Nova Biologica Reperta 6(2): 198-205 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۲، صفحات ۱۹۸ الی ۲۰۵ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها و غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA بر ساقه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه دارویی پونه‌سای بینالودی

مصطفی ساغریان، علی گنجعلی و منیره چنیانی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
مسئول مکاتبات: علی گنجعلی، ganjeali@um.ac.ir

چکیده. گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaloudensis* Jamzad) از گیاهان بومی و دارویی ایران است. این گیاه به علت برداشت بی‌رویه و تخریب رویشگاه آن در خطر انقراض قرار گرفته است ما به بررسی تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها و غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA بر بهبود شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه پونه بینالودی تحت شرایط درون شیشه پرداختیم. ریزنمونه‌های ساقه در محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP به همراه غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و گلوتاتیون احیا (۱ و ۲ میکرو مول بر لیتر) کشت شدند. سپس اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر ساقه‌زایی این گیاه محاسبه شد. همچنین ریشه‌زایی، ساقه‌های باززایی شده در محیط کشت MS ½ حاوی غلظت‌های مختلف NAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شد. نتایج نشان داد که ترکیب آنتی اکسیدان اثر معنی‌داری بر ساقه‌های تولیدی در محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP داشت. غلظت ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا در مقایسه با دیگر تیمارهای انتی‌اکسیدانی منجر به افزایش ساقه‌زایی شد. غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP اثر معنی‌داری ($p\text{-value}<0.05$) بر درصد ساقه‌زایی و تعداد ساقه‌های تولیدی داشت. در مقابل، درصد ریشه‌زایی و میانگین طول ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA افزایش یافت. ما استفاده از این تیمارها را برای ریز ازدیادی کار آمد این گیاه در حال انقراض پیشنهاد می‌کنیم.

واژه‌های کلیدی. بهینه‌سازی رشد، ریز ازدیادی، کشت درون شیشه، محیط کشت، نعنائیان

Investigating the effect of antioxidant compounds and various concentrations of BAP and NAA on the improvement of *in vitro* stem and root formation of *Nepeta binaloudensis* Jamzad

Mostafa Sagharyan, Ali Ganjeali & Monireh Cheniany
Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
Correspondent author: Ali Ganjeali, ganjeali@um.ac.ir

Abstract. *Nepeta binaloudensis* Jamzad is a medicinal plant endemic to Iran. It is an endangered plant due to habitat destruction and intensive harvest. We investigated the effect of antioxidants and different concentrations of BAP and NAA on *in vitro* stem and root formation of *N. binaloudensis*. Stem explants were cultured in ½ MS medium supplemented with BAP (0.5 mg/L) and different concentrations of ascorbic acid and reduced glutathione. The effect of different concentrations of BAP on the regeneration of this plant was then evaluated. Moreover, root formation of regenerated stems was investigated in the ½ MS medium supplemented with different concentrations of NAA. The results showed that the combination of antioxidants in ½ MS medium supplemented with BAP (0.5 mg/L) had a significant effect on regeneration *in vitro* culture. The reduced-glutathione (2 µM/ L) in comparison with other antioxidant treatments increased the stem regeneration in explants. The levels of BAP hormone (1 and 1.5 mg/L) had a significant ($p\text{-value}<0.05$) effect on the stem regeneration rate and the number of produced branches. The NAA (2 mg/L) increased root formation and root height average. We recommend the use of these treatments for *in vitro* propagation of this endangered plant.

Keywords. culture medium, growth optimization, *in vitro* culture, Lamiaceae, shoot proliferation

Received 18.06.2018/ Revised 25.07.2018/ Accepted 02.08.2018/ Published 01.08.2019

