# بررسی توان نوشاخه‌زایی گیاه دارویی *Salvia tebesana* Bunge در شرایط کشت In-vitro

**نیلوفر همتی[۱] ، منیره چنیانی[۲*] ، علی گنجعلی[۳]**

۱-دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

۲-دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

۳-دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

## چکیده

*Salvia tebesana* گیاهی دارویی و بومی طبس است که به طور کامل با شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی دوره-ای، فصلی و دمای شدید سازگاری دارد. هرچند این گیاه مقدار زیادی بذر تولید می‌کند اما به دلیل شرایط سخت محیطی، عموما قادر به تولید گیاه جدید از طریق بذر نیست، بنابراین برنامه‌های کشت و پرورش در شرایط آزمایشگاهی در جهت حفاظت از این گونه باارزش و در معرض خطر ضروری است. نوشاخه‌زایی در شرایط کشت درون شیشه و بررسی عوامل موثر برآن، یکی از مقدمات فرایند کشت در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) بر توان نوشاخه‌زایی گونه در شرایط درون شیشه انجام شده است. در این آزمایش ابتدا بذر گیاه وادار به جوانه‌زنی شد و گیاه کامل در شرایط کشت هیدروپونیک کشت گردید. سپس جداکشت مریستم راس ساقه از گیاه کشت شده در شرایط هیدروپونیک تهیه شد و بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف هورمون BAP (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) کشت داده شد. نتایج این بخش از آزمایش نشان داد که کاربرد BAP در غلظت‌های مختلف اثر مثبت برالقاء نوشاخه‌زایی دارد. به طوری که غلظت‌های بالای هورمون BAP (۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) منجر به افزایش معنی دار درصد نوشاخه‌زایی و تعداد شاخه-های تولیدی به ازای هر جداکشت شد. به این ترتیب، از شاخه‌های القاء شده در شرایط تیمار با BAP می‌توان در جهت ادامه بررسی‌ها و به منظور القاء ریشه‌زایی بهره برد.

**واژگان کلیدی:** *Salvia tebesana* Bunge ، کشت درون شیشه، نوشاخه‌زایی، هورمون BAP .

**مقدمه**

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان دراز از آن‌ها استفاده نموده‌است، به طوری‌که در حال حاضر نیز نه تنها ارزش خود را در زمینه تولید دارو از دست نداده‌اند بلکه اهمیت آن‌ها فزونی یافته است (حسینی وهمکاران، ۱۳۹۲). جنس *Salvia* متعلق به تیره Lamiacea و دارای بیش از ۹۰۰ گونه می‌باشد. در زبان پارسی به صورت عمومی "مریم‌گلی" یا "مریمی" نامیده می‌شود و در ایران حدود ۵۸ گونه دارد (Hedge, 1986). *Salvia* به صورت خودرو در اراضی خشک و سنگلاخی و در مناطق گرمسیری و معتدل توزیع شده است (Li *et al*., 2010). این گیاه دارای پیشینه تاریخی و کاربردی بسیار قدیمی حتی دورتر از جنس نعناع می‌باشد. در مکزیک پیش از اینکه مستعمره اروپا گردد و ذرت به عنوان گیاه غالب منطقه شود، *Salvia* گیاه خوراکی و مقدس مردم این منطقه بوده به طوری که از تمام اجزای آن استفاده خوراکی و دارویی می‌شده‌است (اورمزدی و چلبیان، ۱۳۸۵). گونه‌های این جنس دارای فعالیت های زیستی مختلف از جمله ویژگی آنتی‌اکسیدان (Kabouche *et al*., 2007)، ضدقارچ (Kobayashi *et al*., 1987)، سیتوتوکسیک (Aoyagi *et al*., 2008)، دیورتیک (Jimenez *et al*., 1986)، آنتی باکتریال (Ulubelen *et al*., 1999)، هموستاتیک، آرام‌بخش و ضدسرطان (Bormistrova *et al*., 2013) هستند. ترکیبات شیمیایی مختلفی در جنس *Salvia* گزارش شده‌است که از آن جمله فلاونوئیدها، سزکوئی‌ترپن‌ها، دی‌ترپنوئیدها، تری‌ترپن‌ها، سزترپن‌ها، استروئیدها و روغن‌های فرار می‌باشند (Farimani and Mazarei, 2014; Farimani and Bahadori, 2015; Jassib *et al*., 2016).

