بهینه سازی شرایط کشت برای تولید شاخساره در گیاه *Mentha mozaffarianii*

عبدالکریم زارعی*[۱]، مریم کریمی علویجه[۲]، محمد اسماعیل پور[۱]

[۱] گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران.

[۲]پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، محلات، ایران.

*نویسنده مسئول:zarei@*jahromu.ac.ir*

چکیده

در تحقیق حاضر اثر تیمارهای مختلف هورمونی و نوع ریزنمونه بر میزان تولید شاخساره در گیاه بومی پونه کوهی (*Mentha mozaffarrianii*) مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های برگ و گره این گیاه در محیط کشت MS جامد حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت‌های متفاوت ۲ هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (BA) (۱/۵، ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) کشت شدند و صفاتی از قبیل درصد کال‌زائی و میزان پرآوری شاخساره جدید مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹,۳,۱ مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مقایسه میانگین به روش دانکن صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصله، هر دو ریزنمونه‌های مورد استفاده قادر به تولید کالوس بودند ولی این ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر کال‌زایی و پرآوری شاخساره نشان دادند، به طوری که ریزنمونه‌های گره قادر به تولید میزان بیشتری برای هر دو فاکتور اندازه‌گیری شده بود. همچنین اثر تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد بر میزان پرآوری ریزنمونه‌های مختلف در سطح یک درصد معنی دار بود، به طوری که بیشترین میزان پرآوری در ریزنمونه‌های گره در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA ولی در مورد برگ در غلظت یک میلی گرم NAA و ۱/۵ میلی گرم بنزیل آدنین حاصل شد. بطور کلی در این پژوهش برای اولین بار شرایط کشت بافت برای گیاه اندمیک *M. mozaffarianii* بهینه شد و نتایج این تحقیق می‌تواند بطور عملی و کارا برای تکثیر رویشی و کارهای بیوتکنولوژیکی پیشرفته تر در این گیاه بومی با ارزش داروئی بالا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، ریز ازدیادی، ریزنمونه، کشت بافت، نعناء.

مقدمه

خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی می باشد که دارای ۲۳۶ جنس و بیش از ۷۲۰۰ گونه می‌باشد (Singh and Pandey, 2018). بیشتر گیاهان خانواده نعناعیان بخاطر دارای بودن ترکیبات متابولیت ثانویه با ارزش از قبیل ترپن‌ها و اسانس‌های متنوع در برگها، ساقه و اندامهای تولید مثلی خود دارای ارزش داروئی، بهداشتی و صنعتی بالایی می‌باشند. جنس نعناء دارای ۲۵ تا ۳۰ گونه می باشد که در سرتاسر دنیا بخصوص در جنوب آفریقا، استرالیا و مناطق معتدله اوراسیا پراکنش دارد (Dorman *et al.*, 2003). در ایران شش گونه از جنس نعناء گزارش شده است که عبارتند از *M. spicata, M. suaveolens, M. aquatic, M. arvensis, M. longifolia, M, mozaffarianii* و گونه داروئی *M. mozaffarianii* تنها گونه نعناء می‌باشد که اندمیک ایران بوده و در نواحی مختلف مرکزی و جنوبی ایران بصورت خودرو وجود دارد و بنام "پونه کوهی" در مناطق مختلف معروف می باشد (Tavakkoli-Khaledi and Asgarpanah, 2016). گیاه نعناء بخاطر ویژگی‌های داروئی بسیار زیاد از قدیم در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می‌گرفته و خواص آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است. منتول، پلی گون و کاروون از جمله مهمترین متابولیت های موجود در اسانس نعناء می‌باشند که باعث ارزش بالای داروئی این جنس می گردد (Hussain *et al.*, 2010).