دریافت ۱۳۹۷/۰۳/۲۸/ اصلاح ۱۳۹۷/۰۵/۰۳/ پذیرش ۱۳۹۷/۰۵/۱۱/انتشار ۱۳۹۸/۰۵/۱۰

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

مقدمه

گیاهان دارویی منابعی هستند که نقش مهمی در سیستم درمانی جهان برعهده دارند. به گونه ای که حدود ۷۰ الی ۸۰ درصد مردم جهان برای تأمین نیازهای درمانی خود از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. این گیاهان به عنوان یک منبع اقتصادی مهم در کشورهای توسعه یافته مورد استفاده قرار می‌گیرند (Pei, 2001). سرده *Nepeta* از تیره نعناییان (Lamiaceae) شامل ۲۵۰ گونه یک ساله و چندساله است که در نقاط مختلف آسیا، اروپا و شمال آفریقا می‌رویند (Ghahreman, 1999). این سرده در ایران دارای ۷۹ گونه است که به صورت خودرو در مناطق مختلف ایران رشد کرده و بسیاری از آنها بومزاد ایران هستند (Jamzad, 2012). مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس گونه‌های مختلف سرده *Nepeta*، نپتالاکتون‌ها هستند (Ghannadi *et al*., 2003). پونه‌سای بینالودی (*N. binaloudensis* Jamzad) گیاهی بومی، چند ساله و کمیاب است که در رشته کوه‌های بینالود در استان خراسان رضوی، در زیستگاه‌هایی با ارتفاع ۲۳۰۰–۲۷۰۰ متر از سطح دریا با متوسط بارندگی ۳۵۰–۳۷۰ میلی‌متر پراکنده شده است (Jamzad, 2012). این گیاه در طب سنتی کشور به عنوان مدر، معرق، ضماد زخم، ضد سرفه، ضد اسپاسم، انرژی‌زا، تب بر و آرام بخش مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ghannadi et *al*., 2003). نپتالاکتون به مقدار ۲۵/۲ درصد و همچنین ۱ و ۸ سینئول به مقدار ۴۲/۵ درصد به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات موجود در اسانس بخش‌های هوایی این گیاه گزارش شده اند (Rustaiyan & Nadji, 1999).

تکثیر گونه‌های Lamiaceae از طریق کاشت بذر به‌دلیل تولید کم بذر و نرخ پایین جوانه‌زنی با مشکل مواجه است (Sulistiarini, 1999). گیاه *N. binaloudensis* به دلیل برداشت بی‌رویه، تکثیر کند و درصد جوانه‌زنی پایین بذور این گیاه در خطر انقراض قرار دارد (Nadjafi *et al*., 2009). یکی از روش‌های حفاظت گیاهان در معرض خطر انقراض، ریزازدیادی آنهاست (Modarres *et al*., 2012). محققان به بررسی ریزازدیادی در سرده‌های مختلف از تیره نعناییان پرداخته‌اند. به عنوان مثال، در کشت جوانه انتهایی *Salvia fruticose* Mill در محیط کشت‌های مختلف وتیمارهای هورمونی متفاوت مشخص شد بالاترین درصد ساقه‌زایی در محیط MS حاوی هورمون BAP و بالاترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS همراه با IBA به دست آمده است (Arikat *et al*., 2004). بهترین محیط ساقه‌دهی در گیاه *S. nemorosa* L.، در محیط کشت MS حاوی ۸/۹ میکرومول بر لیتر BA و ۲/۹ میکرومول بر لیتر IAA بوده است و همچنین بهترین محیط ریشه‌دهی محیط MS، حاوی ۰/۵ میکرومول بر لیتر NAA معرفی شده است (Skala & Wysokinsca, 2006). در بررسی ریزازدیادی در گیاه *Lavendula dentana* L.، بهترین محیط شاخه‌دهی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP و بهترین محیط ریشه‌دهی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA معرفی شده است (Andrade & Basso, 2005).

افزایش تجمع و ترشح ترکیبات فنلی در کشت بافت موجب تنش اکسیداتیو ریزنمونه‌های کشت شده، قهوه‌ای شدن و نهایتا مرگ آنها می‌شود (Aliyo, 2005). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله آسکوربیک اسید و گلوتاتیون احیا کننده به محیط کشت موجب ایجاد شرایط احیایی می شود که علاوه بر کاهش قهوه‌ای شدن ناشی از تنش اکسیداتیو، باعث افزایش سرعت ساقه‌زایی و تحریک بیشتر ساقه‌زایی می‌شود. این شواهد در بررسی گیاه *Nicotiana tabacum* L. (Joy *et al*., 1998)، Nomura و گیاه *Malus pumila* Mill. (Nomura *et al*., 1998) گیاه *Gladiolus* × hybridus C.Morren (Dutta Gupta & Datta, 2003) دیده شد.

