٧ عبارت است از هر نوع کشت چند سلولی که بر روی محیط کشت رشد و نمو کرده و با یکدیگر ارتباط پروتوپلاسمی دارند. کشت بافت و سلول گیاهی نقش کلیدی در دومین انقلاب سبز را دارد که در آن تغییر ژن و بیوتکنولوژی در جهت اصلاح و بهبود کیفیت محصولات زراعی بکار می‌رود (مجد، ١٣٨١). عمده‌ترین موارد استفاده از فن آوری کشت بافت‌های گیاهی در کشاورزی شامل ایجاد گیاه دورگه، ازدیاد غیر جنسی گیاهان به روش رویشی، تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری زا، ایجاد بانک ژن از گیاهان دارویی می‌باشد و در حال حاضر با استفاده از کشت تعلیقی، امکان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که از نظر صنعتی مورد توجه می‌باشند، مثل آنتی بیوتیکها، ترکیبهای آلکالوییدی ضد سرطان، ویتامینها، آنزیمها، ادویه‌جات و حشره‌کشها میسر گردیده است (نوری قنبلانی، ١٣٦٥).

تاریخچه کشت بافت خانواده نعناعیان

براساس مطالعات Hirata و همکاران (١٩٩٠) محیط مایع B5 با مقادیر بالای اکسین NAA (٢و٤ میلی گرم در لیتر) عاملی برای کالوس زایی در گیاه نعناع اعلام کردند. Sato و Eomot در سال ١٩٩٣ طی تحقیقی تکثیر نعناع را از طریق کشت پرتوپلاست گزارش کردند و در این تحقیق پروتوپلاستهای حاصل از برگ نعنا را در محیط کشت B_5 حاوی ١ میلی‌گرم در لیتر NAA، ٠/٤ میلی‌گرم در لیتر 6-BAP و ٠/٥٪ ساکارز، ٠/٥ مولار مانیتول قرار دادند، بعد با سه بار انتقال به محیط‌های دیگر کالوس‌ها، شاخه‌زایی کردند و پس از آن در محیط B_5 بدون هورمون شاخه‌زایی و ریشه‌زایی صورت گرفت. این بررسی نشان می‌دهد که اندام‌زایی در بعضی گیاهان تیره نعناع به سختی صورت می‌گیرد. گیاه لاواندولا (اسطوخودوس) از نظر ریزازدیادی و اندام‌زایی نسبت به نعناع بهتر جواب می‌دهد، به طوری که اولین کسی که به مطالعه ریزازدیادی لاواندولا پرداخت Quazi در سال ١٩٨٠ بود، وی در مطالعات خود از جوانه‌های برگ لاواندولا آنگوستیفولیا و لاواندولا لاتیفولیا جهت تولید کالوس استفاده کرد. محیطی که او انتخاب نمود محیط کشت MS دارای ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP و ١ میلی‌گرم در لیتر NAA بود، کالوس‌های حاصل را به محیط دارای ٢ میلی‌گرم در لیتر 2,4,D و ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP انتقال داد که به‌شدت سبز رنگ شدند و رویان‌های سوماتیک تولید نمودند. وی بیان کرد که محیط حاوی ٥ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین، ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر 6-BAP و ٥ میلی‌گرم در لیتر IBA برای رشد جوانه‌ها و افزایش ساقه‌ها مناسب است. Panizza و Tognoni در سال ١٩٨٨ با توجه به نوع اثر تنظیم کننده‌های رشد به تفکیک محیط‌هایی را معرفی می‌کردند که به ترتیب زیر است: محیط شاخه‌زایی حاوی ٠/٢ میلی‌گرم در لیتر 6-BAP، محیط طویل‌سازی شاخه به همراه شاخه‌زایی دارای ٠/٢ میلی‌گرم در لیتر 6-BAP و ٠/٥ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین و محیط ریشه‌زایی دارای ١ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد.

مواد و روشها

از سه نوع محیط کشت جامد دارای هورمون استفاده شد.

الف) محیط کشت IBA+MS (ایندول بوتیریک اسید) + kin (کینتین)

ب) محیط کشت NAA+MS (نفتالین استیک اسید)+ 2ip (۲- ایزوپریمیدین)

پ) محیط کشت NAA+MS (نفتالین استیک اسید)+ 6-BAP (٦- بنزیل آمینوپورین)

محیط‌های کشت به دستگاه اتوکلاو منتقل شده و در فشار ۱/۰۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع و ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن محیط تا حدود ٤۰ درجه سانتیگراد محیطها در زیر دستگاه لامینار ایر فلوکابینت که قبلاً با الکل صنعتی ۷۰ درجه ضدعفونی شده و به مدت ۳۰ دقیقه لامپ UV آن روشن بوده، در شرایط سترون و کنار شعله به پتری‌دیش‌های سترون شده منتقل شدند. برای سترون کردن وسایلی مانند، پنس، اسکالپل، ظرفهای شیشه‌ای و پتری‌دیش‌ها از آون (oven) با دمای ۲۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت استفاده شد.

