فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: **www.jhd.iaushk.ac.ir**

اثر محیط‌های مختلف کشت بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک به‌لیمو در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای

حسن نورافکن*[۱]، فاطمه سفیدکن[۲]، سیدامیر موسوی[۳]، مظفر شریفی[۴]، احمد خلیقی[۱]

۱. *گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران؛*

*مسئول مکاتبات (**E-mail: hassannourafcan@gmail.com**)

۲. *موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران؛*

۳. *پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران؛*

۴. *گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛*

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱/۱۸

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

موضوع: بیوتکنولوژی گیاهان داروئی

کلید *واژگان* :

- *به‌لیمو*
- *بنزیل آدنین*
- *کشت بافت*
- *گیاهان دارویی*
- *BAP*

چکیده

مقدمه و هدف: به‌لیمو با نام علمی ***Lippia citriodora*** **H.B.K** سال‌هاست به عنوان یک گیاه دارویی و معطر کشت شده و مورد مصرف قرار می‌گیرد. تکثیر جنسی به‌لیمو به علت عدم جوانه‌زنی بذر معمول نیست و تکثیر آن غیرجنسی انجام می‌شود. انتخاب محیط کشت مناسب یکی از ضرورت‌های موفقیت در کشت بافت است.

روش تحقیق: به منظور ارزیابی اثرات ۱۰ محیط کشت مورد استفاده در تحقیقات کشت بافت (۱- MS حاوی ($3\ mgL^{-1}$) BAP + ($0.1\ mgL^{-1}$) IBA + زغال فعال ($1\ gL^{-1}$)، ۲- MS حاوی ($1\ mgL^{-1}$) BAP + ($0.5\ mgL^{-1}$) IBA + زغال فعال ($1\ gL^{-1}$)، ۳- 1/2MS، ۴- MS حاوی ($5\ mgL^{-1}$) BAP، ۵- MS حاوی ($1\ mgL^{-1}$) BAP، ۶- MS حاوی زغال فعال ($1\ gL^{-1}$)، ۷- MS حاوی ($1\ mgL^{-1}$) BAP + زغال فعال ($1\ gL^{-1}$)، ۸- MS حاوی ($1\ mgL^{-1}$) BAP + نیترات نقره ($5\ mgL^{-1}$)، ۹- MS حاوی نیترات نقره ($5\ mgL^{-1}$) و ۱۰- شاهد (MS)) بر صفات مورفوفیزیولوژیک به‌لیمو، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه ریزنمونه در هر تکرار انجام شد.

نتایج و بحث: نتایج اثرات مثبت ($5\ mgL^{-1}$) BAP و تا حدودی زغال‌فعال را بر بسیاری از شاخص‌های رشد نشان داد ولی برخلاف انتظار، نیترات‌نقره تاثیری روی کاهش پیری و نکروز برگ نشان نداد.

توصیه کاربردی/ صنعتی: با توجه به یافته‌ها می‌توان محیط کشت چهارم (MS حاوی ($5\ mgL^{-1}$) BAP) را با داشتن بالاترین میزان از شاخص‌های وزن تر شاخساره، تعداد برگ، تعداد میانگره، تعداد شاخه، وزن تر ریشه، قطر کالوس و وزن خشک ریشه به عنوان محیط مناسب کشت بافت در شرایط آزمایشی اشاره شده انتخاب و معرفی نمود.