باززایی و ریزازدیادی در شرایط آزایشگاهی روشی بسیار مفید در جهت تولید گیاهان دارویی است. در ریزازدیادی می‌توان گیاهان عاری از پاتوژن تولید نمود (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲). دراین راستا تلاش‌های متعددی در جهت ریزازدیادی جنس‌های مختلف تیره نعناع صورت گرفته‌است. در کشت برگ گیاه *Salvia miltiorrhiza* Bunge در محیط کشت MS تحت تیمارهای هورمونی مختلف مشخص شد که بالاترین درصد نوشاخه‌زایی در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ می‌باشد (Tasi *et al*., 2016). بررسی اثر تیمارهای هورمونی بر میزان نوشاخه‌زایی *Salvia virgata* Jacq. نیز نشان داد که در حضور غلظت‌های مختلف BAP به ویژه غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر، میزان نوشاخه‌زایی افزایش می‌یافت اما اکسین بر نوشاخه‌زایی جداکشت‌ها اثر منفی داشت (ایزدقبول و همکاران، ۱۳۹۰). در پژوهشی در سال ۲۰۰۷، اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر ساقه زایی گیاه *Lavandula officinalis* مورد بررسی قرار گرفت و غلظت‌های ۵/۵ و ۶ میکرومولاربر لیتر هورمون BAP به عنوان غلظت‌های بهینه انتخاب شدند (Tyub *et al*.,2007). در سال ۲۰۱۰، اثر محیط کشت‌های مختلف و هورمون‌های BAP، TDZ و KIN بر تشکیل اندام هوایی گیاه *Salvia guaranitica* A.st.-Hil.ex Benth. مورد بررسی قرار گرفت. محققان دریافتند که محیط‌های کشت MS و LS تیمار شده با ۲/۲۲ میکرومولار BAP برای رشد جداکشت‌ها مناسب‌تر بود (Echeverrigaray *et al*., 2010). پژوهش حاضر با هدف بررسی توان نوشاخه‌زایی گونه *S.tebesana* در شرایط تیمار با سطوح مختلف هورمون BAP در شرایط کشت درون‌شیشه انجام شده‌است.

بهینه سازی نوشاخه‌زایی می‌تواند امکان استفاده از شاخه‌های نوپدید برای ادامه مطالعات و بررسی ریشه‌زایی آن‌ها را مهیا سازد.

## روش تحقیق

گیاه *Salvia tebesana* Bunge در اردیبهشت ماه از منطقه "پیکوه" و "نیسان" خراسان جنوبی جمع‌آوری گردید و بذرهای آن جدا شدند. بذرهای سالم، دست‌نخورده، هم‌اندازه و فاقد صدمات سطحی گیاه جهت استریل انتخاب شدند به این نحو که ابتدا توسط صابون و جریان پیوسته آب شسته شدند و پس از آن در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (v/v) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. شستشوی نهایی۳ مرتبه و توسط آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۳ دقیقه انجام شد. بذرهای استریل درون پتری‌های حاوی کاغذصافی استریل واتمن شماره یک قرار گرفتند و سطح کاغذصافی توسط ۰/۵میلی‌لیتر آب مقطر استریل مرطوب شد. پتری‌ها به شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در جهت القاء جوانه‌زنی منتقل شدند. جوانه زنی بذرها به طور میانگین پس از ۴ روز آغاز شد و طی یک هفته به مرحله دو برگی رسیدند و به منظور رشد بهتر به شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. رشد اولیه گیاهچه‌های دو برگی پس از ۱۰ روز به انجام رسید و به منظور رشد بیشتر به محیط غذایی هیدروپونیک منتقل شدند (Arnon and Hogland, 1940). گیاه شرایط هیدروپونیک به عنوان "گیاه مادر" نگه‌داری و از آن برای تهیه جداکشت در ادامه تحقیق استفاده شد.