بذرهای *Salvia nemorosa* از مرکز تحقیقات جنگلها و مراتع تهیه شد و به علت پایین بودن توان رویش، بذرها ٢٤ ساعت قبل از کشت درهورمون جیبرلین به غلظت $0.001mgl^{-1}$ تیمار شدند.

جهت سترون کردن بذرها ابتدا از روش متداول (۳۰ ثانیه الکل ۷۰٪، ۱۵ دقیقه آب ژاول ۲۵٪) استفاده گردید. به دلیل موسیلاژی شدن بذر و امکان افزایش آلودگی، با افزایش زمان نگهداری در محلولهای ضدعفونی کننده، مشکل آلودگی تا حد قابل توجهی بر طرف گردید. در نهایت بذرهای سترون شده را به محیط کشت MS فاقد هورمون منتقل نموده و ۳ تا ٤ روز پتری‌دیش‌های دارای بذر در تاریکی نگهداری و پس از جوانه‌زنی به روشنایی منتقل شدند. ابتدا دانه‌رست‌های سترون را از محیط خارج کرده و در ظرف شیشه سترون شده توسط تیغ اسکالپل سترون قطعه قطعه کردیم، قطعات برگ، مریستم رأسی، محور زیر لپه، و ریشه‌ها را نیز مجدد قطعه قطعه کردیم و به محیط‌های کشت سه‌گانه دارای هورمون انتقال دادیم. ابتدا نمونه‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و با تغییر شکل قطعات و شروع کال‌زایی، نمونه‌ها برای رشد مناسبتر به شرایط نوری منتقل شدند.

نتایج

نتایج حاصل از کشت قطعات گیاهی *S. nemorsa* در محیط کشت MS دارای کینتین (kin) و اندول بوتیریک اسید (IBA):

الف: نتایج حاصل از کشت قطعات ریشه

نتیجه واکشت قطعات ریشه در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}$ IBA و $5mgl^{-1}$ Kin، تولید کال‌های سبز رنگ و پایدار بود. این کالها تقریباً یک ماه پس از واکشت قطعات در محیط جدید حاصل شدند (شکل ۱).

ب: نتایج حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه

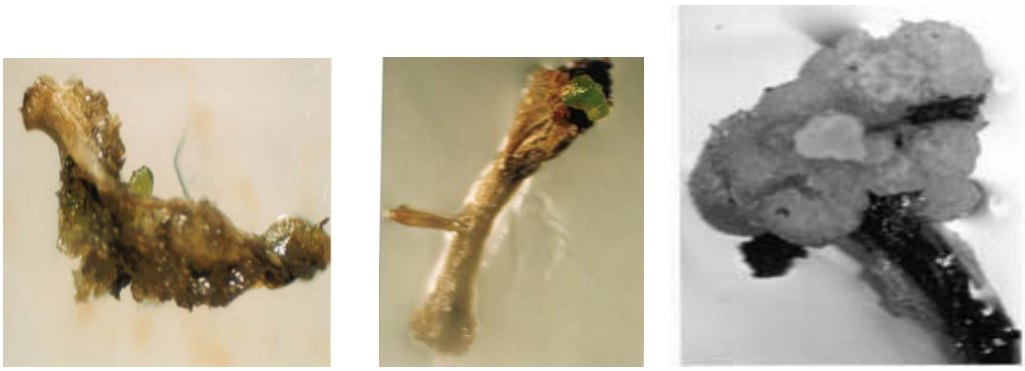
تغییر شکل قطعات محور زیر لپه‌ای در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}$ IBA و $5mgl^{-1}$ Kin و نیز تشکیل کال صورت گرفت. اما مدت زمان کوتاهی پس از تشکیل، کال‌ها قهوه‌ای رنگ شده و از بین رفتند (شکل ۲).

پ: نتایج حاصل از کشت قطعات برگی

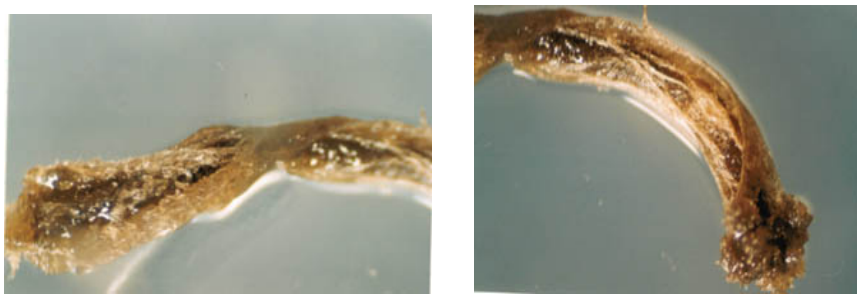
قطعات برگ در محیط کشت MS دارای IBA $5mgl^{-1}$ و Kin $5mgl^{-1}$ تغییر شکل یافته و تشکیل کال دادند. رشد کال‌های حاصل در این محیط با مؤفقیت پیش رفت و بعد باززایی اندام برگی از کال‌های تشکیل شده، به خوبی صورت گرفت (شکل ۳).