۱. مقدمه

گیاه به‌لیمو[1] با نام علمی *Lippia citriodora* H.B.K و نام‌های مترادف *Verbena citriodora*، *Aloysia citriodora* و *Verbena triphylla* L. از تیره شاه‌پسند[2] می‌باشد (Mozaffariyan, 1999; Zargari, 1993; Portmann *et al*., 2012). به‌لیمو به عنوان یک گیاه دارویی، معطر و زینتی کشت می‌شود. این گیاه به علت خواص دارویی، عطر و طعم مطبوع آن وارد کشور شده و در مناطق شمالی کشور توسط شرکت‌های تولید کننده گیاهان دارویی به صورت محدود کشت گردیده است ولی امروزه به علت زیبایی و عطر دلپذیری که دارد در غالب نواحی پرورش می‌یابد. برگ‌ها و اندام رویشی به‌لیمو دارای خاصیت تب‌بر، مسکن، ضد نفخ و کمک کننده به هضم غذا می‌باشد. چای به‌لیمو فوق‌العاده آرام‌بخش و تسکین دهنده اعصاب است و اخیراً نقش آن در پیشگیری و کنترل جهش‌ها و نقش آن به‌عنوان آنتی‌اکسیدان نیز مورد توجه قرار گرفته است (Zargari, 1993; Ghaemi *et al*., 2006; Moaveni, 2010; Rezaei and Kamkar, 2000; Sabeti, 2001; Kheiri *et al*., 2006; Oladzad *et al*., 2013; Shahhosseini *et al*., 2012; Shahhosseini and Omidbeigi, 2002; Severin *et al*., 2006; Catalan and de Lampasona, 2002). اسانس به‌لیمو یکی از گران‌ترین و نایاب ترین اسانس‌ها در بازار به شمار می‌رود (Severin *et al*., 2006). با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس‌ها در زمینه‌های گوناگون و توجه جهانی به گیاهان حاوی اسانس، همچنین با توجه به مشکلات زراعی، تغییرات آب و هوایی، آفات و بیماری‌های گیاهی در زمینه استفاده از گیاهان دارویی از روش‌های دیگری جهت به دست آوردن مواد موثر گیاهی می‌توان استفاده نمود. یکی از این روش‌ها کشت بافت[3] گیاهان می‌باشد (Shams Ardakani *et al*., 2006). به دلیل توجه به جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان دارویی، بهینه نمودن این روش‌ها به‌عنوان ابزار مهم جهت مطالعه‌های بعدی مربوط به عوامل موثر در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین کاربرد آن‌ها در اصلاح گیاهان دارویی مطرح می‌باشد. تکنیک ریزازدیادی گیاهی دارای کاربردهای تجاری قابل توجهی است زیرا با این تکنیک می‌توان تعداد بسیار زیادی گیاه دارویی یکنواخت به‌دست آورد (Hosseini hashemzadeh *et al*., 2014). در زمینه کشت درون شیشه‌ای و کشت بافت به‌لیمو، مطالعه‌های گوناگونی گزارش شده است. برخی از این مطالعات نشان از افزایش درصد برخی از ترکیبات مهم اسانس به‌لیمو در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای با به کار بردن ترکیباتی از تنظیم کننده‌های رشد، محرک‌ها، پیش ماده‌ها و ... دارد (Severin *et al*., 2006; Oladzad *et al*., 2013; Gupta *et al*., 2001). اما نکته حائز اهمیت در این مطالعات این است که اغلب، پاسخ‌هایی متفاوت و گاهی متناقض نسبت به اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ارائه شده است. عوامل زیادی در پاسخ به کشت بافت و ریزازدیادی گیاهان موثرند، از جمله می‌توان به نوع ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، دما، طول روز، شدت نور، pH محیط، منبع غذایی، تنظیم کننده‌های رشد و غیره اشاره کرد (Tripathi and Tripathi, 2003؛ Nalwade and Tsay, 2004؛ van Eck and Kitto, 1990). تحقیقات متعددی روی اثر مواد تنظیم‌کننده‌رشد روی به‌لیمو انجام شده است (؛ Oladzad *et al*., 2013; Gupta *et al*., 2001; Severin *et al*., 2006). سورین و هم‌کاران[4] (۲۰۰۶) اثر غلظت‌های محیط کشت و مواد تنظیم کننده رشد را بر پرآوری قطعات گره‌ی مطالعه نموده و ۲۸ روز پس از کشت به این نتیجه رسیدند که میانگین تعداد شاخساره‌های تولیدی به قطعات گره‌ی در محیط کشت نیم غلظت MS[5] فاقد تنظیم کننده رشد، بالاترین نسبت را داشته و در این تیمار شش شاخساره به ریزنمونه به‌دست آمد. گوپتا[6] و همکاران (۲۰۰۱) اثر تنظیم کننده‌های رشد را بر ریزازدیادی گونه *L. alba* بررسی نمودند و بیشترین تعداد نوساقه‌ها را در محیط MS حاوی پنج میلی گرم در لیتر BAP[7] و بیشترین طول شاخساره را در محیط MS حاوی یک میلی گرم در لیتر BAP به‌دست آوردند. ایشان همچنین محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد را مناسب‌ترین محیط برای ریشه‌زایی گزارش کردند. در تحقیقی اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و IBA[8] بر ازدیاد درون شیشه‌ای به‌لیمو مطالعه شده و نتایج نشان داد بهترین تیمار جهت شاخه‌زایی، تیمار هورمونی حاوی سه میلی-

