



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

عبدالکریم زارعی^{۱*}، مریم کریمی علویجه^۲، محمد اسماعیل پور^۱

^۱گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران

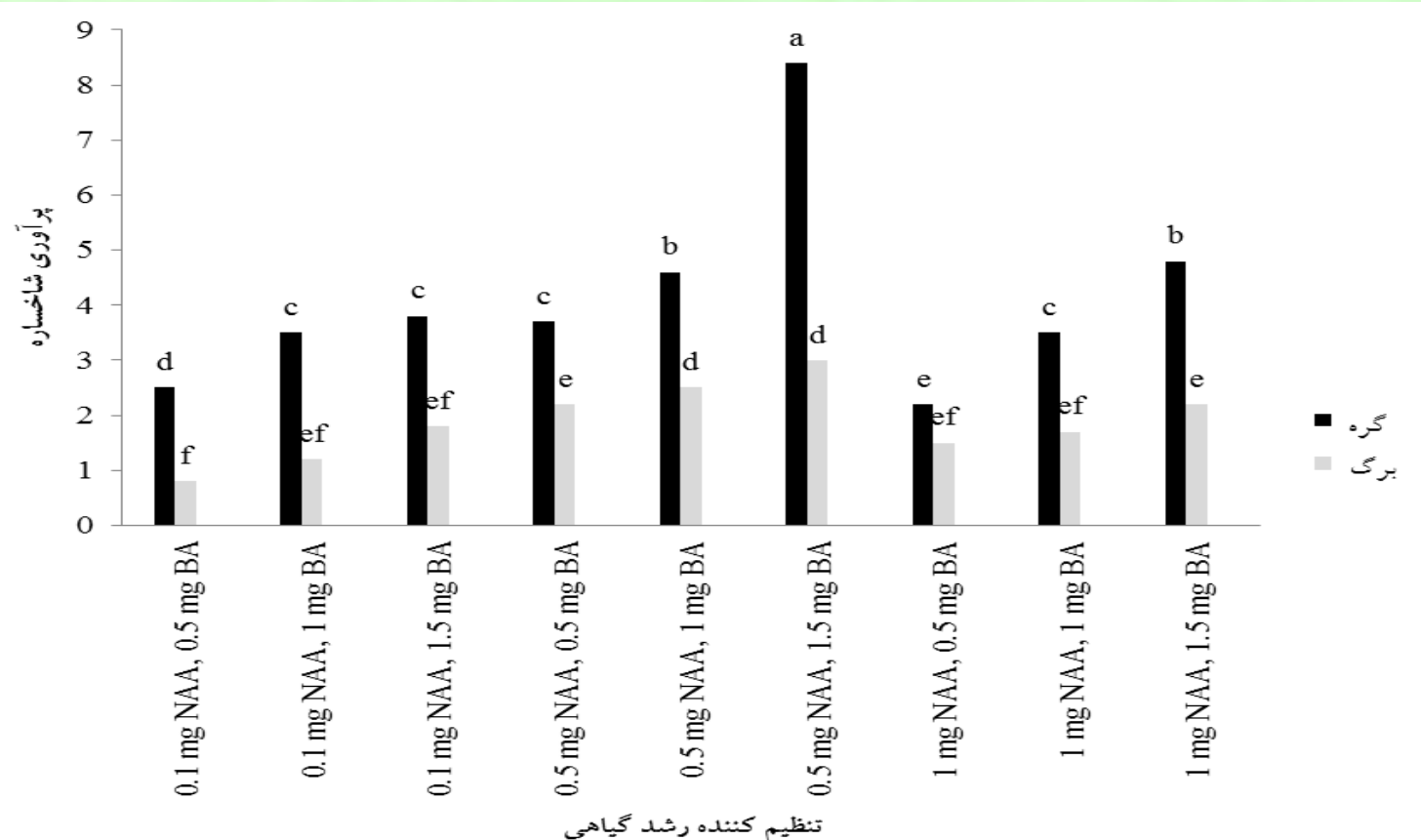
^۲پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران.