ت: نتایج حاصل از کشت قطعات مریستم رأسی

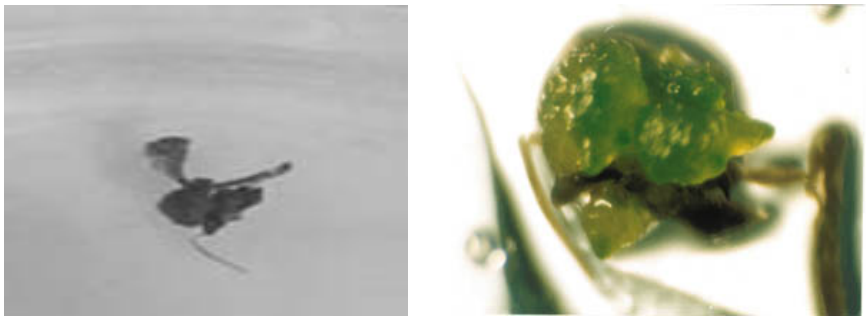
قطعات مریستم رأسی جدا شده از دانه رست در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}IBA$ و $5mgl^{-1}kin$ پس از طی مراحل کالزایی و تشکیل کالهای سبز رنگ، از بین رفتند، ادامه مراحل کالزایی، رشد کال و تشکیل اندام از قطعات مریستمی در این محیط ناموفق بود (شکل ٤). کلیه نتایج فوق در جدول ۱ مشخص شده است.



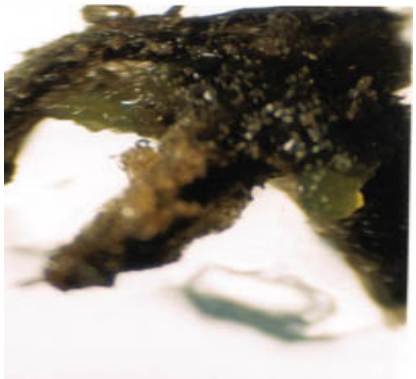
شکل ۱- تولید کال سبز و شفاف از قطعات ریشه در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}IBA+5mgl^{-1}kin$



شکل ۲- محور زیر لپه در مرحله بی شکل شدن و تولید کالهای قهوه‌ای و زرد در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}IBA+5mgl^{-1}kin$



شکل ۳- مراحل کالزایی و تشکیل برگ از جداکشت برگی در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}IBA+5mgl^{-1}kin$



شکل ٤- مرحله کال‌زایی مریستم رأسی در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}IBA+5mgl^{-1}kin$.
کالهای تولید شده در ابتدا سبز و شاداب بودند، ولی به سرعت از بین رفتند.

نتایج حاصل ازکشت قطعات گیاهی *S. nemorosa* در محیط کشت MS دارای نفتالین استیک اسید (NAA) و ۲- آمینو پورین (2ip):

الف) نتایج حاصل از کشت قطعات ریشه

جدا کشتهای ریشه در محیط کشت MS دارای هورمونهای $5mgl^{-1}NAA$ و $5mgl^{-1}2ip$ بدون هیچ تغییری باقی ماندند و هیچگونه کالوسی تولید نشد (شکل ۵).

ب: نتایج حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه

در محیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و $5mgl^{-1}2ip$، جداکشت‌های محور زیر لپه طی چند روز بعد از کشت، تولید کالوس نمودند و به شدت گسترش یافتند، کالوس‌ها به رنگ زرد کمرنگ به مدت طولانی در محیط بیرون تغییر باقی ماندند (شکل ٦).

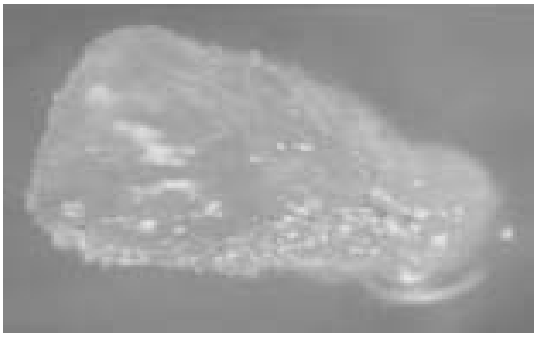
پ: نتایج حاصل از کشت قطعات برگ

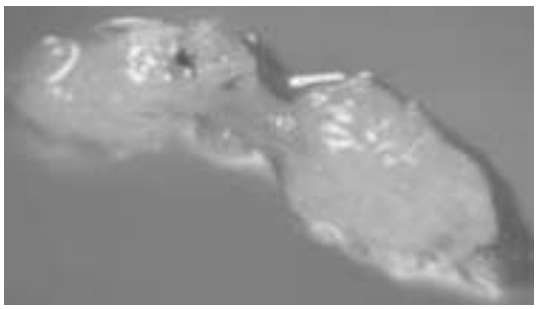
برگ و قطعات برگی در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}NAA$ و $5mgl^{-1}2ip$ به سرعت متورم شده و ظرف مدت کوتاهی تولید کالوس‌های سبز شادابی کردند و خیلی سریع باز تشکیل برگ از کال‌ها صورت گرفت. برگهای نوپدید سبز رنگ و سطحی شفاف داشتند (شکل ۷).