1. lemon verbena
2. *Verbenaceae*
3. tissue culture
4. Severin *et al*.
5. Murashige and Skoog
6. Gupta
7. banzyle amino purine
8. indole-3-butyric acid

گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA می-باشد. در این مطالعه برای افزایش رشد طولی گیاهچه‌ها در مرحله شاخه‌زایی، تیمار هورمونی یک میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با نیم میلی گرم در لیتر IBA همراه با یک گرم در لیتر زغال‌فعال توصیه شد. همچنین در تحقیقی بر روی گونه *L. junelliana*، اثر BAP در غلظت ۴/۴ میکرومولار به تنهایی و یا در ترکیب با ۰/۰۴ میکرومولار IBA بر ریزازدیادی این گیاه بررسی شد. در مطالعه‌ای دیگر، اثر هورمون‌های BAP و NAA[9] بر تکثیر و ریشه‌زایی گیاه دارویی و در حال انقراض *Lippia filfolia* بررسی شد. نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی ۴/۵ میکرومولار BAP به همراه ۵۴ نانومولار NAA بیشترین درصد نوشاخه‌ها را القاء نموده است (Oladzad *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای بر روی ریزازدیادی نوعی شاه‌پسند[10] نشان داده شد که با استفاده از قطعات گره‌ی در محیط کشت MS حاوی ۷/۵ میکرومولار BA و ۰/۰۰۵ میکرومولار NAA القاء پرآوری شاخساره صورت می‌گیرد (Braga *et al.*, 2012). تغییر ترکیب مواد غذایی محیط کشت نیز می‌تواند به صورت جدی منحنی رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار دهد (Firoozi, 2009). بسیاری از اجزای محیط کشت از عوامل مهم در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (Dehghan *et al.*, 2010). علاوه بر موادغذایی، یک یا چند تنظیم کننده رشد گیاهی برای رشد بهتر بافت‌ها و اندام‌ها ضروری هستند و مقدار نیاز به ماده رشد گیاهی به نوع بافت، مقدار هورمون درون‌زا و هدف کشت درون شیشه‌ای بستگی دارد. در کشت‌های درون شیشه‌ای، اکسین‌ها (IAA، IBA، NAA، 2,4-D و 2,4,5-T) و سایتوکنین‌ها (BAP، 2-ip، Kin، TDZ و زآتین) کاربرد فراوانی دارند. این ترکیبات هورمونی می‌توانند واکنش‌های مورفولوژیک فراوانی را در گیاهان باعث شوند (Nouroozi, 2007). استفاده از زغال‌فعال در محیط کشت، اثرهای سودمندی در جنین‌زایی سوماتیکی، کشت بساک، جوانه‌زنی بذر و ریشه‌زایی دارد (Montazeri *et al.*, 2011). انتخاب روش موثری از کشت بافت جهت تکثیر آسان برای به دست آوردن گیاهان عاری از بیماری و یکسان از نظر ژنتیکی و مقایسه محیط کشت بر خصوصیات رشدی به‌لیمو در شرایط کشت درون-شیشه‌ای و یافتن بهترین تیمارها از اهداف این تحقیق به شمار می-رود.