## محیط کشت و جداکشت‌ها

به منظور بررسی و بهینه‌سازی نوشاخه‌زایی، از جداکشت مریستم راس ساقه گیاه مادری استفاده شد. در این بررسی از محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ساکارز (۳۰ گرم در لیتر) و آگار (۷ گرم در لیتر) استفاده شد. pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت فوق، در ظروف شیشه‌ای ریخته و در نهایت اتوکلاو شدند. جداکشت‌ها در زیر هود لامینار (JTLVC2, Jaltajhiz, IRAN) با استفاده از اتانول ۷۰ درصد (v/v) به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شسته شدند. جداکشت‌ها به بخش‌های ۰/۳ سانتی متر بریده شدند و بر سطح محیط کشت‌های مورد نظر قرار گرفتند. به منظور بررسی توان نوشاخه‌زایی، غلظت‌های مختلف هورمون BAP (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) بررسی و سپس غلظت‌های بهینه آن، به منظور تعیین موثرترین غلظت هورمون برای تولید شاخه نوپدید از نوشاخه‌های تولید شده بررسی شدند. جداکشت‌های قرار گرفته در محیط‌های کشت، به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۵درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از فعال شدن جداکشت‌ها، محیط‌های کشت به شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد منتقل شدند و صفات مورفولوژیکی ساقه زایی پس از ۳۰ روز انتقال به محیط کشت، ارزیابی شدند.

## صفات مورد بررسی

به منظور بررسی توان نوشاخه‌زایی، صفات درصد نوشاخه‌زایی (رابطه-۱)، تعداد نوشاخه‌ها به ازای هر جداکشت و میانگین طول نوشاخه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

تعداد جداکشت تبدیل شده به نوشاخه

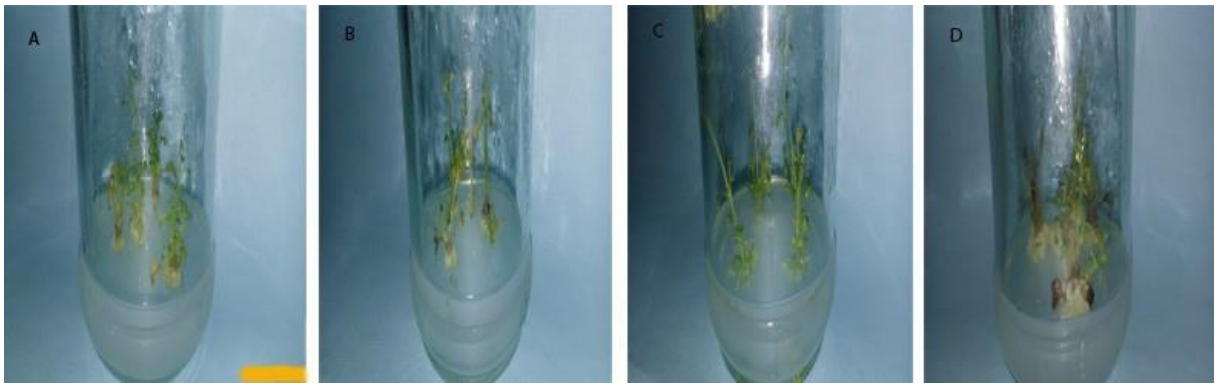
$$\text{درصد نوشاخه‌زایی} = \frac{\text{تعداد کل جداکشت کاشته شده}}{}$$ : رابطه-۱

## تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد (۴ جداکشت در هر تکرار). محاسبات آماری با استفاده از SPSS 16 و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن ($p\text{-value} \leq 0.001$) استفاده شد.

## نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که غلظت‌های مختلف هورمون BAP تاثیر معنی داری بر درصد نوشاخه‌زایی، تعداد نوشاخه به ازای هر جداکشت و طول نوشاخه داشتند ($p\text{-value} \leq 0.001$) شکل نوشاخه‌های متاثر از غلظت های مختلف هورمون BAP در شکل۱ ارائه شده‌است. بالاترین درصد نوشاخه‌زایی در جداکشت‌های تیمارهای ۱و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP دیده شد (جدول۱). هم‌چنین بیشترین تعداد نوشاخه با ۵/۲۶ و ۳/۷۳ نوشاخه ایجاد شده به ازای هر جداکشت، به ترتیب متعلق به تیمارهای ۲ و۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود (جدول۱).




