فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۶

بازازایی غیر مستقیم گیاه دارویی درخطر انقراض زرین گیاه (Dracocephalum kotschyi Boiss)

پریسا جنوبی، احمد مجد، میترا زمانی*

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

* Email: Std.mitrazamani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۶

چکیده

زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) یکی از گونه‌های دارویی و معطر نعناعیان 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 بازازایی مشاهده نشد. نتایج بازازایی غیر مستقیم برگ لپه‌ای ۱۴ روزه نشان داد که بیشترین درصد کالوس زایی مربوط به ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌کشت MS حاوی BA ۰/۵ mg l^{-1} و NAA ۵/۰ mg l^{-1} بود. کالوس‌های منتقل شده به محیط کشت بازازایی حاوی BA۲mg l^{-1} و NAA ۰/۲ mg l^{-1} میزان ۳۳/۳٪ بازازایی شاخه را نشان داد. همچنین به منظور القای نوساقه از طریق بازازایی غیر مستقیم با واکشت متوالیریزنمونه برگ لپه ای در محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA ۵۳/۳ ٪ بازازایی گزارش شد. بهترین درصد ریشه‌زایی به میزان ۷۵٪ از محیط القای ریشه حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بدست آمد. گیاهان بازازایی شده پس از توسعه سیستم ریشه‌ای به گلدان‌های حاوی خاک و ورمیکولیت در شرایط گلخانه منتقل و سازگار شدند.

کلیدواژه‌ها: القای کالوس، بادرنجبویه دنایی، بازازایی نو ساقه، ریز ازدیادی.

مقدمه

زرین گیاه یا بادرنجبویه دنایی با نام علمی *Dracocephalum kotschyi* متعلق به تیره نعنائیان می‌باشد. این گیاه بومی ایران بوده و در کوه‌های 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، ساقه های چوبی، برگ‌ها دمبرگ دار، تخم مرغی شکل

و گل‌های بزرگ سفید یا متمایل به زرد است که بصورت خوشه‌های 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 می‌باشد. Moradi وOtroshy (۲۰۱۲) گزارش کردند که $mg\ l^{-1}$ ۰/۲ 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 می‌دهد که میزان بارش حدود ۳۲۰ میلی لیتر و درجه حرارت سالیانه ۱۰/۲۲ درجه سانتی‌گراد با اقلیم نیمه خشک سرد در ارتفاعات بیش از ۱۸۰۰ 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 می‌باشد[۱]. از اینرو کشت در شیشه این گیاه راهکار مناسبی برای تکثیر آن می‌باشد.

زرین گیاه با داشتن بیش از ۵۵ نوع ترکیب در اسانس آن بعنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی کاربرد فراوانی دارد. در درمان بیماری‌های رو ماتوئیدی، ام اس، سرگیجه و تقویت حافظه از آن استفاده می شود. با بررسی‌های 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 قارچ‌ها، ضد اسپاسم و مسکن را موجب می‌گردد. ژرانیول نیز یکی از ترکیباتی است که در اسانس زرین گیاه موجود است و درممانعت از رشد و سنتز پلی آمین ها در سلول های سرطانی انسان موثر است [۶]. در برگ‌های این گیاه ترکیبی بنام اسپینال زد وجود دارد که از سال‌های پیش در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گرفته 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 مریستم رأس ساقه در محیط کشت MS ترکیب با $mgl^{-1}BA$ ۵ و $mgl^{-1}NAA$ ۰/۲ اشاره کرد. شاخه‌های رشد یافته در این محیط ،برای طویل شدن و ریشه دار شدن به محیط‌کشت MS غنی شده با mgl^{-1} BA ۰/۵ و $mgl^{-1}IBA$ ۰/۵ انتقال داده شدند[۱۴].

با توجه به شرایط خاص اقلیمی مورد نیاز برای رشد زرین گیاه و برداشت بی‌رویه 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 می‌باشد. از این رو هدف از این پژوهش بهینه‌سازی کشت در شیشه و باززایی مستقیم و غیرمستقیم نوساقه به منظور ریزازدیادی زرین گیاه می‌باشد.

شکل۱: زرین گیاه (.Dracocephalum kotschyi Boiss)

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 400 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 می شود. 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 نو ساقه:

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) ($0/5\ mgl^{-1}$ و ۱) همراه با غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید (NAA) ($۰/۵mg\ l^{-1}$ و ۱) شدند. جداکشت‌های محور زیر لپه‌ای به محیط القای کالوس حاوی $BA\ ۲\ mg\ l^{-1}$ همرا ه با $NAA۰/۵\ mg\ l^{-1}$ و یا $2,4\text{-}D\ ۰/۵\ mg\ l^{-1}$ منتقل شدند. توده‌های کالوسی ایجاد شده پس از ١٤ 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 (mgl^{-1} ۰و ۰/۲و۰/۵) و BA (mgl^{-1} ۰ و ۱ 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 (mgl^{-1}۰و۱)و NAA (mgl^{-1} ۰و۰/۵ و ۱) استفاده شد.