ت: نتایج حاصل ازکشت مریستم رأسی

قطعه مریستم کشت شده در محیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و $5mgl^{-1}2ip$ پس از تشکیل کال، اندام‌زایی نمود. باز تشکیل برگ از کال حاصل از جداکشت قطعه مریستم رأسی در شکل ۸ نشان داده شده است. کلیه نتایج در جدول ۲ مشخص شده است.

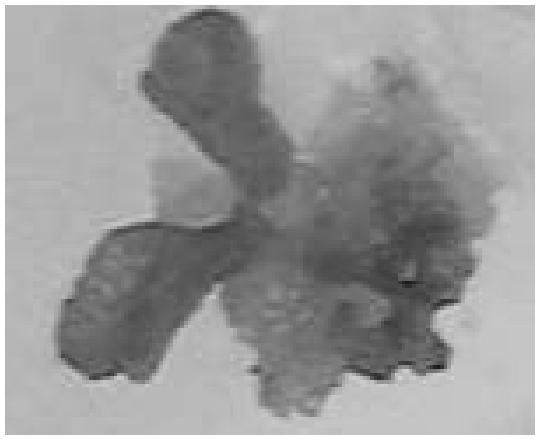
شکل ۵- استقرار قطعات ریشه در محیط کشت $MS+5mgl^{-1}NAA+5mgl^{-1}2ip$
قطعات واکشت در محیط هورمون دار بدون تغییر باقی ماندند.



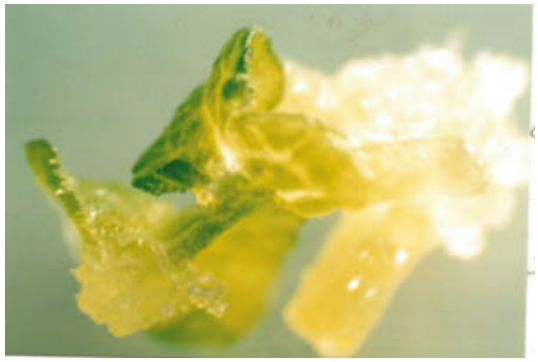


شکل ٦- محورهای زیر لپه کشت شده در محیط کشت $MS+5mgl^{-1}NAA+5mgl^{-1}2ip$

قطعات محورهای زیر لپه در محیط جدید به شدت و با سرعت زیاد کال‌های زرد تولید نموده و به همین حالت باقی ماندند.



شکل ۷- کالوس‌زایی و تولید برگ از جداکشت برگ در محیط کشت $MS + 5mgl^{-1}NAA + 5mgl^{-1}2ip$



شکل ۸ - برگ شاداب و کال‌های زرد و شکننده تولید شده از جداکشت مریستم رأسی درمحیط کشت
MS + 5 mgl^{-1} و NAA + 5mgl^{-1} 2ip

نتایج حاصل از کشت قطعات گیاهی *S. nemorosa* در محیط کشت MS دارای نفتالین استیک اسید (NAA) و ٦-بنزیل آمینوپورین (6-BAP):

الف: نتایج حاصل از کشت قطعات ریشه

قطعات ریشه‌ای در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}NAA$ و 6-BAP $2mgl^{-1}$ از ناحیه برش خورده تولید کال‌های سفید و پایدار نمودند ولی ادامهٔ قطعه سیاه شد و از بین رفت (شکل ۹).

ب: نتایج حاصل از کشت قطعات محور زیر لپه

در محیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و 6-BAP $2mgl^{-1}$، جداکشت‌های محور زیر لپه طی چند روز بعد از کشت در محیط جدید کالوس‌های سبز کم رنگ و ترد را ایجاد نمود که در محیط پایدار باقی ماند (شکل ۱۰).