**شکل۱- نوشاخه‌زایی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های A) ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، B) ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، C) ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، D) ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP.**

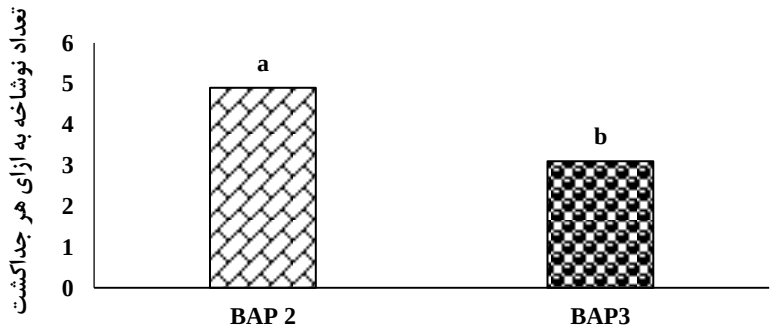
**جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین برخی صفات مورفولوژیکی نوشاخه‌زایی گیاه *S.tebesana* در حضور غلظت‌های مختلف هورمون BAP**

| غلظت هورمون BAP (میلی‌گرم بر لیتر) | صفات ریزازدیادی | | |
|---|---|---|---|
| | درصد نوشاخه‌زایی | تعداد نوشاخه (به ازای هر جداکشت) | طول نوشاخه‌ها (cm) |
| ۰/۵ | ۶۱/۶۶ b | ۱/۱۳۳ ±۰/۲۳۰ c | ۶ ± ۰/۵ b |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۸۳/۳۳ a | ۱/۴۶۶ ±۰/۱۱۵ c | ۶/۵ ± ۰/۵ ab |
| ۲ | ۱۰۰ a | ۵/۲۶۶ ±۰/۳۰۵ a | ۷/۶۶ ± ۰/۲۸۸ a |
| ۳ | ۶۶/۶۷ b | ۳/۷۳۳ ± ۰/۳۰۵ b | ۷/۵۳ ± ۰/۵ ab |

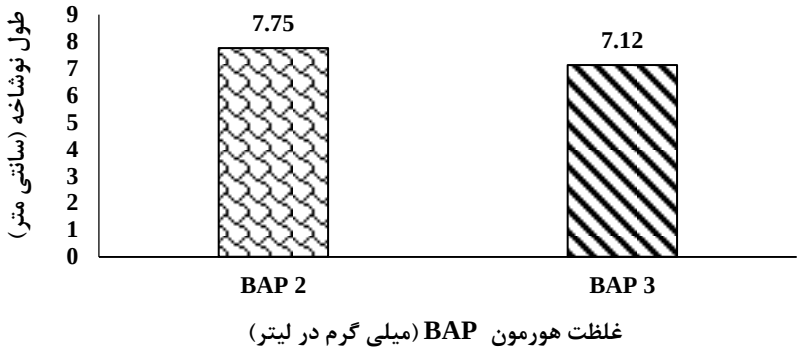
**- ستون‌های واجد حرف یا حروف مشترک، در سطح احتمال خطای ۰/۱٪ (p-value ≤ 0.001) تفاوت معنی‌داری ندارند.**

بیشترین طول نوشاخه نیز با اندازه‌های ۷/۶۶ و ۷/۵۳ سانتی متر به ترتیب در حضور غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شدند (جدول۱). از این رو غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در جهت واکشت‌های بعدی استفاده شدند. ارزیابی نوشاخه‌زایی (به ازای هر جداکشت) در حضور غلظت‌های ۲ و۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP نشان داد که در حضور غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP، نوشاخه‌زایی به میزان ۴/۹ (تعداد نوشاخه به ازای هر جداکشت) صورت گرفت (شکل۲). هم‌چنین طول نوشاخه در حضور غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP نشان داد که در حضور غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP طول ساقه به ۷/۷۵ سانتی متر رسید(شکل۳).




