

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

مصطفی ساغریان، علی گنجعلی و منیره چینیانی

گروه زیست‌شناسی، 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 تأثیر 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 گلوکاتایون احیا (۱ و ۲ میکرومول 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 آنتی‌اکسیدان اثر معنی‌داری بر ساقه‌های تولیدی در محیط کشت MS ½ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP داشت. غلظت ۲ میکرومول بر لیتر گلوکاتایون احیا در مقایسه با دیگر تیمارهای آنتی‌اکسیدانی 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 کارآمد این گیاه در حال انقراض پیشنهاد می‌کنیم.

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

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

مقدمه

گیاهان دارویی منابعی هستند که نقش مهمی در سیستم درمانی جهان برعهده دارند. به گونه‌ای 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 نعنائیان (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 پرآکنده 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 سینثول به مقدار ۴۲/۵ درصد به عنوان اصلی‌ترین ترکیبات موجود در اسانس بخش‌های هوایی این گیاه گزارش شده‌اند (Rustaiyan & Nadji, 1999).

تکثیر گونه‌های Lamiaceae از طریق کاشت بذر به دلیل تولید کم بذر و نرخ پایین جوانه‌زنی با مشکل مواجه است (Sulistiari, 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 نعنائیان پرداخته‌اند. به عنوان مثال، در کشت جوانه انتهایی *Salvia fruticosa* Mill در محیط کشت‌های مختلف و تیمارهای 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 ساقه-دهی 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*، 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 تشریح ترکیبات فنلی در کشت بافت موجب تنش اکسیداتیو ریزنمونه‌های کشت شده، قهوه‌ای شدن و نهایتاً مرگ آنها می‌شود (Aliyo, 2005). افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله آسکوربیک اسید و گلوتاتیون احیا کننده به محیط کشت موجب ایجاد شرایط احیایی می‌شود 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) و *Malus pumila* Mill. (Nomura et al., 1998) و *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 هورمون‌های 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، بذرها استریل شده درون پتری دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی واتمن NO 1 قرار گرفتند. به هر پتری دیش ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. به منظور جوانه‌زنی بذرها، گیاه *N. binaloudensis*، پتری دیش‌های حاوی بذر درون فیتوترون در شرایط تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از جوانه زدن، دانه‌رست‌ها به مدت ۴ روز در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا سرعت رشد آن‌ها

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 مرحله ساقه‌زایی با قطر مناسب انتخاب شدند. ابتدا برای حذف اثرات هورمون BAP بر ریشه‌زایی ساقه‌های نوپدید، ساقه‌ها به محیط کشت MS ۱/۲ فاقد هورمون منتقل شدند. پس از گذشت ۲ هفته، نمونه‌ها به منظور ریشه‌زایی به محیط کشت MS ۱/۲ 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 ریخت‌شناختی، شامل درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه‌ها و میانگین طول ساقه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. درصد ساقه‌زایی از طریق معادله زیر محاسبه شد:

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

درصد ریشه‌زایی طبق معادله زیر محاسبه شد:

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

تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً 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 ۱/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم 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 گلوکاتایون احیا دیده شد. (جدول ۱). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی همچنین تأثیر معنی‌داری

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

به‌منظور بررسی ساقه‌زایی گیاه، از ریزنمونه ساقه گیاه مادری استفاده شد. در این بررسی از محیط کشت MS ۱/۲ (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 (Jaltajhiz, JTLVC2, IRAN) ضدعفونی شدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده برای خشک شدن روی کاغذ صافی استریل منتقل شدند. پس از خشک شدن، ریزنمونه‌ها به بخش‌های ۱ سانتی‌متری بریده شده و روی سطح محیط کشت‌های مورد نظر قرار گرفتند. به‌منظور بررسی ساقه‌زایی گیاه پونه‌سای بینالودی، دو آزمایش جداگانه انجام شد. در آزمایش اول، تأثیر غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و گلوکاتایون احیا (۱ و ۲ میکرومول بر لیتر) در محیط کشت MS ۱/۲ 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 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. صفات ریخت‌شناختی ساقه‌زایی گیاه پونه‌سای بینالودی، ۳۰ روز پس از انتقال محیط کشت‌ها به محیط روشنایی در هر دو آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند.



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 بر روی صفات ریخت‌شناختی ساقه‌های گیاه پونه‌سای بینالودی در تیمارهای مختلف آنتی‌اکسیدانی.

