باززائی و کشت درون شیشه ای سه گونه نعناع ایرانی با استفاده از کشت مریستم، گره و دیسک برگی

فرزانه حیدری (۱)، مجید طالبی بداف (۲)، سودابه جهانبخش (۱)، سیروس قبادی (۳)، مرضیه افاضل (۳)

۱- گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی. ۲- گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.۳- گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

نعناع (*Mentha sp.*) یک سبزی مهم و اقتصادی با کاربردهای دارویی و غذایی مختلف است که دراکثر نقاط دنیا کشت می شود. با وجود استفاده فراوان از این گیاه، اطلاعات کمی در مورد کشت بافت آن وجود دارد. در این تحقیق، شرایط لازم برای تکثیر و تولید سه رقم نعناع ایرانی (*M.piperita*، *M.spicata*، *M.longifolia*) با استفاده از کشت مریستم، برگ و گره مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. ریزنمونه های جدا شده روی محیط کشت MS حاوی مقادیر مختلفی از هورمون های ۱- نفتالین استیک اسید و ٦- بنزیل آمینو پورین کشت شدند. ۸ هفته پس از کشت، داده برداری انجام و آنالیز نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SAS صورت گرفت. در دو گونه *M.spicata* و *M.longifilia* با وجود تولید کالوس های سبز و فشرده در اطراف ریزنمونه های برگی، باززائی مشاهده نشد. در *M.piperita* نیز در تمامی غلظت های هورمونی قطعات برگی نکروزه گردیده، از بین رفتند. پاسخ ریزنمونه های گره و مریستم در هر سه گونه مشابه بوده و به ترتیب در غلظت های ۱/٥mg/L بنزیل آمینوپورین و ۰/٥ mg/L نفتالین استیک اسید برای گره و ۱/٥ mg/L بنزیل آمینوپورین و ۱ mg/L نفتالین استیک اسید برای مریستم بالاترین میزان باززائی مشاهده شد. با اینکه به نظر می رسد از کشت مریستم در نعناع بیشترین تعداد شاخساره حاصل می شود، اما بررسی جهت باززا نمودن دیسک های برگی این گیاه همچنان ادامه دارد.

کلمات کلیدی: Mentha sp،نعناع،۱- نفتالین استیک اسید اسید،٦- بنزیل آمینو پورین،

مقدمه:

استفاده از گیاهان دارویی برای سلامتی از هزاران سال پیش آغاز گردیده و هنوز هم بخشی از حرفه‌ی پزشکی در جهان است (آفتاب وهمکاران،۱۹۹۹). جنس نعناع (*Mentha*) یکی از جنس‌های خانواده‌ی نعناعیان (Lamiaceae) بوده که دارای توزیع وسیع و اهمیت قابل ملاحظه‌ای است و در هر پنج قاره جهان کشت می‌شود. اعضای این خانواده از ارزش دارویی و تجاری فراوان برخوردارند، ساقه‌ها و برگ‌های چندین گونه‌ی آن اغلب به عنوان ادویه و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (زینلی،١٣٨٤). جنس *Mentha* شامل تعداد زیادی گونه‌ی وحشی با سطوح مختلف پلوئیدی است که تکثیر آنها به هر دو روش جنسی و غیرجنسی انجام می‌شود. اسانس نعناع دارای ترکیبات Limonene, Cineol, Polygon وPiperitone بوده و در گونه‌های مختلف منجر به ایجاد خواص ضد تغذیه و دفع کننده حشرات (هوری،۱۹۹۹) ضد ویروس و باکتری، ایمنی بخشی (جورجنس و همکاران،۱۹۹۸) و خاصیت ضد پیری (علی و همکاران،۱۹۹۸) می شود. کشت بافت نعناع در ایجاد تنوع سوماکلونال، تولید هیبریدهای سوماتیکی و تولید گیاهان ترانسژنیک کاربرد دارد (سادیاو همکاران،۲۰۰۹). هدف از این تحقیق، کشت بافت ارقام نعناع ایرانی و بررسی تاثیر محیط کشت روی ریزنمونه‌های مختلف در حضور هورمون‌های متفاوت می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