با توجه به موارد اشاره شده، آزمایش حاضر با هدف بررسی امکان باززایی گیاه با سطوح مختلف ترکیبات آنتی‌اکسیدان و هورمون های BAP و NAA در شرایط درون شیشه انجام شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه پونه‌سای بینالودی از هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد (FUMH) با شماره نمونه ۱۰۲۵ (Voucher No. 1025) تهیه شد. این بذرها با استفاده از مواد شوینده، آب مقطر و آب ژاول استریل شدند. در نهایت، بذرهای استریل شده درون پتری دیش های استریل حاوی کاغذ صافی واتمن NO 1 قرار گرفتند. به هر پتری دیش ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. به‌منظور جوانه‌زنی بذرهای گیاه *N. binaloudensis*، پتری‌دیش‌های حاوی بذر درون فیتوترون در شرایط تاریکی و دمای ۲± ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از جوانه زدن، دانه‌رست‌ها به مدت ۴ روز در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سرعت رشد آن‌ها

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

بیشتر شود. در انتها، دانه‌رست‌ها برای تولید گیاه مادر به محیط هیدروپونیک حاوی محلول غذایی هوگلند (Arnon & Hoagland, 1940) منتقل شده و در اتاقک رشد قرار گرفتند. گیاه مادر در شرایط هیدروپونیک نگهداری و از آن برای تهیه ریزنمونه در ادامه تحقیق استفاده شد.

محیط کشت و ریزنمونه‌ها

به منظور بررسی ساقه‌زایی گیاه، از ریزنمونه ساقه گیاه مادری استفاده شد. در این بررسی از محیط کشت MS ½ (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ساکارز (۳۰ گرم در لیتر) و آگار (۷ گرم در لیتر) استفاده شد. pH محیط کشت با استفاده از NaOH ۱ مولار روی ۵/۸ تنظیم شد. ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت فوق، در ظروف شیشه‌ای (۲۰۰ میلی‌لیتر) ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. ریزنمونه‌های جدا شده از گیاه مادری، با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و ۵ نوبت با استفاده از آب مقطر استریل به مدت ۱ دقیقه در محیط هود لامینار (JTLVC2, Jaltajhiz, IRAN) ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده برای خشک شدن روی کاغذ صافی استریل منتقل شدند. پس از خشک شدن، ریزنمونه‌ها به بخش‌های۱ سانتی‌متری بریده شده و روی سطح محیط کشت‌های مورد نظر قرار گرفتند. به منظور بررسی ساقه زایی گیاه پونه‌سای بینالودی، دو آزمایش جداگانه انجا شد. در آزمایش اول، تاثیر غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و گلوتاتیون احیا (۱ و ۲ میکرومول بر لیتر) در محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بر ساقه‌زایی گیاه *N. binaloudensis* بررسی شد. در آزمایش دوم پس از مشخص شدن موثرترین آنتی‌اکسیدان در ساقه‌زایی و غلظت بهینه آن، میزان تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون BAP شامل ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بر درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه در هر ریزنمونه و میانگین طول ساقه گیاه مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های قرار گرفته در محیط‌های کشت به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی قرار گرفتند تا جوانه‌های آنها فعال شوند. پس از آن به شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. صفات ریخت شناختی ساقه‌زایی گیاه پونه‌سای بینالودی، ۳۰ روز پس از انتقال محیط کشت‌ها به محیط روشنایی در هر دو آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمایش سوم با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون NAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر ریشه‌زایی ساقه‌های نوپدید انجام شد. در این آزمایش، پس از گذشت ۳۰ روز از فعال شدن جوانه‌ها در محیط کشت، ساقه‌های به‌دست آمده از مرحلهٔ ساقه‌زایی با قطر مناسب انتخاب شدند. ابتدا برای حذف اثرات هورمون BAP بر ریشه‌زایی ساقه‌های نوپدید، ساقه‌ها به محیط کشت MS ½ فاقد هورمون منتقل شدند. پس از گذشت ۲ هفته، نمونه‌ها به منظور ریشه‌زایی به محیط کشت MS ½ حاوی هورمون NAA در ۳ غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند. درصد ریشه‌زایی و میانگین طول ریشه‌ها (به ازای هر نمونه) بعد از ۴ هفته مورد ارزیابی قرار گرفتند.