۲. مواد و روش ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی گیاهان دارویی و آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه اجرا شد. قلمه‌های ریشه‌دار به‌لیمو از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج تهیه و به گلخانه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه منتقل و درون گلدان کشت شدند. پس از این که گیاهان کشت شده در گلدان به اندازه کافی رشد کردند از هر گلدان تعدادی ساقه ترد و جوان دارای گره‌های سالم انتخاب و پس از حذف برگ‌ها، قلمه‌هایی با اندازه حدود پنج سانتی‌متر که دارای چند گره برگی بودند در زیر دستگاه هود لامینار ایرفلو[11] و در شرایط استریل ضدعفونی شدند (Mohebalipour, 2012). پس از ضدعفونی و شستشوی ریزنمونه‌ها در زیر هود، هر ریزنمونه با استفاده از اسکالپل و پنس استریل به قطعات حدود یک سانتی-متری طوری که هر قطعه دارای یک جوانه جانبی باشد، تقسیم شد. گره‌های حاصل از ساقه‌های جوان به عنوان ریزنمونه و به صورت عمودی در محیط‌های کشت پیشنهادی زیر کشت شدند.

محیط کشت یک: MS حاوی ($3\ mgL^{-1}$) BAP + ($0.1\ mgL^{-1}$) IBA + زغال‌فعال ($1\ gL^{-1}$) (Oladzad *et al.*, 2013)

محیط کشت دو: MS حاوی ($1\ mgL^{-1}$) BAP + ($0.5\ mgL^{-1}$) IBA + زغال‌فعال ($1\ gL^{-1}$) (Oladzad *et al.*, 2013)

محیط کشت سه: 1/2MS فاقد تنظیم کننده رشد (Severin *et al.*, 2006)

محیط کشت چهار: MS حاوی ($5\ mgL^{-1}$) BAP (Gupta *et al.*, 2001)

محیط کشت پنج: MS حاوی ($1\ mgL^{-1}$) BAP (Gupta *et al.*, 2001)

محیط کشت شش: MS حاوی زغال‌فعال ($1\ gL^{-1}$) (Oladzad *et al.*, 2013)

9. naphthaleneacetic acid
10. *Verbena litoralis* Kunth
11. laminar airflow hood

محیط کشت هفت: MS حاوی BAP (1 mgL^{-1}) + زغال‌فعال (1 gL^{-1}) (Oladzad *et al*., 2013)

محیط کشت هشت: MS حاوی BAP (1 mgL^{-1}) + نیترات‌نقره (5 mgL^{-1}) (Turhan, 2004; Gupta *et al*., 2001)

محیط کشت نه: MS حاوی نیترات‌نقره (5 mgL^{-1}) (Turhan, 2004)

محیط کشت ده: MS (Gupta *et al*., 2001)

ریزنمونه‌ها در بطری‌های شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری کاشته شده و سپس در اتاقک رشد به‌مدت ۳۰ روز در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس و روشنایی ۱۶ و تاریکی ۸ ساعت نور مهتابی برای تولید گیاهچه‌های سالم و عاری از میکروارگانیسم‌ها نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار شامل سه بطری شیشه‌ای بوده و در هر واحد آزمایشی (بطری شیشه‌ای) سه عدد ریزنمونه کشت شد. در پایان آزمایش، صفات مورفولوژیکی مانند طول ریشه و شاخساره (با خط‌کش برحسب میلی‌متر)، تعداد برگ، ریشه و شاخساره، تعداد گره در بلندترین شاخساره، وزن تر و خشک ریشه و شاخساره (با استفاده از ترازوی دقیق تا چها رقم اعشار)، تعداد برگ نکروزه، شاخص کلروفیل (SPAD) و قطر کالوس ریزنمونه‌ها اندازه‌گیری و میانگین گرفته شد.

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال یک درصد صورت گرفت.

۳. نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تمامی صفات مورد ارزیابی نشان داد که بین تیمارها در سطح احتمال یک درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). نتایج به‌دست آمده نشان داد که شاخص کلروفیل در محیط‌های کشت ۲، ۳، ۶، ۷، ۹ و ۱۰، وزن تر شاخساره در ۴ و ۵، تعداد برگ در ۴ و ۸، بلندترین ریشه در ۲، ۳، ۵، ۶، ۷، ۹ و ۱۰، تعداد ریشه در ۳، ۶، ۷ و ۱۰، تعداد میانگره در ۴ و ۸، تعداد شاخه در ۴ و ۸، وزن تر ریشه در ۴، ۵ و ۹، قطر کالوس در ۴ و ۵، وزن خشک ریشه در ۴ و ۱۰، وزن خشک ساقه در ۷ و ۱۰ و برگ نکروزه در ۲، ۴، ۶، ۸، ۹ و ۱۰ در بالاترین سطح آماری قرار دارند (جدول ۲ و ۳).