در پژوهش حاضر از سه ریزنمونه گره، برگ و مریستم گونه‌های *M.piperita*، *M.longifolia*، *M.spicata* (تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان) برای کشت بافت استفاده شد. به منظور استریل سازی سطحی ابتدا شستشوی کامل ریزنمونه‌ها با آب و مایع ظرفشوئی انجام و سپس از اتانول ۷۰ درصد و وایتکس تجاری ۱۰ درصد استفاده شد. در پایان ریزنمونه‌ها چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شده و در محیط کشت MS[15] (موراشینگ و

[15] - Murashige and Skoog

اسکوگ،١٩٦٢) با غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین[16] (بعنوان سیتوکینین) و نفتالین استیک اسید[17] (بعنوان اکسین مصنوعی) قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ از بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک اسید و در چهار تکرار انجام گرفت. ۸ هفته پس از کشت تعداد شاخساره‌ها، طول شاخساره اصلی، تعداد گره‌ها و همچنین تعداد برگ‌ها شمارش و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز نتایج انجام شد.

نتایج و بحث:

به منظور کشت درون شیشه‌ای گونه‌های *M. pulegium*، *M.piperita*، *M.arvensis*، *M. suaveolenshybrid*، *M.spicata*، *M.suaveolens* و *M.viridis* از دیسک برگی، گره، میانگره و نوک ساقه به عنوان ریزنمونه برای اندام‌زایی مستقیم یا غیرمستقیم استفاده شده است (وانک ۱۹۹۰، کایسارد ١٩٩٦، رد ۱۹۹۹ و سادیا سرور ۲۰۰۹). نتایج حاصل از این بررسی‌ها دیسک برگی را ریزنمونه مناسبی برای کشت بافت نعناع تشخیص نداده و میزان باززائی شاخساره از آن را در حدود ۵٪ گزارش نموده است. در پژوهش حاضر نیز ریزنمونه‌های برگی در گونه *M.piperita* در هیچ یک از غلظت‌های هورمونی پاسخ قابل قبولی نشان ندادند، در حالی که در دو گونه *M.spicata*، *M.longifilia* با وجود تولید کالوس‌های سبز مناسب باززائی مشاهده نشد. از آنجائی که کاربرد غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد زآتین[18] و تیدیازورون[19] به ترتیب در دیسک‌های برگی گیاه فلفل دلمه‌ای و توت فرنگی نتایج مناسبی به همراه داشته است (فواد و همکاران، ۲۰۰۹. گاتز و روگوزینکا،١٩٩٤)، تاثیر این دو هورمون در گیاه نعناع نیز بررسی خواهد شد.

ریزنمونه‌های مریستم و گره نسبت به دیسک‌های برگی برای باززایی شاخساره مناسب‌تر تشخیص داده شده‌اند. سادیا سرور (۲۰۰۹) گزارش نموده است که بیشترین فراوانی باززایی (۷۰٪) با میانگین ۱/۷ شاخساره از هر مریستم ساقه در محیط MS با غلظت ۱/۵mg/l بنزیل آمینوپورین حاصل شده است، در حالی که در این بررسی کشت مریستم در محیط MS با غلظت ۱/۵mg/l بنزیل آمینوپورین و ۰/۵mg/l نفتالین‌استیک اسید نتیجه بهتری داشته است. همچنین بیشترین تعداد شاخساره از هر ریزنمونه گره در محیط کشت MS در غلظت ۱/۵mg/l بنزیل آمینوپورین و ۱mg/lنفتالین استیک اسید حاصل گردید که دارای مشابهت تقریبی با نتایج سادیا سرور (۲۰۰۹) با باززایی به میزان ۸۵٪ با میانگین ۱/۲ شاخساره از هر ریزنمونه مریستمی در محیط MS با غلظت ۱/۵mg/l بنزیل آمینوپورین می‌باشد. با این وجود در هر سه گونه *M.piperita*، *M.longifolia*، *M.spicata* مریستم ساقه در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها تعداد بیشتری شاخساره تولید نمود.