به منظور ریشه‌دار شدن نوساقه‌ها، محیط‌کشت ریشه‌زایی با استفاده از هورمون‌های NAA (mgl^{-1} ۰ و ۱ و ۲) ترکیب با غلظت‌های متفاوت از BA (mgl^{-1} ۰و۰/۵) بکار گرفته شد.

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

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

استقرار گیاهان بازززا شده در شرایط گلخانه

گیاهان بازززایی 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 هوگلند آبیاری شدند.

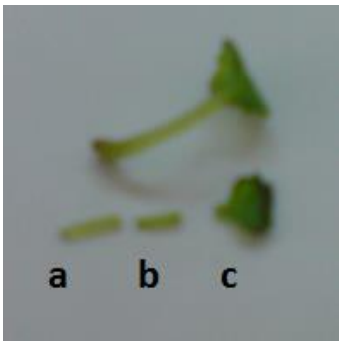
نتایج

کالوس‌زایی از جداکشت‌های محور زیر لپه و برگ‌های لپه‌ای

به‌علت ناهمزمانی شروع جوانه‌زنی، سن دانه رست‌ها پس از خروج کامل لپه ها موردنظر قرار گرفت. جداکشت های محور زیر لپه از دانه رست ۱٤ 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 $BA\ 2\ mg\ l^{-1}$ و $2,4\text{-}D\ 0/5\ mg\ l^{-}$ بود که کالوس‌های حاصل بزرگ و به رنگ سبز روشن بودند (شکل-۲).

جداکشت‌های برگ لپه ای از دانه رست‌های ۱٤ روزه برداشت شدند. به منظور مشخص نمودن دقیق ناحیه‌ی تشکیل کالوس با توان بازززایی نوساقه، برگ لپه‌ای به سه قسمت تقسیم شد و به صورت افقی بر روی محیط‌های کالوس زایی قرار گرفتند (شکل -۳). کالوس‌های کوچک بعد از ۷ روز در انتهای دمبرگ (شکل -a ۳)، برگ لپه‌ای تشکیل شدند. مشاهدات نشان داد که انتهای برگ لپه ای(شکل-a ۳) تنها محلی است که توان تولید کالوس با توان بازززایی نوساقه را دارد.

شکل۲: ریزنمونه‌های محور زیر لپه که به حالت ایستاده کشت شده در محیط‌کشت القای کالوس حاوی $BA\ 2\ mg\ l^{-1}$ و $2,4\text{-}D\ ۰/۵\ mg\ l^{-1}$

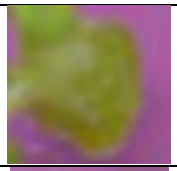
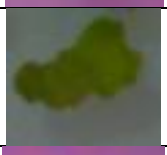


شکل۳: تقسیم جداکشت برگ لپه‌ای به منظور تعیین محل تشکیل کالوس.(a: قطعه دمبرگ نزدیک به محور زیر لپه، b: قطعه دمبرگ نزدیک به پهنک، c: پهنک)

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

برای القای کالوس از جداکشت برگ لپه‌ای، تنها محیط‌کشت پایه MS با ترکیب هورمونی BA mgl^{-1} ۱ و NAA mgl^{-1} ۰/۵ برای تشکیل کالوس مناسب نبود و در دیگر محیط‌ها کالوس با ویژگی های ریختی متفاوت ایجاد گردید که در جدول –۱ آمده است. از بین تیمارهای هورمونی اعمال شده کالوس‌های تشکیل شده در محیط حاوی mgl^{-1} ۰/۵ و NAA mgl^{-1} ۰/۵ 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.

جدول –۱: موقعیت قرارگیری و وضعیت کالوس‌های تولید شده در محیط القای کالوس(CIM) از جداکشت های برگ لپه ای

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

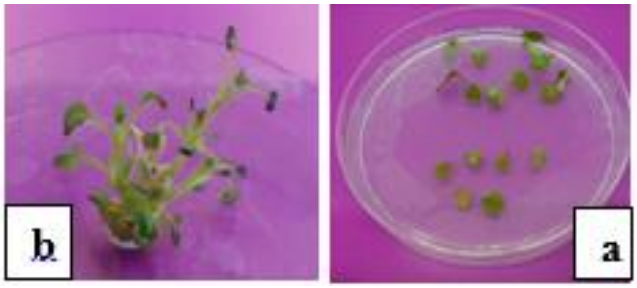
باززایی غیر مستقیم نوساقه

واکشت کالوس‌های حاصل از جداکشت های 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 mgl^{-1} ۲BA +NAA mgl^{-1} ۰/۲۵ بود که ۳۳/۳٪ ±Sd ساقه‌زایی را نشان داد. میانگین تعداد ساقه باززا شده در هر کالوس Sd ± ٤ عدد بود.

بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد باززایی در تیمار mgl^{-1}BA ۲+ mgl^{-1} NAA ۰/۲ بدست آمد، هر چند که اختلاف معنی‌داری با تیمار mgl^{-1}BA ۱/۵ نداشت. در بین ۱۰ تیمار استفاده شده برای باززایی، فقط در سه تیمار mgl^{-1}BA ۱/۵، mgl^{-1} ۲BA +NAA mgl^{-1} ۰/۲۵ و mgl^{-1} ۱/۵BA +NAA mgl^{-1} ۰/۵ باززایی مشاهد گردید.

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

SIM BA	SIM NAA	رشد کالوس در محیط SIM	رنگ کالوس درمحیط SIM
۰	۰	–	قهوه ای
۰	۱	+	قهوه ای
۰	۱/۵	++	سبزروشن
۰	۲	+	قهوه‌ای
۰/۲۵	۱	+	قهوه‌ای
۰/۲۵	۱/۵	+	قهوه‌ای
۰/۲۵	۲	++	سبزتیره
۰/۵	۱	+	قهوه ای
۰/۵	۱/۵	++	سبزروشن
۰/۵	۲	+	قهوه ای



شکل ٤: a) تشکیل کالوس درانتهای قطعه دمبرگ نزدیک به محور زیر لپه در محیط کشت ۰/۵mgl $^{-1}$ NAA +۰/۵mgl $^{-1}$ BA
b) بازززایی غیر مستقیم نوساقه در محیط کشت القای نوساقه با ترکیب هورمونی ۰/۲mgl $^{-1}$ NAA +۲mgl $^{-1}$BA

همچنین بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد شاخه بازززا شده در تیمار ۰/۲mgl $^{-1}$ NAA +۲mgl $^{-1}$BA به میزان 4 ± Sd بدست آمد. بنابراین برای بدست آوردن بیشترین تعداد بازززایی و تعداد شاخه این تیمار مناسب است.

بازززایی نوساقه از کشت پیوسته بر روی محیط‌کشت القای کالوس

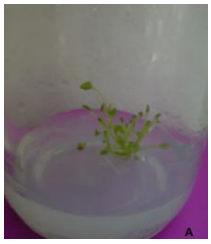
نتایج حاصل از واکشت متوالی کالوس‌های حاصل از جداکشت برگ لپه‌ای بر روی محیط کشت‌های حاوی اکسین و سیتوکینین‌ها نشان داد که کشت پیوسته در محیط القای کالوس حاوی ترکیب هورمونی ۱mgl $^{-1}$ NAA +۱mgl $^{-1}$BA (شکل -۵) پس از ١٤ روز با ±Sd ٪۵۳/۳ بازززایی نوساقه با میانگین تعداد ±Sd ٤ ساقه در هر کالوس بیشترین درصد بازززایی نوساقه را در بر داشت.

شکل-۵: بازززایی غیر مستقیم نوساقه در محیط‌کشت کالوس زایی با ترکیب هورمونی ۱mgl $^{-1}$ NAA + ۱mgl $^{-1}$BA

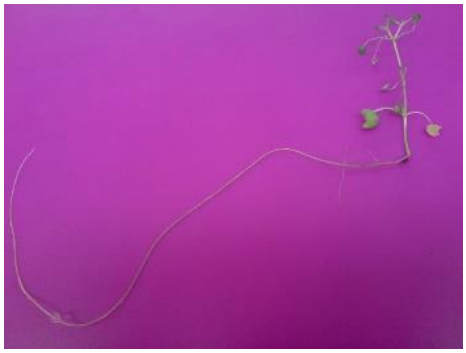
رشد و توسعه نوساقه و ریشه زایی

پس از باززایی نوساقه‌ها، به منظور افزایش رشد و طویل شدن ساقه‌ها، ساقه‌های باززا شده را با احتیاط از کالوس جدا نموده به محیط‌های حاوی ترکیبات مختلف هورمونی منتقل شدند. بهترین محیط برای رشد نو ساقه در کمترین زمان، محیط‌کشت پایه MS با ترکیب هورمونی $۱mgl^{-1}BA$ + $۰/۵mgl^{-1}$ NAA بود (شکل-٦).

برای ریشه‌دار شدن ساقه‌های باززا شده، نوساقه ها پس از طویل شدن به محیط‌کشت القای ریشه که در جدول ۲-٤ آورده شد انتقال یافتند. تنها محیط مناسب برای ریشه زایی محیط کشت پایه MSبا ترکیب هورمونی $۲ mgl^{-1}NAA$ بود که پس از ١٤ روز ریشه در قاعده ساقه‌ها نمایان شد (شکل-۷). درصد ریشه‌زایی در این محیط کشت ۷۵٪ است.