صفات مورد بررسی

به‌منظور بررسی ساقه‌زایی، صفات ریخت شناختی، شامل درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه‌ها و میانگین طول ساقه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. درصد ساقه‌زایی از طریق معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد ساقه زایی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه تبدیل شده به ساقه}}{\text{تعداد کل ریز نمونه های کشت شده}}$$

درصد ریشه‌زایی طبق معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد ریشه زایی} = \frac{\text{تعداد ساقه های ریشه دار شده}}{\text{تعداد کل ساقه های کشت شده}}$$

تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد (در هر تکرار پنج ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت). محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 25 انجام گرفت. برای مقایسه مقادیر میانگین از آزمون دانکن ($\alpha = 0.05$) استفاده شد.

مراحل اجرایی طرح آزمایش این مطالعه در بخش زیر به صورت شماتیک آورده شده است (شکل ۱).

نتایج

آزمایش اول

بسیاری از ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۵ میلی-گرم بر لیتر هورمون BAP بعد از مدتی قهوه‌ای و نکروز شدند. بالاترین درصد ساقه‌زایی در ریزنمونه‌های تیمارهای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک‌اسید و ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا دیده شد. (جدول ۱). ترکیبات آنتی اکسیدانی همچنین تأثیر معنی‌داری

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

شکل ۱- نمودار شماتیک از مراحل اجرایی طرح آزمایش در مطالعه ساقه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه پونه‌سای بینالودی در شرایط درون شیشه.

Fig. 1. The schematic chart of the stages of the experimental design in the study of regeneration and root formation of *N. binaloudensis in vitro* condition.

جدول ۱- آزمون مقایسه میانگین‌های چندگانه دانکن برروی صفات ریخت شناختی ساقه‌های گیاه پونه‌سای بینالودی در تیمارهای مختلف آنتی اکسیدانی.

Table 1. Comparison of Duncan multiple means on some morphological traits of plant stems in *N. binaloudensis* at different antioxidant treatments.

نوع و غلظت ترکیبات آنتی اکسیدان‌ها	صفات ریزازدیادی		
	درصد ساقه‌زایی	تعداد ساقه‌زایی (به ازای ریزنمونه)	طول ساقه‌ها (cm)
کنترل	۲۰ ^{b}	۲٫۶۷ ± ۰٫۵۷۷ ^{d}	۱٫۵ ± ۰٫۷۹۴ ^{ns}
Asc 100 mg/L	۳۳٫۳۳ ^{a}	۳٫۳۳ ± ۱٫۱۵۵ ^{d}	۱٫۶۷ ± ۰٫۳۷۹ ^{ns}
Asc 200 mg/L	۲۰ ^{b}	۸٫۶۷ ± ۱٫۱۵۵ ^{b}	۱٫۸۴ ± ۰٫۲ ^{ns}
Reduced-glu 1 µ M/L	۲۰ ^{b}	۵٫۳۳ ± ۱٫۱۵۵ ^{c}	۱٫۸۰ ± ۰٫۷۵ ^{ns}
Reduced-glu 2 µ M/L	۴۰ ^{a}	۱۰٫۶۷ ± ۱٫۱۵۵ ^{a}	۲٫۴ ± ۰٫۴۰۴ ^{ns}

ستون‌های واجد حروف مشترک، در سطح احتمال($p\text{-value} \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

There is no significant difference among those columns that have same letter.

($p\text{-value} \leq 0.05$) بر تعداد ساقه‌ها داشتند. بیشترین تعداد ساقه با مقدار ۱۰٫۶۷ (تعداد ساقه ایجاد شده به ازای هر ریزنمونه) به تیمار ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا مربوط بود که تفاوت آن با سایر تیمارهای تحت بررسی و شاهد معنی‌دار بود (جدول ۱). در این آزمایش بررسی نتایج تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف آنتی-اکسیدان‌ها بر میانگین طول ساقه‌های تولید شده مؤید این است که آنتی‌اکسیدان‌ها اثر معنی‌داری بر طول ساقه‌ها ندارند (جدول ۱).