در کشت درون شیشه‌ای گیاهان عالی، تنظیم کننده‌های رشد، مخصوصاً اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، خیلی بارز هستند. در واقع، می‌توان گفت که غالب کشت درون شیشه‌ای بدون وجود تنظیم کننده‌های رشد، غیرممکن است. تصمیم در مورد افزودن اکسین و یا سیتوکینین به محیط کشت جهت رشد و یا تقسیم سلولی، بستگی به نوع قلمه و گونه‌های گیاهی دارد. به عنوان مثال، قلمه-هایی که خودشان اکسین کافی تولید می‌کنند، به اکسین اضافی برای رشد و یا تقسیم سلولی نیاز ندارند. همچنین در مورد قلمه-هایی که سیتوکینین کافی دارند، به سیتوکینین اضافی برای افزودن به محیط کشت، نیازی نیست (Yang and Sung, 2002). برای بررسی پاسخ به کشت بافت گیاه بادرنجبویه[۱۲]، اثر تنظیم کننده‌های رشد IAA، NAA، IBA، BAP و کینتین بر انواع ریزنمونه[۱۳] (گره‌ها، شاخساره، میان‌گره، ریشه و برگ) مورد ارزیابی قرار داده شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که افزودن سیتوکینین‌ها (کینتین و BAP) منجر به افزایش تولید شاخساره گردید. در این مطالعه محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر کینتین به همراه نیم تا یک میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط جهت ریزازدیادی بادرنجبویه تشخیص داده‌شد (Mohebalipour, 2012). محیط کشت چهار با داشتن بیشترین BAP مصرفی باعث افزایش تعداد شاخه در به‌لیمو شده است.

یون نقره به فرم نیترات مانند نیترات‌نقره ($AgNO_3$) نقش مهمی در رویان‌زایی سوماتیکی[۱۴]، تشکیل ساقه و ریشه دارد. نیترات‌نقره به عنوان بازدارنده فعالیت اتیلن شناخته می‌شود. یون نقره توانایی مسدود نمودن فعالیت اتیلن خارجی در فعالیت‌هایی مانند ریزش برگ، پیری و بازدارندگی رشد را دارد. نیترات‌نقره با داشتن برخی صفات مانند قابلیت دسترسی آسان، حل شدن در آب و پایداری، کاربردهای متنوع مفیدی در تنظیم رشد گیاهی و ریخت‌زایی[۱۵] در شرایط درون و برون شیشه‌ای دارد (Kumar *et al*., 2009).

12. *Melissa officinalis* L.
13. explant
14. somatic embryogenesis
15. morphogenesis

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر محیط‌های مختلف کشت بر شاخص‌های مورفوفیزیولوژیک به لیمو

S.O.V.	D.F.	Mean of squares												
		Fresh weight of shoots	No. of leaves	Plantlet height	Index of chlorophyll	No. of internodes	No. of necrotic leaves	No. of shoots	No. of roots	Root length	Fresh weight of roots	Diameter of callus	Dry weight of roots	Dry weight of shoots
medium	9	1566.5**	*34.7*	**933.9	**92	**5.5	**4.7	**0.9	**21.9	*30.4*	*154.3*	**5.6	*6.4*	55.5**
error	20	133.44	4.72	36.21	8.26	1.54	0.9	0.15	0.89	2.22	10.56	0.27	0.44	8.75
C.V. (%)		17.1	16.25	16.15	15.04	22.95	29.8	24.1	23.9	29.51	18.86	23.29	22.92	24.97

ns: غیر معنی دار، * و **: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

جدول ۲. اثر محیط‌های مختلف کشت روی ویژگی‌های اندام هوایی به لیمو.