روش‌های جدید و کاربردی کشت بافت و سلول گیاهی فرصت مناسبی را فراهم نموده است که بتوان میزان بیشتری از ترکیبات متابولیتی با ارزش ثانویه دست را در شرایط آزمایشگاهی فراهم نمود. علاوه بر این استفاده از این روش‌ها باعث شده تغییر پروفیل و بهبود میزان ماده موثره گیاهان داروئی و افزایش تولیدات فیتوشیمیایی امکانپذیر گردد. بنابراین این تکنیک‌ها پتانسیل بالایی برای استفاده در کارهای بهنژادی و همچنین ازدیاد گیاهان داروئی دارا می‌باشند که می‌تواند در نهایت منجر به بهره‌وری بیشتر از گیاهان داروئی گردد. امروزه گیاهان باغی مختلفی بطور موفقیت‌آمیز از طریق کشت بافت تکثیر و مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. استفاده از شرایط کشت بافت گیاهی یکی از راه‌های اصلی تولید متابولیت‌های مفید گیاهان داروئی می‌باشد و تحقیقات فراوانی در زمینه استفاده از

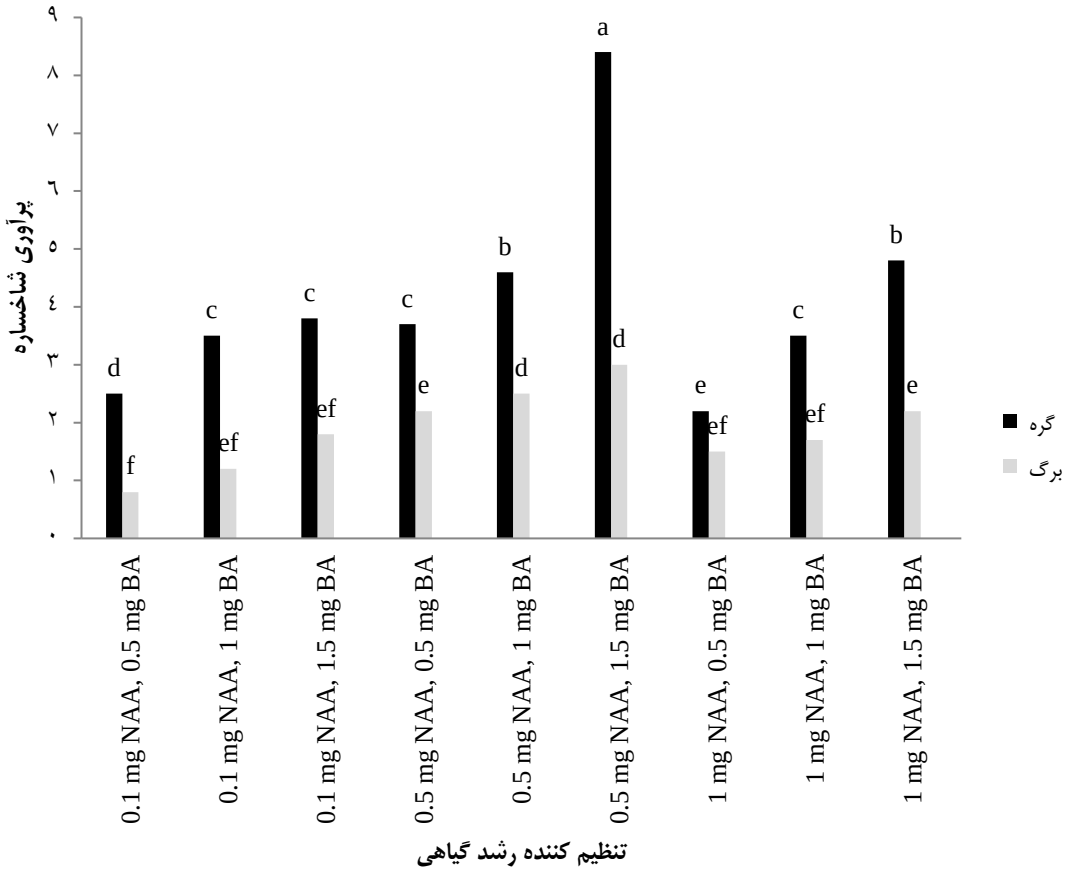
تکنولوژی کشت سلول و بافت های گیاهی در شرایط درون شیشه، به عنوان سیستم جایگزین برای تولید مواد موثره با ارزش صورت گرفته است (زارعی و همکاران، ۱۳۹۹). یکی