آزمایش دوم

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که، غلظت‌های مختلف هورمون BAP تأثیر معنی‌داری بر درصد ساقه‌زایی ، تعداد ساقه و طول ساقه داشتند (جدول ۲). غلظت‌های مختلف هورمون BAP همچنین تأثیر معنی‌داری بر درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه‌ها و طول ساقه‌ها داشتند ($p\text{-value} \leq 0.05$). بیشترین درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه و طول ساقه‌ها با مقادیر ۶۰ درصد، ۱۶ (تعداد ساقه ایجاد شده به ازای هر ریزنمونه) و ۳٫۴۵ سانتی‌متر به تیمار ۱٫۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP مربوط بود که تفاوت آن با سایر سطوح

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

جدول ۲- آزمون مقایسه میانگین‌های چندگانه دانکن بر روی برخی صفات ریخت شناختی ساقه‌های گیاه پونه‌سای بینالودی در غلظت‌های مختلف هورمون BAP.

Table 2. Comparison of Duncan multiple means on some morphological traits of plant stems in *N. binaloudensis* at different concentrations of BAP hormone.

غلظت هورمون BAP (میلی‌گرم برلیتر)	صفات ریزازدیادی		
	درصد ریزازدیادی	تعداد ساقه (به ازای ریزنمونه)	طول ساقه (cm)
۰/۵	۴۰ [b]	۱۰/۶۷ [b]	۲/۳۴ [b]
۱	۵۳/۳۳ [a]	۷/۶۷ [c]	۲/۰۴ [b]
۱/۵	۶۰ [a]	۱۶ [a]	۳/۴۵ [a]

ستون‌های واجد حروف مشترک، در سطح احتمال ($p\text{-value} \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

There is no significant difference among those columns that have same letter.

جدول ۳- آزمون مقایسه میانگین‌های چندگانه دانکن بر روی برخی صفات ریخت شناختی ریشه‌زایی در گیاه پونه‌سای بینالودی در غلظت‌های مختلف هورمون NAA.

Table 3. Comparison of Duncan multiple means on some morphological traits of rooting in *N. binaloudensis* at different concentrations of NAA hormone.

غلظت هورمون NAA (میلی‌گرم برلیتر)	پارامترهای ریزازدیادی	
	درصد ریشه‌زایی	طول ریشه (cm)
۰/۵	۳۳/۳۳ [c]	۰/۹۴ [c]
۱	۴۰ [b]	۱/۷ [b]
۲	۸۶/۶۷ [a]	۳/۴۷ [a]

ستون‌های واجد حروف مشترک، در سطح احتمال ($p\text{-value} < 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

There is no significant difference among those columns that have same letter.

تیمارهای هورمونی تحت بررسی معنی‌دار است (جدول ۲).

ریشه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که، کاربرد غلظت‌های مختلف هورمون NAA تأثیر معنی‌داری ($p\text{-value} \leq 0.05$) بر درصد ریشه‌زایی و میانگین طول ریشه‌ها دارد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که، غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA از بالاترین درصد ریشه‌زایی برخوردار هستند و تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای بررسی شده داشت (جدول ۳). بیشترین طول ریشه-ها با مقدار۳/۴۷ (سانتی‌متر) به تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA مربوط بود که تفاوت آن با سایر تیمارهای تحت بررسی معنی‌دار بود (جدول ۳).

بحث

در این مطالعه کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی اسکوربیک‌اسید و گلوتاتیون احیا، درصد باززایی و ساقه‌زایی را به صورت معنی داری ($p\text{-value} \leq 0.05$) افزایش دادند. در این بین کاربرد گلوتاتیون احیا با غلظت ۲ میکرومول بر لیتر نسبت به سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از نظر تمایزیابی و تولید ساقه‌های نوپدید، نقش موثرتری داشت.

تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP به عنوان محیط کشت برای ساقه‌زایی گیاه *N. binaloudensis* معرفی شده است (Nadjafi-Pour *et al*., 2016). در تحقیق حاضر مشخص شد کشت ریزنمونه‌های متفاوت (برگ، ساقه مریستم رأس ساقه و هیپوکوتیل) در محیط‌های کشت مختلف (MS، ½ MS و B5) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP، مناسب ساقه‌زایی این گیاه نیستند (داده‌ها نشان داده نشدند). محیط کشت ½ MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP دارای ساقه‌زایی ضعیفی بوده و اکثر ریزنمونه‌ها در این محیط کشت قهوه‌ای و نکروز شدند. پتانسیل ساقه‌زایی ضعیف و قهوه‌ای و نکروز شدن بافت ریزنمونه به دلیل تولید ترکیبات اکسید کننده و تنش اکسیداتیو حاصل از این ترکیبات در بافت ریزنمونه مربوط می‌شود (Titov *et al*., 2006). احتمالا ترکیبات آنتی‌اکسیدان باعث کاهش تولید