Medium number	Fresh weight of shoot	Number of leaves	Plantlet height	Index of chlorophyll	Number of internodes	Number of necrotic leaves	Number of shoot	Dry weight of shoot
1	39.38^{e}	10.33^{c}	19.23^{de}	17.07^{b}	3.9^{c}	2.2^{bcd}	1.67^{bc}	7.97^{d}
2	39.12^{e}	11.13^{c}	28.67^{d}	22.3^{ab}	4.1^{c}	4.67^{a}	1^{c}	7.08^{d}
3	$60.79d^{e}$	10.30^{c}	44.2^{c}	25.23^{a}	4.23^{c}	1.1^{d}	1.23^{bc}	7.08^{d}
4	108.42^{a}	20.77^{a}	12.5^{e}	11.1^{c}	8.33^{a}	3.2^{abc}	2.47^{a}	12.2^{bcd}
5	93.33^{ab}	12.43^{c}	29.4^{d}	18.01^{b}	5.33^{bc}	1.8^{cd}	1.77^{b}	12.03^{bcd}
6	55.05^{de}	13.23^{c}	42.3^{c}	22.44^{ab}	5.33^{bc}	4^{ab}	1^{c}	10.2^{cd}
7	52.80^{de}	11.09^{c}	49.8^{bc}	23.88^{a}	4.67^{bc}	2.5^{bcd}	1.2^{bc}	16.47^{ab}
8	68.03^{cd}	17.55^{ab}	22.57^{de}	8.47^{c}	6.77^{ab}	4.9^{a}	2.57^{a}	9.68^{cd}
9	85.23^{bc}	14.43^{bc}	56.53^{b}	20.3^{ab}	5.57^{bc}	3.97^{ab}	1.74^{bc}	14.68^{bc}
10	73^{bcd}	12.33^{c}	67.43^{a}	22.3^{ab}	5.9^{bc}	3.57^{ab}	1.57^{bc}	20.48^{a}

جدول ۳. اثر محیط‌های مختلف کشت روی ویژگی‌های ریشه به لیمو.

Medium number	Fresh weight of root	Root length	Diameter of callus	Number of root	Dry weight of root
1	15.17^{c}	1.57^{b}	3.03^{bc}	1.9^{c}	2.08^{de}
2	9.77^{cd}	6.87^{a}	1.23^{d}	3.77^{b}	1.07^{e}
3	14.2^{c}	7.57^{a}	0.57^{de}	7^{a}	1.62^{e}
4	28.2^{a}	0^{b}	4.3^{a}	0^{d}	5.31^{a}
5	25.03^{ab}	7.2^{a}	3.67^{ab}	3.3^{bc}	3.77^{bc}
6	10.87^{cd}	6.27^{a}	1.27^{d}	6.2^{a}	1.5^{e}
7	7.8^{d}	6.3^{a}	0.23^{e}	7.3^{a}	2.09^{ed}
8	14.67^{c}	0^{b}	3.29^{bc}	0^{d}	2.88^{cd}
9	24.53^{ab}	7.03^{a}	2.5^{c}	3.9^{b}	3.78^{bc}
10	22.03^{b}	7.6^{a}	2.33^{c}	5.9^{a}	4.79^{ab}

نیترات نقره به تنهایی در محیط کشت ۹ روی ریشه اثر مثبتی را نشان داده ولی بر خلاف انتظار اثر چندانی روی ریزش و پیری برگ نداشته و در هر دو تیمار حاوی نقره برگ نکروزه در بالاترین میزان قرار دارد.

حضور زغال‌فعال در محیط کشت با جذب اتیلن محیط و محدود کردن اثرهای زیان‌بار فنل‌های اکسید شده و آزاد شده توسط بافت گیاهی، باعث افزایش تعداد برگ و طول ساقه و کیفیت گیاهچه می‌شود. زغال‌فعال فیتوهورمون‌های اضافی و دیگر مواد ساخته شده در محیط را که مانع ریشه‌زایی می‌شوند جذب می‌کند و همچنین یک محیط تاریک شبیه به شرایط محیط طبیعی گیاه را فراهم می‌کند. همچنین تغییر pH محیط به یک سطح بهینه، جذب ناخالصی‌های آگار و مواد شیمیایی بازدارنده رشد که در زمان اتوکلاو توسط دهیدراسیون ساکارز تولید می‌شوند، از اثرهای دیگر زغال فعال است (Montazeri *et al*., 2011). تاثیر مثبت زغال‌فعال را می‌توان در محیط‌های کشت ۲ و ۶ روی بهبود خصوصیات ریشه مشاهده نمود.