از مهمترین کاربردهای کشت بافت گیاهی تکثیر کلونی گیاهان در مقیاس وسیع می‌باشد که این تکنیک می‌تواند بخصوص برای گیاهانی که تکثیر رویشی ضعیفی داشته و یا بعلت فعالیت‌های بشری در خطر انقراض می‌باشند، اهمیت مضاعفی داشته باشد. توسعه تکنیک‌های ریز ازدیادی در مقیاس وسیع برای گیاهان داروئی با ارزش برای تامین نیاز داروئی و جلوگیری از انقراض گونه‌های اندمیک و در معرض خطر بسیار ضروری می‌باشد (Rahman *et al.*, 2013). هرچند گیاه داروئی *M. mozaffarianii* در مناطق مختلفی از کشور ایران بصورت خودرو وجود دارد و بعنوان گیاهی بومی این کشور مد نظر می‌باشد، ولی تاکنون در زمینه کشت بافت این گیاه تحقیقی صورت نگرفته است. بنابراین در پژوهش حاضر سعی بر آن شد تا فاکتورهای مختلف برای القاء کالوس و پرآوری در شرایط درون شیشه در مورد این گیاه مورد بررسی قرار گیرد. لذا به منظور انجام بررسی‌های بیشتر در مورد شرایط کشت بافت این گیاه در این پژوهش سعی شد اثر تیمارهای مختلف هورمونی NAA و BA و همچنین نوع ریزنمونه بر میزان پرآوری این گیاه بومی ایران بررسی گردد.