[16] -6- benzylaminopurine
[17] -1- Naphthaleneacetic acid
[18] Zeatin
[19] Thidiazuron

منابع:

١- زینلی، ح.،١٣٨٤. بررسی تنوع صفات زراعی، سیتوژنتیک و فیتوشیمیایی در نعناع‌های ایرانی، پایان نامه دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

2- Aftab, K., A.A Sial 1999. Phytomedicine New and old approach. *Hamdard Medicus*, *pp*. 22-28.

3- Ali, M.A., Saleem, M. Ahmad., W. Parvez and M. Yamdagni. 2002. A chlorinated monoterpene ketone, acylated -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochem*. 59: 889-895.

4- Caissard, J.C., Faure, O., Jullien, F., Colson, M., Perrin, A. 1996. A direct regeneration *in vitro* and transient GUS expression in *Mentha piperita. Plant Cell Rep*.16: 67-70.

5-Gatz, A. and J. Rogozinska. 1994. *In vitro* organogenetic potential of cotyledon and leaf explants of *Capsicum annuum* L. cv. Bryza. *Acta Soc*. *Bot.pol*. 63:255-258.

6-Fouad H .Mohamed, Mohamed S. Betagi, Mona A. Ismail and Ginesia F. omar. 2007. High Frequency, Direct Shoot Regeneration from Greenhouse-Derived Leaf Disks of Six Strawberry Cultivars. *Pakistan Journal* of *Biological Sci*. 10(1): 96-101.

7- Hori, M. 1999. Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Appl*. *Entomol*. *Zoo*. 34: 113-118.

8-Juergens, U.R., Stober, M., Vetter, H. 1998. The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes in vitro: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *Eur*. *J*. *Med*. *Res*. 3: 539-45.

9- Paula Gardiner, M.D.2000. Peppermint *(Mentha piperita)*. The Longwood Herbal Task Force (http://www.mcp.edu/herbal/default.htm) and The Center for Holistic Pediatric Education and Research(http://www.childrenshospital.org/holistic/).

10- Reed, B.M. 1999. *In vitro* storage conditions for mint germplasm. *Hort*. *Sci*. 34: 350-352.

11- Sadia, S., Zia,M., Riaz, R., Zarrin, F., Ahmad Sial, R., Chaudhary, M. F.2009. *In vitro* direct regeneration in mint from differen explants on half strength MS medium. *African Journal of Biotechnology Vol*. 8 (18), pp. 4667-4671.

12- Van Eck, J.M., Kitto, S.L. 1992. Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. *Plant Cell Tiss*. *Org*. *Cult*. 30: 41-46**.**

Regeneration and *in vitro* cultivation of three Iranian *Mentha* species using meristem, node and leaf disk cultures

Farzaneh Heidari[1], Majid Talebi[2], Soodabeh Jahanbakhsh[1], Cyrus Ghobadi[3], Marzieh Afazel[3].
1-Department of Agriculture Biotechnology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabili, 56199-11367, Iran
2- Department of Agriculture Biotechnology, Isfahan University of Technology, Isfahan, 94156-83111, Iran
3- Department of Horticulture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 94156-83111, Iran

Abstract:
Mint (*Mentha sp*.) is one of the important and economical vegetables with application in various medical and nutritional industries in the most parts of the world. Despite the abundant use of this plant, there is a little information about its tissue culture. In this study, *In vitro* regeneration of three Iranian Mentha species includes *M.piperita, M.spicata, M.longifolia* were investigated using shoot meristems, nodes, and leaves explants on MS salts and vitamins supplemented with various concentrations of BAP alone or with NAA. Eight weeks after cultivation, the results were statically analyzed by using SAS software. Leaves explants from *M.spicata, M.longifolia* varieties only produced callus and Leaves explants of *M.piperita* failed to generate shoots at any combination of BAP and NAA with necrosis of explants after few days of inoculation. It was found that shoot meristems and nodes were more potent for shoot regeneration as compared to leaf disk explants. The highest frequency of shoot regeneration from meristem and nodal segments were recorded on MS medium supplemented with 1.5 mg/l BAP and 1.5 mg/l NAA. However shoot meristem explants produced more number of shoots, the regeneration of its leaf disk explants would be continued.