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

ترکیبات سمی و فنلی در شرایط درون شیشه شده و از قهوه‌ای شدن و نکروز شدن بافت جلوگیری می‌نمایند. این احتمال توسط بررسی بر گیاه *Musa acuminata* L. (Kariyana & Nisyawati, 2013) و بر گیاه *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Dibax *et al*., 2005) تایید شد.

کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک‌اسید و گلوتاتیون احیا برای افزایش تمایز ساقه‌های گیاهان در شرایط درون شیشه تأیید شده است (Joy *et al*., 1998). تیمار گلوتاتیون احیا در غلظت ۰/۸ میکرومول بر لیتر، ساقه‌زایی را در کشت مریستم انتهایی سیب به صورت معنی‌داری افزایش داد (Nomura *et al*., 1998). در محیط کشت ریزنمونه برگ گیاه گلایول، کاربرد ترکیبات آنتی اکسیدان باعث تحریک و افزایش ساقه‌زایی گیاه شد (Dutaa-Gupta & Datta, 2003). احتمالاً افزایش ترکیبات آنتی اکسیدان در محیط کشت باعث افزایش سرعت تقسیم سلولی و حفظ آن در بافت کشت شده می‌شود. این احتمال توسط بررسی روی کشت سلول گیاه تنباکو (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) تأیید شده است (De Pinto *et al*., 2000). در بررسی کشت سلول گیاه *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh مشخص شد گلوتاتیون احیا نقش تنظیمی بر میزان فعالیت آنزیم PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) دارد. فعالیت این آنزیم با میزان تقسیم سلولی ارتباط مستقیم دارد (Pellny *et al*., 2009). این بررسی‌ها مشخص کردند، ترکیبات آنتی اکسیدانی نقش مهمی در تنظیم تقسیم سلولی و افزایش آن دارند.

در آزمایش دوم غلظت‌های مختلف هورمون BAP در محیط کشت MS ½ حاوی ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا تأثیر معنی داری ($p\text{-value} \leq 0.05$) بر ساقه‌زایی داشت (جدول ۲). غلظت-های مختلف هورمون‌های رشد در محیط القای ساقه، اثر تنظیمی متفاوتی به روی مورفوژنز دارند. کاربرد خارجی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد، نقش بسیار مهمی در تشکیل ساقه دارند وشدیداً بر ساقه‌زایی تأثیر گذار هستند (Rout, 2000). بیشترین درصد ساقه‌زایی به محیط کشت MS ½ + ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا + غلظت‌های هورمون BAP ۱ و ۱/۵ میلی-گرم بر لیتر مربوط بود. همچنین بیشترین تعداد ساقه تولید شده در محیط کشت MS ½ + ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا + هورمون BAP ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر دیده شد. هورمون BAP در گیاه *Mentha piperita* L. (Ghanti *et al*., 2003)، *Lavandula dentate* L. (Andrade & Bosso, 2005) و *Salvia fruticose* Mill. (Arikat *et al*., 2004) نیز بیشترین تأثیر را بر میزان ساقه‌زایی داشت.

بیشترین میانگین طول ساقه، به تیمار هورمونی BAP ۱/۵ میلی-گرم بر لیتر مربوط بود. افزایش طول ساقه می‌تواند به دلیل تحریک تقسیم سلولی و افزایش طول ساقه‌ها تحت تأثیر این هورمون باشد. افزایش طول ساقه به دلیل مشابه در گیاه *Salvia officinalis* L. (Tawfik & Mohamed, 2007) و *Thymus* Pomel *bleicherianus* (Aicha & Abdelmalek, 2014) نیز گزارش داده شده است، اما افزایش هورمون BAP در گیاه *Salvia* L. *nemorosa* باعث کاهش رشد طولی ساقه‌ها شد (Ewa & Wysokinska, 2004).