۴. نتیجه گیری

انتخاب محیط کشت مناسب یکی از ضرورت‌های موفقیت در کشت بافت است. یکی از محیط‌های کشت بافت گیاهی که اکثر مواد مورد نیاز گیاهان را دارا می‌باشد و در بسیاری از تحقیقات از آن استفاده شده و نتایج رضایت‌بخشی به دنبال داشته است، محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) می‌باشد. محیط کشت مناسب برای رشد، تقسیم و تمایز سلول‌های ریز نمونه ضروری است که دارای آب، مواد غذایی و ویتامین‌ها به عنوان تنظیم کننده فعالیت-های متابولیکی سلول‌ها و سایر موادی باشد که سبب تسریع رشد ریزنمونه می‌گردد (Bagheri and Saffari, 2002). با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، می‌توان محیط کشت چهارم (MS حاوی BAP (5 mgL^{-1}) (Gupta *et al*., 2001) را با داشتن بالاترین میزان از شاخص‌های وزن تر شاخساره، تعداد برگ، تعداد میانگره، تعداد شاخه، وزن تر ریشه، قطر کالوس و وزن خشک ریشه به عنوان محیط مناسب کشت در شرایط آزمایشی اشاره شده انتخاب و معرفی نمود.

۵. منابع

Bagheri, E. and Saffari. M. 2002. *Principles of plant tissue culture*. University of Ferdowsi Mashhad press. pp. 406. (In Persian).

Dehghan, A., Ebadi, M.T., Naghdi badi, H.A., Shahriyari, F., Azizi, M. and Asghari, GH. 2010. An overview of the techniques in the production of tropane alkaloids. *Journal of Medicinal Plants*., Year 9. 1(32): 149-164. (In Persian).

Firoozi, A. 2009. *Suspension cultures of the herb milk thistle, Evaluation of silymarin production and use of somaclonal variation by ISSR*. M.Sc. Thesis of Agricultural Biotechnology. Colleague of Agriculture. Tabriz University. Pp. 130. (In Persian).

Ghaemi, E., Khorshidi, D., Moradi, A., Seifi, A., Mazendrani, M. and Bazouri, M. 2006. The Effect of Ethanol Extract of Lemon verbena on the Skin Infection due to Staphylococcus aureus in an Animal Model. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*., 22(3): 242-249. (In Persian).

Hosseini hashemzadeh, H., Mohebalipour, N. and Nourafcan, H. 2014. *Surface disinfection effect of different treatments on the growth of Stevia (Stevia rebaudiana Bert.) explants in vitro condition*. First National Conference on Medicinal Plants and sustainable agriculture. Hamadan. Pp. 10. (In Persian).

Kheiri, H., Safi khani, K. and Barati, E. 2006. *Planting method of yield of Lemon verbena in Hamadan. Proceedings of the National Conference on the Sustainable Development of Medicinal Plants*. Research Institute of Forests and Rangelands press. Pp: 249-250. (In Persian).

Moaveni, P. 2010. *Medicinal plants*. Volume I. Islamic Azad University – Shahre Qods Branch press. Pp: 398. (In Persian).

Mohebalipour, N. 2012. *Effect of growth regulators on Citral of Melissa ecotypes in vitro condition and evaluation of Genetic structure by ISSR markers*. PhD thesis if plant breeding. Colleague of Agriculture. Tabriz University. Pp: 166. (In Persian).

Montazeri, F., Omidi, M. and Imani, N. 2011. Comparing various methods of seed and embryo culture and charcoal effect in optimizing *in vitro* culture of Galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*., 26 (4): 583-595. (In Persian).