غلظت هورمون BAP (میلی گرم در لیتر)

**شکل۲- نتایج مقایسه میانگین داده‌های نوشاخه‌زایی به ازای هر جداکشت در حضور غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP**




**شکل-۳: نتایج مقایسه میانگین داده‌های طول نوشاخه در حضور غلظت‌های منتخب ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP**

## بحث و نتیجه‌گیری

کشت درون‌شیشه به عنوان روشی موفق در خصوص تولید گیاهان ایده‌آل مطرح است (Saha *et al*., 2011). در یک بررسی، تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP به عنوان محیط کشت ایده‌آل برای نوشاخه‌زایی گیاه *N. binaloudensis* معرفی شد (Nadjafipour *et al*., 2016). کاربرد خارجی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد، نقش بسیار مهمی در تشکیل شاخه و شدیداً بر شاخه‌زایی دارند (Rout, 2000). در این مطالعه بیشترین درصد نوشاخه‌زایی به محیط کشت MS+۱ میلی‌گرم بر لیتر و MS+۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP مربوط بود. هم‌چنین بیشترین تعداد نوشاخه‌های تولید شده در حضور غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP مشاهده شد. هورمون BAP در گیاهان *Mntha piperita* L. (Ghanti *et al*., 2003)، *Lavandula dentate* L. (Andrade *et al*., 2005)، *Lavandula officinalis* (Tyub *et al*., 2007) و *Salvia fruticose* Mill (Arikat *et al*., 2004) نیز بیشترین تاثیر را بر میزان ساقه‌زایی داشت. بیشترین میانگین طول نوشاخه، به تیمار هورمونی ۲ و ۳ میلی-گرم بر لیتر هورمون BAP مربوط بود. افزایش طول ساقه می‌تواند به دلیل تحریک تقسیم سلولی و افزایش طول ساقه‌ها تحت تأثیر این هورمون باشد. افزایش طول ساقه در گیاه *Salvia officinalis* L. (Tawfik and Mohamed, 2007) و *Thymus beleichrianus* Pomel (Aicha and Abdelmalek, 2014) نیز گزارش داده‌شده‌است. اما افزایش هورمون BAP در گیاه *Salvia nemorosa* L. باعث کاهش رشد طولی ساقه‌ها شد (Ewa and Wysokinska, 2004). در ارتباط با این موضوع، گزارش (Daniel *et al*., 2010) بر گیاه *Ocimum basilicum* L. نشان دادکه بهترین تیمار هورمونی برای نوشاخه‌زایی این گیاه، تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میانگین طول ساقه ۲/۳۸ سانتی‌متر بود. تفاوت در غلظت هورمونی این گزارش با پژوهش فعلی می‌تواند وابسته به نوع جداکشت به کار برده شده و نوع گیاه تحت بررسی بوده باشد.

**منابع**

اورمزدی، پریسا و چلبیان، فیروزه، مطالعه کشت بافت و اندام زایی در گیاه دارویی *Salvia nemorosa*، مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، دوره چهاردهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۵، ۶۹-۷۹.

ایزدقبول، سمیه، بهروزنام ، بهنام، صادقی، حمید، ریزازدیادی گیاه مریم گلی *Salvia virgata* L.، ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی، خوراسگان، ایران، ۱۳۹۰.

حسینی، امیر حسن، امیری فدردی، رضا، رستم پور کاریزکی، عقیل، آذرکیش، پیمان، نقش کشت بافت در بهبود تکثیر گیاهان دارویی، نخستین همایش ملی کاربرد گیاهان دارویی در سبک زندگی و طب سنتی ، تربت حیدریه، ۱۳۹۲.

Aicha, N. And Abdelmalek E. (2014). In vitro regeneration and clonal multiplication of *Thymus bleicherianus* Pomel, a rare and threatened medicinal and aromatic in Morocco. Medicinal and Aromatic Plants. 3:1 45.

Andrade, L. And Basso, R. (2005). Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants.− Biol Plantarum. 3: 439-442.