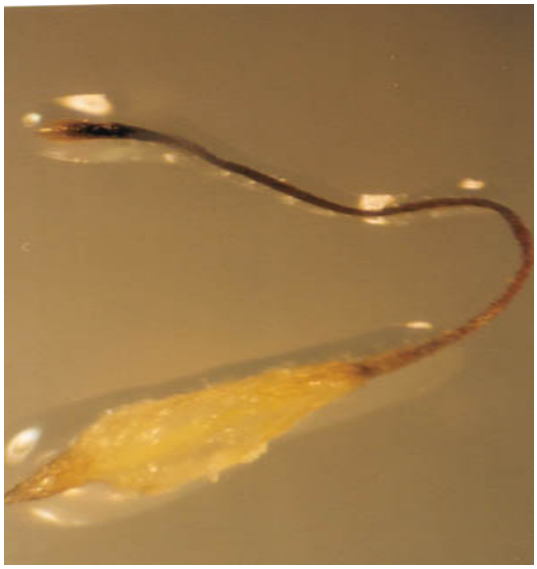
پ:نتایج حاصل از کشت قطعات برگ

برگ و قطعات برگی در محیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و 6-BAP $2mgl^{-1}$ تولید کالوس‌های سبز روشن تولید نمودند. کالوس‌های حاصل تا مدتها در محیط پایدار بودند، ولی پس از چند هفته قهوه‌ای شده و از بین رفتند (شکل ۱۱).

ت: نتایج حاصل از کشت قطعات مریستم رأسی

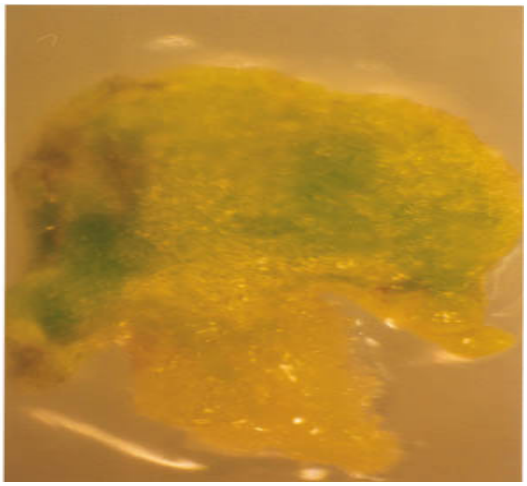
مریستم رأسی در محیط کشت MS دارای NAA $5mgl^{-1}$ و 6-BAP $2mgl^{-1}$ پس از تولید کالوس به رنگ سبز روشن، به سمت اندام‌زایی رفت و برگ ایجاد نمود. این مورد در مریستم رأسی که قطعه برگی با آن همراه بود نیز رخ داد با این تفاوت که در مریستم رأسی به همراه برگ ساقه نیز ایجاد شد (شکل ۱۲).

کلیه نتایج در جدول ۳ مشخص شده است.



شکل ۹- تولید کال از ناحیه برش خورده ریشه در محیط کشت MS دارای NAA 5mgl^{-1} و 6-BAP 2mgl^{-1}

شکل ۱۰ـ مرحله کال‌زایی از محور زیر لپه در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}$ NAA و $2mgl^{-1}$ 6-BAP



شکل ۱۱ـ تولید کال سبز روشن از قطعه برگی در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}$ NAA و $2mgl^{-1}$ 6-BAP

شکل ۱۲- مراحل ابتدایی و پیشرفته کال‌زایی و تولید برگ از مریستم رأسی در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}$ NAA و $2mgl^{-1}$ 6-BAP

جدول ۱- نتایج به دست آمده از اندام‌های قطعه قطعه شده دانه رست سترون *S. nemorosa* در محیط کشت MS+ Kin 5 mgl^{-1} + IBA 5mgl^{-1}

نوع اندام قطعه شده	رشد کالوس	رنگ کالوس	پایداری کالوس	اندام‌زایی
ریشه	+++	سبز	+++	–
محور زیر لپه	+	زرد – قهوه‌ای	–	–
مریستم	+++	سبز	–	–
برگ	++++	سبز	++++	تولید برگ

جدول ۲- نتایج حاصل از کشت قطعات اندام‌گیاه *S. nemorosa* در محیط $MS + 5mgl^{-1}NAA + 5mgl^{-1}2ip$

نوع اندام قطعه شده	ریشه کالوس	رنگ کالوس	پایداری کالوس	اندام زایی
ریشه	–	–	–	–
محور زیر لپه	+++	زرد – کرم	++	–
مریستم	++	زرد	–+	تولید برگ
برگ	++++	سبز	+++	تولید برگ

جدول ۳- نتایج حاصل از کشت قطعات اندام گیاه *S. nemorosa* در محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}NAA$ و $2mgl^{-1}6-BAP$

نوع اندام قطعه شده	رشد کالوس	رنگ کالوس	پایداری کالوس	اندام زایی
ریشه	+	سفید	+	-
محور زیر لپه	++	سبز روشن	++	-
برگ	++	سبز روشن	-	-
مریستم رأسی	+++	سبز روشن	+++	تولید برگ و ساقه