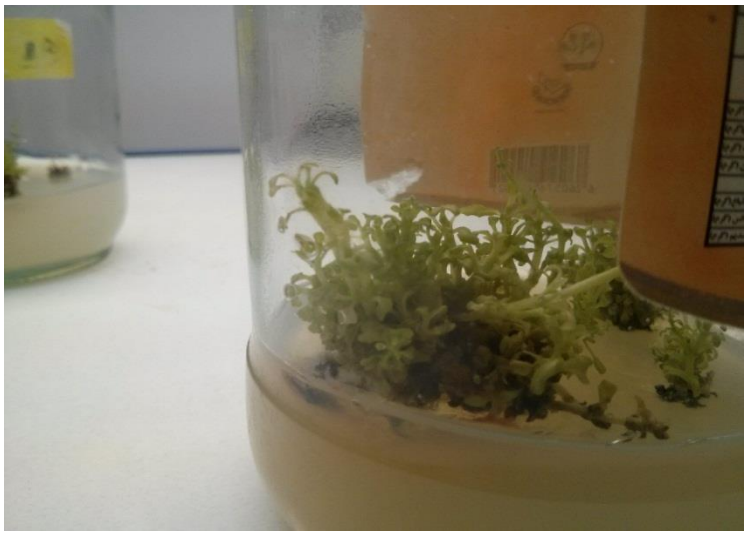
مواد و روش‌ها

گیاهان نعناء خودرو برای استفاده در این پژوهش از دامنه کوههای شهرستان جهرم جمع‌آوری و به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی منتقل شدند و قطعاتی از ریزنمونه برگ‌های تازه رشد کرده و همچنین گره ساقه جدا شدند. ریزنمونه‌های جدا شده پس از شستشوی سطحی، توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت ۱/۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و در نهایت پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل در کابینت لامینار برای کشت در محیط‌های از پیش تهیه شده استفاده شدند. در این پژوهش از محیط کشت پایه MS به همراه منبع اکسین نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و همچنین منبع سیتوکنین بنزیل آدنین (BA) با غلظت‌های ۱/۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. به‌عنوان منبع کربوهیدراتی، ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر و به‌عنوان عامل ژله‌ایی کننده، ۷/۵ گرم در لیتر آگار به محیط افزوده شد. با استفاده از دستگاه پی اچ سنج دیجیتالی، پی اچ محیط‌های تهیه شده قبل از افزودن عامل ژله‌ایی کننده در محدوده ۵/۹-۵/۷ تنظیم گردید. همچنین تیمار ۲ گرم بر لیتر زغال فعال برای جلوگیری از قهوه‌ایی شده ریزنمونه‌ها استفاده شد. سه تکرار از ریزنمونه‌های مختلف با ۷ مشاهده در هر پتری دیش در نه غلظت مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از ثبت داده‌ها، از نرم افزار SAS نسخه ۹,۱,۳ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و آزمون معنی‌داری تیمارها در سطح یک درصد استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ایی دانکن انجام گرفت. به منظور نرمال کردن داده‌های درصد کالوس‌زایی، از Arcsin داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

براساس نتایج حاصل از این تحقیق هر دوی نوع ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تاثیر معنی‌داری بر القاء شاخساره از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های گیاه *M. mozaffarianii* دارا بودند. ریزنمونه‌ها از اواخر هفته دوم بعد از کشت در محیط القاء کالوس، شروع به تولید کالوس کردند. با توجه به مواد بالای فنولی در این گیاه دو نوع تیمار محیط کشت دارای زغال فعال و فاقد زغال فعال برای مرحله کالوس‌زائی مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج نشان داد که استفاده از زغال فعال به‌میزان ۲ میلی‌گرم بر لیتر به میزان بسیار زیادی باعث کاهش قهوه‌ایی شدن و بهبود کالوس‌زائی در گیاه نعناء وحشی گردید. کالوس‌های حاصله در هفته چهارم به محیط پرآوری منتقل شدند. بر اساس نتایج هر دو ریزنمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش قادر به ایجاد شاخساره در محیط کشت بودند ولی میزان پرآوری گیاه *M. mozaffarianii* در ریزنمونه‌های حاصل از گره بسیار بیشتر از ریزنمونه‌های حاصل از برگ بود. نتایج نشان داد که اثر نوع ریز نمونه روی درصد کالوس‌زایی و میزان پرآوری در سطح احتمال ۱ معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر میزان کالوس‌زایی و پرآوری این گیاه معنی‌دار بود (تصویر ۱). به‌عبارتی بیشترین میزان پرآوری شاخساره در تیمار های ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین از ریزنمونه‌های حاصل از گره حاصل شد. در حالیکه کمترین میزان در ریزنمونه‌های برگ و در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین حاصل شد.





تصویر ۱. بالا: اثرات غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر میزان پرآوری در دو ریزنمونه گیاه *M. mozaffarianii*، پایین: تولید شاخساره در این گیاه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA.

براساس نتایج این پژوهش با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل‌آدنین از ۰/۵ میلی‌گرم به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و بدون در نظر گرفتن غلظت تنظیم کننده رشد NAA، میزان پرآوری در هر دو ریزنمونه گره و برگ افزایش یافت. مطالعات متعددی در زمینه استفاده از نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر میزان کالزائی و پرآوری گیاهان داروئی وجود دارد. در مطالعات قبلی در زمینه ریزازدیادی