در ارتباط با این موضوع، گزارش (Daniel *et al*., 2010) بر گیاه *Ocimum basilicum* L. نشان داد، بهترین تیمار هورمونی برای ساقه‌زایی این گیاه، تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP معرفی شد. تفاوت در غلظت هورمونی این گزارش با پژوهش فعلی می‌تواند به نوع ریزنمونه استفاده شده و نوع گیاه تحت آزمایش مربوط باشد.

توان ریشه‌زایی در آماده‌سازی ساقه‌ها برای مرحله سازگاری بسیار با اهمیت است. هورمون اکسین در گیاهان معمولاً ریشه‌زایی را القا کرده و از ایجاد شاخه‌های جانبی جلوگیری می‌نماید (Karuppusamy *et al*., 2006). این پژوهش نشان داد، القای ریشه در ساقه‌های نوپدید به میزان غلظت هورمون اکسین وابسته است. این پاسخ احتمالا به کنترل تقسیم و تمایز سلولی توسط تنظیم کننده‌های رشد و به خصوص هورمون اکسین‌ها مربوط است. در گیاهان مختلف، میزان اکسین درونی در فرآیندهای ریشه‌زایی، دچار تغییراتی می شود. این احتمال در بررسی (Jose *et al*., 2012) روی گیاه *Alnus glutinosa* L. تأیید شده است.

در مطالعه حاضر، بیشترین درصد ریشه‌زایی و بلندترین طول ریشه‌ها به تیمار هورمونی NAA در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر مربوط بود. در برخی ازسطوح هورمونی NAA، علاوه بر ریشه-های حقیقی، ریشه‌های نا بجا نیز مشاهده شد. در فرایند ریشه‌زایی و افزایش رشد ریشه در تیمارهای مذکور طول گیاهچه‌ها به صورت

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

قابل توجهی افزایش یافت که این موضوع احتمالاً به اثر مثبت ریشه بر بقای گیاهچه ها در مراحل بعدی مربوط است.

بررسی‌های انجام یافته روی ریشه‌زایی گیاه *Salvia fruticosa* نشان داد، اکسین‌ها نقش مهمی در القای ریشه این گیاهان برعهده دارند (Arikat *et al.*, 2004). در این آزمایش مؤثرترین هورمون برای ریشه‌زایی گیاه *Salvia broussonetii* Benth.، هورمون NAA گزارش شده است (Mederos Molina, 2006). در این آزمایش بهترین تیمار برای ریشه‌زایی ساقه‌های تولید شده از جوانه های انتهایی گیاه *Salvia lerifoliia* Benth. محیط‌کشت MS، حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود (Modarres *et al.*, 2012).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده بیانگر این بود که تیمار ۲ میکرومول بر لیتر گلوتاتیون احیا کننده و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP از مفیدترین و کارآمدترین تنظیم کننده‌های رشد ساقه‌زایی این گیاه اند. همچنین تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA اثر مطلوبی بر ریشه‌زایی ساقه های نوپدید گیاه پونه‌سای بینالودی داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش توسط معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد تحت شماره پروپوزال ۴۳۲۱۹ حمایت مالی شده است که بدینوسیله قدردانی می گردد.

REFERENCES

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. – J. Med. Aromat. Plants 3: 145.

Aliyo, O.M. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale*) breeding: an appraisal. – AJB 4: 1485-1489.

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

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 in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. – J. Soil Sci. 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.

De Pinto, M.C., Tommasi, F. and De Gara, L. 2000. Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate–glutathione cycle in cultured cells of tobacco Bright Yellow 2. – Plant Physiol. Biochem. 38: 541-550.

Dibax, R., Eisfeld, C., Chuquel, F., Koehler, H. and Quoirin, M. 2005. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camalduensis*. – Sci. Agricola. 62: 406-412.

Dutta Gupta, S. and Datta, S. 2003. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. – Biol. Plant 47: 179-183.

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

Ghahreman, A. 1999. Biodiversity of Plants in Iran. Tehran University, Iran Synder. R.L. (1985). Hand calculating degree-days. – J. Agri. Meteoy. 35: 353-358.

Ghannadi, A., Aghazari, F., Mehrabani, M., Mohagheg-hzadeh, A. and Mehregan, I. 2003. Quantity and comp-osition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Bioss. – Iran. J. Pharm. Res. 2: 5-103.

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.

Jamzad, Z. 2012. Lamiaceae. – In: Assadi, M. *et al.* (eds.): Flora of Iran, No. 76. – RIFR, Tehran. 1066 pp.