شکل -٦: A: محیط کشت با ترکیب هورمونی$۱mgl^{-1}BA$ + mgl^{-1} ۰/۵NAA



شکل-۷: نوساقه ریشه دار شده در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی $۲ mgl^{-1}NAA$

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 $۲ mgl^{-1}$ NAA طی دو هفته ریشه‌دار شدند (شکل-۸). بعد از گذشت یک ماه از واکشت 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 هومونی$۲ mgl^{-1}NAA$ پس از ١٤ روز از واکشت

شکل۹: سازگاری گیاه باززا شده در شرایط گلخانه

بحث وتفسیر

موفقیت ریزازدیادی به‌ترکیبات غذایی محیط‌کشت، غلظت و ترکیبات تنظیم کننده های رشد، شرایط آب و هوایی بهینه گلخانه، ژنوتیپ و حالت‌های 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 جداکشت‌های برگ لپه‌ای ۱٤ روزه برای تشکیل کالوس استفاده شد. اثرغلظت هورمون BA بر روی برگ لپه‌ای نشان داد که غلظت ۰/۵mgl $^{-1}$ و ۱mgl $^{-1}$ ترکیب با هورمون اکسین NAA منجر به تولید کالوس‌هایی باتوان باززایی می‌شود. اهمیت هورمون BA روی باززایی جداکشت‌های برگی گونه‌های مختلفی از تیره نعنا اثبات شده است. در جنس *Pogostemon* غلظت ۰/۵ mgl $^{-1}$ BA همراه با هورمون اکسین NAA در محیط کشت پایه MS در تشکیل کالوس و باززایی ساقه موثر بوده است [۱۲]. در گونه *Salvia splenden* از تیره نعناعیان نیز غلظت های۱ و ۱/۵میلی گرم بر لیتر هورمون BA موثر در تولید کالوسهایی با توان باززایی نوساقه از جداکشت برگ شد [۸] که با یافته‌های 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 می‌یابد اما برای تقسیم سلول‌ها، حضور اکسین ضروری است. هورمون اکسین NAA به همراه سیتوکینین در القای کالوس ضروری هستند.[۹]

به‌منظور 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 (۵۳/۳٪) از طریق واکشت کالوس‌ها در محیط کشت القای کالوس حاوی ۱ mgl $^{-1}$ NAA+۱ mgl $^{-1}$ BA طی ۳۰ روز با میانگین تعداد چهار ساقه در هر کالوس نتیجه شد. البته به نظر می‌رسد واکشت کالوس‌های حاصل از محیط القای کالوس با ترکیب هورمونی ۱mgl $^{-1}$ NAA + ۰/۵mgl $^{-1}$ BA با ۵۰٪ باززایی غیرمستقیم نوساقه در مدت ۱٤ 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 می‌شود.

به منظور طویل شدن و رشد ساقه، محیط‌کشت MSبا غلظت‌های متفاوت BA تعریف گردید که نوساقه‌ها در محیط کشتMS ترکیب با غلظت ۰/۵ mgl $^{-1}$ NAA+۱mgl $^{-1}$ BA بیشترین رشد طولی را داشته و علاوه بر آن شاخه‌های جانبی بیشتری تولید کردند. اثر سیتوکینین‌ها بر رشد ساقه و تولید جوانه‌های 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 جوانه‌های جانبی گزارش شده است [۷، ۲]. این موضوع از اثر هورمون BA برتکوین جوانه‌ها و افزایش تعداد گیاهچه‌ها ناشی می‌شود. این اثر مثبت BA بر نوساقه‌ها در شرایط *in vitro* به علت دخالت کردن آن در متابولیسم عمومی گیاه بویژه فعالیت آنزیم‌ها و

کوآنزیم‌های موثر در بیوسنتز متابولیت‌ها و رشد گیاه است.

محیط‌کشت پایه MS ترکیب با غلظت ۲ mgl^{-1} NAA 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 ۰/٤ mgl^{-1} NAA 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 mgl^{-1} ۰/۵ 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 kotschyi* 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 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 koschyi* growing in iran and their trypanocidal activity. Naturul 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 kotschyi* 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., Otroshy m. 2012, A combinathion of chemical scarification and 6-benzylaminopurine(BAP) treatment promote seed germination in *Dracocephalum kotschyi* seeds. Trakia Journal of Sciences, 10(3): 26-29.

[14] Moradi k., Otroshy M. 2012, Trichomes and Regeneration by Direct Organogenesis of Medicinal Plant *Dracocephalum*

kotschyi 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.