گیاهان داروئی، کارآیی بیشتر پرآوری از ریزنمونه‌های گره نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها گزارش شده است و BAP بعنوان یکی از موثرترین سیتوکنین‌ها برای القاء شاخساره‌های بیشتر در شرایط درون شیشه پیشنهاد شده است (Anand and Jeyachandran, 2004; Raja and Arockiasamy, 2008). به هر حال به نظر می‌رسد که تیمار بالاتر هورمون سیتوکنین مورد استفاده تاثیر بیشتری در افزایش تعداد شاخساره در این گیاه دارد. در مطالعات قبلی برای گونه دیگر نعناء فلفلی ترکیبی از هورمون بنزیل‌آدنین (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۳ میلی‌گرم بر لیتر) مناسب‌ترین تیمار برای تولید شاخساره از ریزنمونه‌های گره گزارش شده است (Mehta *et al.*, 2012). بطور مشابه استفاده از محیط MS دارای غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA منجر به بیشترین تعداد شاخساره و بلندترین شاخساره‌ها در تکثیر درون شیشه *Mentha viridis* L. گردید (Rahman *et al.*, 2013). نتایج قبلی بیانگر این است که غلظت‌های بالای سایتوکنین نسبت به اکسین در مرحله پرآوری باعث شکل‌گیری شاخساره‌های جانبی خواهد شد. به هرحال با در نظر گرفتن میزان اکسین در محیط کشت به نظر می‌رسد که غلظت‌های متوسط و کم از هورمون NAA می‌تواند تاثیر مثبت و معنی‌داری در القاء شاخساره در این گیاه داشته باشد. در اصل برای القاء بهتر شاخساره، ترکیبی از غلظت‌های کم اکسین به همراه سیتوکنین در خیلی از مطالعات قبلی استفاده شده و تاثیر مثبت این ترکیب مشاهده شده است (Sebastinraj and Sidique, 2011; Rahman *et al.*, 2013). همچنین استفاده از هورمون اکسین در مرحله پرآوری می‌تواند تاثیر مثبتی در مراحل بعدی ریزازدیادی داشته باشد و باعث بهبود ریشه‌زائی در مرحله قبل از انتقال گردد (Hesami *et al.*, 2018). همچنین نوع ریزنمونه بسیار موثر در تولید شاخساره بود و نتایج نشان داد که استفاده از ریزنمونه گره می‌تواند به میزان بسیار زیادی باعث بهبود کالزائی و تولید شاخساره نابجا در گیاه نعناء گردد. نتایج حاصل از این پژوهش تائید کننده نتایج مربوط به دیگر گونه نعنا (*M. viridis* L.) می‌باشد که گره بعنوان ریزنمونه مناسب برای پرآوری در این گیاه پیشنهاد شده است (Rahman *et al.*, 2013). این مشاهدات ممکن است ناشی از وجود آغازه‌های شاخساره نابجا در محل گره‌ها و همچنین غلظت متفاوت هورمون‌های درونزاد در ریزنمونه‌های مختلف باشد. تاثیر متفاوت ریزنمونه‌ها و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (زارعی و همکاران، ۱۳۹۹; Rahman *et al.*, 2013). به عبارتی این احتمال وجود دارد که میزان هورمون درون‌زاد گره بطور سینرژید با سطح مناسب تنظیم کننده رشد برون زاد عمل نموده و باعث القاء بهتر کالوس و پرآوری شاخساره از ریزنمونه های مورد نظر گردد.

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش به معرفی روشی کارا و مفید برای کالوس زائی و القاء شاخساره نابجا در شرایط درون شیشه ایی برای گیاه *Mentha mozaffarianii* ارائه میدهد. بر اساس نتایج این تحقیق گره بعنوان ریزنمونه مناسب و هورمون بنزیل‌آدنین به همراه غلظت‌های متوسط و کم اکسین NAA برای افزایش تعداد شاخساره از این گیاه پیشنهاد می‌گردد. بطور کلی نتایج این پژوهش می تواند برای تکثیر رویشی این گیاه اندمیک در مقیاس وسیع و همچنین برای کاربرد در مطالعات بیوتکنولوژیکی پیشرفته تر از جمله کشت سلول و برنامه‌های انتقال ژن در مورد این گیاه با ارزش بومی استفاده گردد.

منابع

زارعی، ع.، سلاجقه، ف.، کمالی زاده، م.، ۱۳۹۹. اثر تیمارهای مختلف تنظیم کننده های رشد، نوع ریزنمونه و روشنایی بر تولید کالوس گیاه داروئی گزنه (*Urtica dioica L*). تولیدات گیاهی، ۴۳(۲): ۲۵۵-۲۶۶.