بحث

جهت انجام کشت در شیشه *S. nemorosa* پس از بدست آوردن دانه رست سترون از کشت بذرها در محیط کشت MS فاقد هورمون، قطعات ریشه، محور زیر لپه، مریستم رأسی و برگ در محیط کشت MS با غلظتهای هورمونی متفاوت کشت شدند. محیط کشت MS دارای $5mg^{-1}kin,5mg^{-1}2ip$، محیط کشت MS دارای $5mg^{-1}IBA,5mg^{-1}NAA$ و محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}NAA$ و $2mgl^{-1}$6-BAP در تمامی این محیطهای کشت هورمون‌دار جداکشت‌ها کال‌زایی کردند. جداکشت‌های مریستم رأسی در محیطهای $5mgl^{-1}NAA$ و $2mgl^{-1}$ 6-BAP و $5mgl^{-1}NAA$ و $5mgl^{-1}2ip$ به سمت اندام‌زایی رفته و در محیط اول برگ‌زایی و ساقه‌زایی و در محیط دوم فقط برگ‌زایی نمودند. قطعات برگی نیزدر محیط $5mgl^{-1}$IBA و $5mgl^{-1}$ Kin پس از تشکیل کال برگ‌زایی نمودند. سایر جداکشت‌ها اعم از ریشه و محور زیرلپه در تمامی محیطها کال‌زایی داشتند ولی بهترین محیط برای تولید کال سبز از ریشه محیط کشت MS دارای $5mgl^{-1}$IBA و $5mgl^{-1}$ Kin بود که جهت انجام آزمایشهای تحقیقی بر روی این گیاه دارویی جهت حصول موادآلی آن مناسب می‌باشد. Bolta و همکاران در سال ۲۰۰۰ دو نوع کالوس ترد و شکننده و متراکم از گیاه *S. officinalis* در محیط کشت MS دارای NAA ۱۰/٤۷ μM و BA ٤/٥ µM بدست آوردند. این تحقیق برای بدست آوردن ارسلیک اسید بیشتر از توده کالوسی نسبت به گیاه طبیعی بود که با تحقیقاتی که آنها انجام دادند مشخص شد که کالوس ترد و شکننده در مدت زمان کمتری نسبت به کالوس‌های متراکم تولید ارسلیک اسید می‌نماید و همچنین مقدار آن هم بیشتر است که مقدار ارسلیک اسید در هر دو نوع کالوس با HPLC سنجیده شده و در تحقیق ما کالوس‌ها بیشتر متراکم و تعدادی نیز ترد و شکننده بودند. Nabila و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای بدست آوردن اسید رزمارینیک از گیاه*S. fruticosa*، برگهای بسیار کوچک و ابتدایی این گیاه را در محیط کشت MS دارای تیدیازورن (TDZ) و (μM ۰، ۲/۳، ٤/٦، ٦/۹، ۹، ۲ و ۱۱/٥) و IAA (μM ۰ و ۳) کشت دادند. در نتایج بدست آمده توسط این محققان مشخص شد محیط فاقد TDZ کالوس‌زایی نداشت ولی در غلظت TDZ ٦/۹ μM و IAA ۳ μM کالوس‌های بزرگ به اندازه ۰/۷۹ گرم تولید شد که بازده رزماریک اسید آنها ۲/۱۲ میلی‌گرم از ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک بود.

همچنین آنها تارهای کشنده، *S. fruticosa* را در محیط B_5 دارای NAA ۲/۷ μM و غلظتهای مختلف ساکارز و فنیل آلانین کشت دادند که در محیط فاقد NAA کالوس‌زایی انجام نشد، ولی NAA به همراه (w/v) ٤٪ ساکارز تولید کرد و میزان رزماریک اسید آن (۲/٦۲ میلی‌گرم از ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک) بود. فنیل آلانین با غلظت mgl^{-1} ۱۰ میزان بازده رزماریک اسید را بالا برد (٤/٦۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک). این در حالی است که میزان رزماریک اسید در گیاه طبیعی ٥/۷۲ میلی‌گرم از ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک می‌باشد. با بررسیهای انجام شده در زمینه اندام‌زایی گیاه سالویا هیچ گزارشی یافت نشد. بررسیهای کتابخانه‌ای در مورد گزارشهای ارائه شده در مورد سایر جنس‌های خانواده نعناع مشخص گردید که با تحقیق بر روی گیاه نعناع بیشترین کالوس‌زایی در غلظتهای بالای NAA و IAA (٤ میلی‌گرم