Jose, M.C.S., Romero, L. and Janeiro, L.V. 2012. Effect of Indole-3-Butyric Acid on root formation in *Alnus glutinosa*. – Silva Fenn. 46: 643-654.

Joy, R.W., Patel, K.R. and Thorpe, T.A. 1988. Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco callus. – PCTOC 13: 219-22.

Kariyana, K. and Nisyawati, N. 2013. Effect of ascorbic acid, activated carbon and light duration on explant

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]
[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]

browning of banana cultivar barangan (*Musa acuminata* L.) *in vitro* culture. – IJRRAS 16: 118-123.

Karuppusamy, S., Kiranmai, C., Aruna, V. and Pullaiah, T. 2006. Micropropagation of *Vanasushava pedata*. An endangered medicinal plant of South India. – BAPTCB 16: 85-94.

Mederos Molina, S. 2006. Micropropagation of *Salvia broussonetii* Benth. a medicinal plant species. – BAPTCB 16: 19-23.

Modarres, M., Lahouti, M., Gangeali, A. and Asili, J. 2012 Study of micropropagation of *Salvia lerifolia* Benth. using shoot tip. – J. Plant Biol. 4: 89-100.

Murashige, T., and Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – Plant Physiol. 15: 473-479.

Nadjafi-Pour, N., Valizadeh, M., Mostafavi, E. and Maassomi, A.A. 2016. Micro propagation study of *Nepeta binaloudensis* Jamzad *in vitro* culture. International conference on new horizon of biology in agricultural Science. Tehran, Society of Modern Science and Technology.

Nadjafi, F., Koocheki, A., Honermeier, B. and Asili, J. 2009. Autecology, Ethnomedicinal and phytochemical studies of *Nepeta binaloudensis* Jamzad a highly endangered medicinal plant of Iran. – J. Essent. Oil Bear Plant 12: 37-41.

Nomura, K., Matsumoto, S., Masuda, K. and Inoue, M. 1998. Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple stock. – Plant Cell Rep. 17: 597-600.

Pei, S. 2001. Ethnobotanical approaches of traditional medicine studies: some experiences from Asia. – Pharm. Biol. 39: 74-79.

Pellny, T.K., Locato, V., Vivancos, P.D., Markovic, J., De Gara, L., Pallardó, F.V. and Foyer, C.H. 2009. Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADPribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture. – Mol. Plant 2: 442-456.

Rout, G.R. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinaplants. – Biotechnol. Adv. 18: 91-120.

Rustaiyan, A. and Nadji, K. 1999. Composition of the essential oils of *Nepeta isphanica* Boiss and *Nepeta binaloudensis* Jamzad from Iran. – Flavour Fragr. J. 35-37.

Skala, A. and Wysokinska, A. 2006. In vitro Regeneration of (*Salvia nemorosa* L.) from shoot tips and leaf explants. – In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 1: 90-151.

Sulistiarini, D.L. 1999. *Ocimum gratissimum* L. In: A. P. L. Oyen and D. X. Nguyen, Eds. Plant Resources of South- East Asia No. 19: Essential Oils Plants. Prosea Foundation, Bogor. 140-142.??

Tawfik, A. A., and Mohamed M.F. 2007. Regeneration of *Salvia officinalis* L. via induction of meristematic callus. – In Vitro Cell Devel. Biol. Plant 43: 21-27.

Titov, S., Bhowmik, S., Mandal, A., Alam, M. and Nasir, A. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from Musa spp. cv. Kanthali floral bud explants. – Am. J. Biochem. Biotech. 2: 97-104.

*****

How to cite this article:

Sagharyan, M., Ganjeali, A. and Cheniany, M. 2019. Investigating the effect of antioxidant compounds and various concentrations of BAP and NAA on the improvement of *in vitro* stem and root formation of *Nepeta binaloudensis* Jamzad. – Nova Biol. Reperta 6: 198-205.

ساغریان، م.، گنجعلی، ع. و چنیانی، م. ۱۳۹۸. بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها و غلظت‌های مختلف هورمون BAP و NAA بر ساقه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه دارویی پونه‌سای بینالودی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۲۰۵-۱۹۸.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-26]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.2.14.1]

[DOI: 10.29252/nbr.6.2.198]