Anand S.P., Jeyachandran R. 2004. *In vitro* multiple shoot regeneration from nodal explants of *Zehneria scabra* (L.f.) Sonder – An important medicinal climber. Plant Tissue Culture, 14**:** 101-106.

Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem*istry 83: 255–262. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00088-8

Hesami, M., Daneshvar, M.H., Yoosefzadeh-Najafabadi, M., Alizadeh, M. 2018. Effect of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis of *Ficus religiosa* through seedling derived petiole segments. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 16: 175–180. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.11.0.

Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P., Ashraf, M., Gilani, A. 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. Journal of Science Food Agriculture 90: 1827–1836. doi: 10.1002/jsfa.4021

Mehta, J., Naruka, R., Sain, M., Dwivedi, A., Sharma, D., Mirza, J., 2012. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Pipperment). Asian Journal of Plant Science and Research, 2 (4): 518-523.

Rahman, M.M., Ankhi, U.R., Biswa, A. 2013. Micropropagation of *Mentha viridis* L.: An aromatic medicinal plant. International Journal of Pharmacy & Life Sciences. 4(9): 2926-2930.

Raja, H.D., Arockiasamy D.I. 2008. *In vitro* propagation of *Mentha viridis* L. from nodal and shoot tip explants, Plant Tissue Culture & Biotechnology, 18(1): 1- 6.

Sebastinraj, J., Sidique, K.M.I. 2011. *In vitro* rapid clonal propagation of *Aristolochia bracteolata* Lam. (Aristolochiaceae)-a valuable medicinal plant, World Journal of Agricultural Sciences, 7(6): 653-658.

Singh, P., Pandey, A.K. 2018. Prospective of essential oils of the genus *Mentha* as biopesticides: A review. Frontier in Plant Science, doi; https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01295

Tavakkoli-Khaledi, S., Asgarpanah, J. 2016. Essential oil chemical composition of *Mentha mozaffarianii* jamzad seeds. Journal of Mexican Chemistry Society, 60(1): 19-22.

Optimization of *in vitro* culture condition for proliferation of *Mentha mozaffarianii*

Abdolkarim Zarei[1]*, Maryam Karimi Alvijeh[2], Mohamad Esmailpoor[1]
[1]Department of Plant Production and Genetic (Biotechnology), Agriculture College, Jahrom University, Jahrom.
[2]*Ornamental Plants Research Center (OPRC), Horticulture Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat, Iran.*
[*]*Corresponding Author: zarei@jahrom.ac.ir*

Abstract

In the present study, the effect of different hormonal treatments and explant types were investigated on the proliferation of Iranian native medicinal plant *Mentha mozaffarianii*. Different explants including leaf and node of this plant were cultured in the solid MS medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose and different concentrations of NAA (0.1, 0.5 and 1 mg L^{-1}) and BA (0.5, 1 and 1.5 mg L^{-1}) and the number and length of induced shoots were analyzed. Analysis of variance were carried out by SAS software ver. 9.3.1 and mean comparison was conducted using Duncan Multiple Range Test. According to the results, both explants successfully induced adventitious shoots under in vitro condition, but a significant differences was recorded for callus induction and number of produced shoots. According to results, node explants had significantly higher rate of callus induction and adventitious shoot regeneration. In addition, inclusion of activated charcoal (2 g L^{-1}) in the culture media significantly reduced the callus browning and lead to a higher callus and shoot induction. In addition, effects of hormonal treatments were significantly different on shoot regeneration and the highest percentage of shoots was obtained from node explants in the medium containing 0.5 mg L^{-1} NAA and 1.5 mg L^{-1} BA. Altogether, for the first time we optimized the *in vitro* culture condition for *Mentha mozafarrianni* and this the protocol described here can be used reliably for multiplication and in the advanced biotechnological experiments on this important medicinal plant.

Keywords: Explant, Mentha, Micropropagation, Proliferation, Tissue culture.