*zareei@jahromu.ac.ir

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق هر دوی نوع ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تاثیر معنی-داری 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 به میزان ۲ میلی‌گرم بر لیتر به میزان بسیار زیادی باعث کاهش قهوه‌ای شدن و بهبود کالوس‌زائی در گیاه نعاء 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 معنی دار بود. همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر میزان کالوس‌زایی و پرآوری این گیاه معنی‌دار بود (تصویر ۱). به عبارتی بیشترین میزان پرآوری شاخساره در تیمار های ۵/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین از ریزنمونه‌های حاصل از گره حاصل شد. در حالیکه کمترین میزان در ریزنمونه‌های برگ و در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵/۰ میلی‌گرم بنزیل آدنین حاصل شد.

بر اساس نتایج این پژوهش با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل‌آدنین از ۵/۰ میلی‌گرم به ۵/۱ 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 تنظیم کننده رشد گیاهی بر میزان کالزائی و پرآوری گیاهان داروئی وجود دارد. در مطالعات قبلی در زمینه ریزازدیادی گیاهان داروئی، کارائی بیشتر پرآوری از ریزنمونه‌های گره نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها گزارش شده است و BAP بعنوان یکی از موثرترین سیتوکین‌ها 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 سیتوکین مورد استفاده تاثیر بیشتری در افزایش تعداد شاخساره در این گیاه دارد. در مطالعات قبلی برای گونه دیگر نعاء فلفلی ترکیبی از هورمون بنزیل‌آدنین (۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۳ میلی‌گرم بر لیتر) مناسب-ترین 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 ۵/۰ 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 سیتوکین نسبت به اکسین در مرحله پرآوری باعث شکل‌گیری شاخساره‌های جانبی خواهد شد. به هر حال 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 سیتوکین 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 نعاء گردد. نتایج حاصل از این پژوهش تائید کننده نتایج مربوط به دیگر گونه نعاء (*M. viridis* L.) می‌باشد که گره بعنوان ریزنمونه مناسب برای پرآوری در این گیاه پیشنهاد شده است (Rahman et al., 2013).



منابع

- 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. (Pippermint). 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>

چکیده

در تحقیق حاضر اثر تیمارهای مختلف هورمونی و نوع ریزنمونه بر میزان تولید شاخساره در گیاه بومی پونه کوهی (*Mentha mozaffarianii*) 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) (۱/۰، ۵/۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و بنزیل آدنین (BA) (۵/۱، ۱ و ۵/۰ میلی‌گرم 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 ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA ولی در مورد برگ در غلظت یک میلی‌گرم NAA و ۵/۱ میلی‌گرم 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.

مقدمه

گیاه نعاء بخاطر ویژگی های داروئی بسیار زیاد از قدیم در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می‌گرفته و خواص آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است. منتول، پلی‌گون و کاروون از جمله مهمترین متابولیت های موجود در اسانس نعاء می باشند 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.

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 روش ها

گیاهان نعاء 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 ۲/۱ 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 ۱/۰، ۵/۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و همچنین منبع سیتوکین بنزیل آدنین (BA) با غلظت‌های ۵/۱، ۱ و ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. به عنوان منبع کربوهیدراتی، ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر و به عنوان عامل ژله‌ای کننده، ۵/۷ گرم در لیتر آگار به محیط افزوده شد. با استفاده از دستگاه پی‌اچ سنج دیجیتالی، پی‌اچ محیط‌های تهیه شده قبل از افزودن عامل ژله‌ای کننده در محدوده ۹/۵–۷/۵ تنظیم گردید. همچنین تیمار ۲ گرم بر لیتر زغال فعال برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها استفاده شد.

سه تکرار از ریزنمونه‌های مختلف با ۷ مشاهده در هر پتری دیش در نه غلظت مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی و بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً 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 دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. به منظور نرمال کردن داده‌های درصد کالوس‌زایی، از Arcsin داده‌ها استفاده گردید.