Mozaffariyan, V. 1999. *Dictionary of Iranian Plant Names.* Second Edition. Farhang Moaser press. pp. 596. (In Persian).

Nouroozi, P. 2007. *Direct regeneration from Hyacinth bulbs explants of two varieties (Atlantic and Carnegie) in vitro conditions*. M.Sc. thesis. Horticultural Science department. University of Tehran. Pp: 111. (In Persian).

Oladzad, A., Qaderi, A., Naqdi badi, H.A. and Zare karizi, A.R. 2013. Rapid propagation of Lemon verbena (*Lippia citriodora* H.B.K.) by *in vitro* culture. *Journal of Medicinal Plants*., 11(2): 145-153. (In Persian).

Rezaei, M.B. and Kamkar, J. 2000. Investigation of chemical composition of lemon verbena essential oils. *Pajoohesh and Sazandegi in agriculture and Horticulture*., 14(2): 13-15. (In Persian)

Sabeti, H. 2001. Iranian Forests, trees and shrubs. Yazd university press. Pp. 806. (In Persian).

Shahhosseini, R. and Omidbeigi, R. 2002. Evaluation of essential oil content and composition of Lemon verbena under organic. Seventh Congress of Horticultural Sciences. Pp: 2517-2519. (In Persian).

Shahhosseini, R., Ghorbani, H., Saleh, R. and Omidbeigi, R. 2012. Quantitative and qualitative evaluation of essential oil of lemon verbena seeds. *Journal of Plant Production research*., 17(4): 91-96. (In Persian).

Shams Ardakani, M.R., Haji Akhoondi, E., Jamshidi, A.H. and Mohammad Rafiee, P. 2006. Production and maintenance of plant cell cultures and comparison metabolites produced in callus and whole plant. *Journal of Medicinal Plants*., Fifth year. Volume 17. Pp. 21-26. (In Persian).

Zargari, E. 1993. *Medicinal plants*. University of Tehran press. Fifth Edition. Volume 6. Pp. 711-714. (In Persian).

Kumar, V., Parvatam, G. and Ravishankar, G.A. 2009. $AgNO_3$ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*., 2(2): 1-15.

Yang, C. and Sung, F. 2002. Effect of gibberellic acid and dormancy-breaking chemicals on flower development of Rhododendron pulchrum sweet and R. scabrum Don. *Scientia Horticulturae*., 83: 331-337.

Portmann, E., Lopez Nigro, M.M., Reides, C.G., Liesuy, S., Ricco, R.A., Wagner M.L., Gurni, A.A. and Carballo, M.A. 2012. Aqueous extracts of *Lippia turbinate* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *International journal of toxicology*., 00(0)1-11.

Severin, C., Bruzzese, D., Di Sapio, O., Gattuso, M. and Gattuso, S. 2006. Evaluation of *in vitro* behaviour of *Aloysia citriodora* Palau: histogical and chemical study. *Molecular medicinal chemistry*., Vol.11: 19-20.

Catalan, C.A.N. and de Lampasona, M.E.P. 2002. *The chemistry of the genus Lippia (Verbenaceae)*. In S.E. Kintzios, (ed.) Oregano: The genera Origanum and Lippia, Taylor and Francis; London 127-149.

Gupta, S.K., Khanuja, S.P.S. and Kumar, S. 2001. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. *Current Science.*, 81(2): 210-206.

Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*., 2: 243-253.

Nalwade, S.M., and Tsay, H.S. 2004. *In vitro* propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*., 40: 143-154.

Van Eck, J.M. and Kitto, S.L. 1990. Callus initiation and regeneration in Mentha. *HortScience*., 25(7): 804-806.

Braga, V.F., Mendes, G., Oliveira, R.T.R., Soares, C.Q.G., Resende, C.F., Pinto, L.C., Santana, R.D., Viccini, L.F., Raposo, N.R.B. and Peixoto, P.H.P. 2012. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activites of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). *Anaisda academia brasileria deciecias*., 84(1):139-147.

Turhan, H. 2004. The effect of silver nitrate (ethylene inhibitor) on in vitro shoot development in potato (*Solanum tuberosum* L.). Biotechnology., 3(1): 72-74.