در لیتر) و غلظت‌های متوسط 2,4,D (۲ میلی‌گرم در لیتر) صورت می‌گیرد ضمن اینکه هورمون سیتوکینین مناسب 2ip می‌باشد (ابراهیمی، ۱۳۷۵). این نتایج تا حدی با گیاه *S. nemorsoa* مطابقت دارد و هورمون اکسینی با غلظت بالا (۵ میلی‌گرم در لیتر) سیتوکینین kin و 2ip باعث کال‌زایی می‌شوند. Rodov و Dovidova در سال ۱۹۸۷ محیط کشت L_5 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم جیبرلین را برای کشت مریستم شاخه مناسب دانستند، که مطابق با تحقیقات ما هورمونهای NAA و IBA نیز در تولید کالوس سالویا نموروزا مؤثر بودند. Van Eck و Kitto در سال ۱۹۹۰ گزارشی را از کشت نعناع در محیط کشت MS ارائه دادند که از جنین بالغ و نابالغ، دانه و قطعات گل جهت کشت استفاده شده بود. کشت‌های جنین نابالغ در 6-BAP و NAA به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر شاخه‌زایی انجام دادند، ولی برای جنین‌های نابالغ 6-BAP و TIBA به مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر لازم است. مانیز در این تحقیق به لزوم هورمون 6-BAP در امر اندام‌زایی پی بردیم. همچنین فقط با حضور هورمونهای NAA و IAA با غلظت‌های ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر و هورمون 2ip و BAP با غلظت بسیار کم جهت رشد و شاخه‌زایی مشاهده شد (ابراهیمی، ۱۳۷۵) ولی به یک گیاه کامل دست نیافتند. مطابق با تحقیقات انجام شده در مورد سالویا نموروزا حضور توأم NAA و 6-BAP اندام‌زایی را تحریک و سرعت می‌بخشد. در مطالعاتی که درباره گزارشهای حاصل از کشت بافت گیاه لاواندولا از خانواده نعناع نجام شده، نتایج نشان می‌دهد که گیاه لاواندولا (اسطوخودوس) از نظر ریزازدیادی و اندام‌زایی نسبت به سالویا و نعنا بهتر جواب می‌دهد. Oliphent در سال ۱۹۸۷ با استفاده از نوک شاخه‌ها و گره‌های لاواندولا آنگوستیفولیا در محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر 6-BAP، رشد طولی و رشد جانبی ساقه‌ها را سبب شد. در آزمایش ما غلظت 6-BAP که باعث اندام‌زایی شد ٦/٦ برابر غلظت بکار رفته در تحقیق فوق می‌باشد. Oliphent در محیط کشت MS نصف غلظت عناصر ماکرو که حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود شاخه‌های ریشه‌دار را بدست آورد. به‌دنبال بررسیهای انجام شده بر روی دو گروه دیگر از خانواده نعناعیان به این نتیجه می‌رسیم که حضور هورمونهای NAA و IAA به عنوان اکسین و هورمونهای 2ip و 6-BAP به عنوان سیتوکینین ضروری‌ترین تنظیم کننده‌های رشد برای این گیاهان می‌باشد، ولی در هر دسته از این گیاهان مقادیر کاربردی آنها متفاوت است و به نظر می‌رسد که گیاهان جنس نعناع و سالویا نزدیکی بیشتر نسبت به یکدیگر دارند چون از نظر اندام‌زایی مشابه یکدیگر بوده و مانند لاواندولا به راحتی اندام‌زایی نمی‌کنند. در پایان مطابق با آزمایشهای انجام شده در دو محیط هورمونی که از اکسین و سیتوکینین به نسبتهای مساوی و توام و یک محیط با غلظت کمتر از سیتوکینین نسبت به اکسین استفاده شد، می‌توان چنین نتیجه گرفت:

(۱) تشکیل کالوس در محیط دارای kin+IBA سریعتر و بهتر از محیط دارای NAA+2ip و NAA+6BAP صورت می‌گیرد کالوس‌های سبز و شاداب و پایدار از ریشه در محیط kin+IBA بدست می‌آید.

(۲) برای تولید برگ و برگ‌زایی هر سه محیط مناسب هستند، ولی در محیط دارای NAA+6-BAP جدا کشت‌ها پاسخ بهتر جهت تولید برگ دادند و با توجه به اینکه مهمترین بخش این گیاه از نظر دارویی برگ می‌باشد، در نتیجه ریزازدیادی مناسب از اندام‌های برگی در این محیط صورت می‌گیرد.

منابع مورد استفاده

ابراهیمی، م.، ۱۳۷۵. رویان‌زایی در گیاه نعناع و تعیین مقدار منتول در نمونه های کشت آزمایشگاهی، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت معلم.

چلبیان، ف.، نوروزی، ح.، موسوی، س.، س.، ۱۳۸۲. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس ۷ گونه گیاهی از تیره های مختلف بر روی برخی از باکتری های بیماریزا. فصلنامه گیاهان دارویی، سال دوم، شماره هفتم، صفحه ۳۷-۴۱.

زرگری، ع.، .١٣٧٢ گیاهان دارویی، جلد چهارم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ٧١-٥٩.

قهرمان، ع.، ١٣٦٥. فلوررنگی ایران شماره ١٥٩٩، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

قهرمان، ع.، ١٣٦٥. کروموفیتهای ایران جلد سوم، مرکز نشر دانشگاهی تهران، ٧٩٠-٧٦٨.

مؤلف کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ١٣٨١، فارماکوپه گیاهی ایران، طرح پژوهشی ١٤٠٨٨، مجری طرح دکتر نصرا... قاسمی ده کردی، ناشر وزارت درمان، بهداشت و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو.