Aoyagi, Y., Yamazaki, A., Nakatsugawa, C., Fukaya, H., Takeya, K., Kawauchi, S. And Izumi, H. (2008). Salvileucalin B, a novel diterpenoid with an unprecedented rearranged neoclerodane skeleton from Salvia leucantha Cav, Org. Lett. 10 (20) 4429–4432.

Arikat, N.A, Javad F.M., Karam, N.S. And Shilbi, R.A. (2004). Micropropagatin and accumulation of essential oil in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill). − Sci Hortic. 100: 193-202.

Arnon, D. And Hoagland, D. (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. Journal of Soil Science 50: 463-485

Daniel, A., Kalidass, C. And Mohan, V.R. (2010). In vitro multiple shoot induction through axillary bud of *Ocimum basilicum* L. an important medicinal plant. − IJBT. 5:24-28.

Echeverrigaray, S., Postingher Carrer, R. And Bavaresco, A. L. (2010). Micropropagation of *Salvia guaranitica* benth through axillary shoot proliferaton. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53:883-888.

Ewa, S. And Wysokinska, H. (2004). In vitro regeneration of *Salvia nemerosa* L. from shoot tips and leaf explants.− In vitro Cel and Dev Biol Plant. 40:596-602.

Farimani. M.M, Bahadori. M.B, Koulaei. S.A., Salehi. P,. Ebrahimi. S.N,. Khavasi. H.R. And Hamburger. M. (2015). New ursane triterpenoids from *Salvia urmiensis* Bunge: absolute configuration and anti-proliferative activity, Fitoterapia 106 1–6.

Farimani, M.M. And Mazarei, Z. (2014). Sesterterpenoids and other constituents from *Salvia lachnocalyx* hedge, Fitoterapia, 98: 234–240.

Ghanti, K., Kaviraj, C.P., Venugopal, R.P., Jabeen, F.T.Z. And Rao, S. (2003). Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. of shoot tip and nodal explant. − IBJT. 5:594-598.

Hedge, I. C. (1986). Labiatae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 23-25.

Jimenez, J., Risco, S., Ruiz, T. And Zarzuelo, A, (1986). Hypoglycemic activity of *Salvia lavandulifolia*, Planta Med. 52 (04) 260–262.

Kabouche, Z. Kabouche, M. Öztürk, U. Kolak, G. And Topçu, G. (2007). Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*, Food Chem. 102 (4) 1281–1287.

Kobayashi, K., Nishino, C., Tomita, H. And Fukushima, M. (1987).Antifungal activity of pisiferic acid derivatives against the rice blast fungus, Phytochemistry 26 (12) 3175–3179.

Li, M., Peng, Y. And Xiao, P. (2010). Distribution of tanshinones in the genus Salvia (family Lamiaceae) from China and its systematic significance. Journal of Systematics and Evolution, 48 (2): 118–122.

Murashige, T. And Skoog, F. A. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15: 473-479.

Nadjafipour, N., Vali zadeh, M., Mostafavi, E. And Maassomi, A. (2016). Micro propagation study of *Nepeta binaloudensis* Jamzad in vitro culture. International conference on new horizon of biology in agricultural Science.

Rout, G. R., Samantaray, S. And Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advanced. 18(2): 91–120.

Tasi, K.L., Chen, E. And Chen, J. T. (2016). Thidiazuron-indused efficient propagation of *Salvia miltiorrhiza* through in vitro organogenesis and medicinal constituents of regenerated plants. Acta Physiologiae plantarum, 38:29.

Tawfik, A. A. And Mohamed M. F.( 2007). Regeneration of *Salvia officinalis* L. via induction of meristematic callus. −In Vitro Cel and Dev Biol Plant. 43:21-27.

Tyub, S., Kamili, A. And Kamili, A. (2007). Effect of BAP on Shoot Regeneration in Shoot Tip Cultures of *Lavandula officinalis*. Journal of Research & Development, 125-130.

Ulubelen, A. Topçu, G., Chai, H-B. And Pezzuto, J. M. (1999). Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from *Salvia hypargeia*, Pharm. Biol. 37 (2) 148–151.