مجد، ا.، ١٣٨١، جزوه کشت بافت و سلول گیاهی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال.

مهرابیان، ص.، ملاباشی، ز. و مجد، ا.، ١٣٧٥. بررسی اثر ضد میکروبی ٣ و نه از گیاهان تیره نعناعیان (کاکوتی، مریم گلی، نعنا) در ١٥سویه باکتری بیماری‌زای روده‌ای و عامل مسمومیت غذا، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم جلد هشتم، شماره ١ و ٢ و ٣ و٤ صفحه ١١ـ١.

Bhaumik, C. and Datta P.C., 1989. Development of Japanese mint tissue culture method Indian perfumer. 33-3:165-168.

Calvo, M.C. and Segura, J., 1988. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula lotiofolia* and *L. stoechas* seedling . Scientia Horticulturae . 36:1-2, 157-163

Calvo , M.C. and Segura, J., 1988. *In vitro* propagation of lavandular Hortscience 24:2, 375-376.

Newall, C., Anderson, L.A. and Philipson, J.D., 1996. Herbal Medicines :231-232.

Ozdemir, C. and Senel, G., 1999 The morphological, anatomical and karyological properties of Salvia sclarea L.Tr.j. of Botany, 23 : 7-18 .

Hirata T., Murakami, S., Ogihara, k. and Suga, T., 1990. Volatile Monoterpenoid Constituents of the plants of Mentha spicata produced by shoot tip culture phytochemistry . 29: 2, 493_495.

Bolta, I., Dea Bari, E., Bohanec, B. and Andrenek, S., 2000. Apreliminary investigation of ursolic acid (UA) in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture Journal. 62 (1): 57-63

Information Bulletin, April 2003. U.S. Department of Justice, *Salvia divinurum* , Product No.2003-L0424-003.

Kandemir, N., 2003. The morphological, anatomical and karyological properties of endemic *Salvia* hypargeia Fish & May. (lamiaceae) in turkey, Department of biology, factuly of art and sciences, Ondakuz May university, Amasya, Turkey, Pak .J .Bot ., 35(2) : 219-236.

Nabila, S.K., Fawazia, M.J., Naser, A.R. and Rida, A.S., 2003. Growth and rosmarnicacid (RA) accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture Journal 73(2):117-121.

Oliphent, J.L., 1987. Micro propagation of Lavandula species. Combined Proceeding, International plant propoators Society. 37, 158-160.

Panizza, M., and Tognoni, F.,. 1988. Clonal, propagation, callus formation and plant vegeneration of Lavandulin. Scientia Horticulturae.37: 1-2, 157-163.

Quazi , M.H.,1980 .*In vitro* multiplication of *Lavandula spp*., Annals of Botany 45:3, 361-362 .

Rodov, Vs. and Dovidova, O.A., 1987. The propagation of mint by meristem culture. Trudy-Efiromaslichnydh-kul`ture. 18, 78-83.

Sato, H., Enomoto, S., Oka, S .and Hasomik, I.Y., 1993. Plant regeneration from protoplast of peppermint (Mentha *piperata*). Plant Cell Reports, 12:10, 546-550.

Van Eck, J.M. and Kitto, S.L., 1990. Callus Initiation and Regeneration in menthe. Hort Science. 25:7, 804-806.

Tissue culture and organogenesis of *Salvia nemorosa*

P. Ourmazd[1] and F. Chalabian[1]

1- Biology department, North Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran,
E-mail:Chalabian1969@yahoo.com

Abstract

Salvia nemorosa as a member of Lamiaceae, is used in food and pharmaceutical industries. Also *Salvia nemorosa* is an ornamental plant. *In vitro* culture of *S. nemorosa* on MS medium with different concentrations of hormones was investigated root, hypocotyls, leaf and apical meristem of sterile seedling grown on hormone free MS medium were used as explants. Leaf and apical meristem explants in MS medium containing 5mg/l NAA and 5mg/l 2ip formed the compact and green calli and then leaves and roots appeared. MS medium containing 5mg/l IBA and 5mg/l Kin was only suitable for callus induction and redifferentiation of leaf from leaf explants .With MS medium containing 5mg/l NAA and 2mg/l 6_BAP, apical meristem formed the green calli and then leaves and shoots appeared. Subculture of samples on fresh medium resulted in plant regeneration. Thus, MS medium with NAA and 6-BAP is best medium for propagation of *S. nemorosa* plant than the other medium. On MS medium containing 5mg/l NAA and 5mg/l 2ip, hypocotyls formed yellow calli, but root explants showed no callus induction. On MS medium with 5mg/l IBA and 5mg/l Kin, hypocotyls and root explant formed yellow and green calli, respectively without any organogenesis or plant regeneration.

Key words: *Salvia nemorosa*, Lamiaceae, Tissue culture, organogenesis, Callus and Regeneration.