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

صفات ریزازدیادی			نوع و غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌ها
طول ساقه‌ها (cm)	تعداد ساقه‌زایی (به ازای ریزنمونه)	درصد ساقه‌زایی	
۱.۵ ± ۰.۰۷۹۴ ^{ns}	۲.۶۷ ± ۰.۵۷۷ ^d	۲۰ ^b	کنترل
۱.۶۷ ± ۰.۳۷۹ ^{ns}	۳.۳۳ ± ۱.۱۵۵ ^d	۳۳.۳۳ ^a	Asc 100 mg/L
۱.۸۴ ± ۰.۲ ^{ns}	۸.۶۷ ± ۱.۱۵۵ ^b	۲۰ ^b	Asc 200 mg/L
۱.۸۰ ± ۰.۰۷۵ ^{ns}	۵.۳۳ ± ۱.۱۵۵ ^c	۲۰ ^b	Reduced-glu 1 μ M/L
۲.۴ ± ۰.۴۰۴ ^{ns}	۱۰.۶۷ ± ۱.۱۵۵ ^a	۴۰ ^a	Reduced-glu 2 μ M/L

ستون‌های واجد حروف مشترک، در سطح احتمال (p-value ≤ 0.05) تفاوت معنی‌داری ندارند.

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

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-value ≤ 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

(p-value ≤ 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 گلوکوتایون 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 آنتی‌اکسیدان‌ها بر میانگین طول ساقه‌های تولید شده مؤید این است که آنتی‌اکسیدان‌ها اثر معنی‌داری بر طول ساقه‌ها ندارند (جدول ۱).

آزمایش دوم

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.

صفات ریزازدیادی			غلظت هورمون BAP
طول ساقه (cm)	تعداد ساقه (به ازای ریزنمونه)	درصد ریزازدیادی	(میلی گرم بر لیتر)
۲,۳۴ ^b	۱۰,۶۷ ^b	۴۰ ^b	۰/۵
۲,۰۴ ^b	۷,۶۷ ^c	۵۳,۳۳ ^a	۱
۳,۴۵ ^a	۱۶ ^a	۶۰ ^a	۱/۵

ستون‌های واجد حروف مشترک، در سطح احتمال (p-value ≤ 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.

پارامترهای ریزازدیادی		غلظت هورمون NAA
طول ریشه (cm)	درصد ریشه‌زایی	(میلی گرم بر لیتر)
۰,۹۴ ^c	۳۳/۳۳ ^c	۰/۵
۱,۷ ^b	۴۰ ^b	۱
۳,۴۷ ^a	۸۶,۶۷ ^a	۲

ستون‌های واجد حروف مشترک، در سطح احتمال (p-value < 0.05) تفاوت معنی‌داری ندارند.

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

گلوکوتایون احیا با غلظت ۲ میکرومول بر لیتر نسبت به سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از نظر تمایزایی 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، 1/2 MS و B5) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP، مناسب ساقه‌زایی این گیاه نیستند (داده‌ها نشان داده نشدند). محیط کشت 1/2 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). احتمالاً ترکیبات آنتی‌اکسیدان باعث کاهش تولید

تیمارهای هورمونی تحت بررسی معنی‌دار است (جدول ۲).

ریشه‌زایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که، کاربرد غلظت‌های مختلف هورمون NAA تأثیر معنی‌داری (p-value ≤ 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 ریشه‌ها با مقدار ۳/۴۷ (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 گلوکوتایون احیا، درصد باززایی و ساقه‌زایی را به صورت معنی‌داری (p-value ≤ 0.05) افزایش دادند. در این بین کاربرد

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 میلی‌گرم 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* (Aicha & Abdelmalek, 2014) نیز گزارش داده شده است، اما افزایش هورمون BAP در گیاه *Salvia 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 احتمالاً به کنترل تقسیم و تمایز سلولی توسط تنظیم‌کننده‌های رشد و به خصوص هورمون اکسین‌ها مربوط است. در گیاهان مختلف، میزان اکسین درونی در فرآیندهای ریشه‌زایی، دچار تغییراتی می‌شود. 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 از سطوح هورمونی NAA، علاوه بر ریشه‌های حقیقی، ریشه‌های نا بجا نیز مشاهده شد. در فرایند ریشه‌زایی و افزایش رشد ریشه در تیمارهای مذکور طول گیاهچه‌ها به صورت

ترکیبات سمی و فنی 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* (Dibax et al., 2005) تأیید شد.

کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک‌اسید و گلوکاتایون احیا برای افزایش تمایز ساقه‌های گیاهان در شرایط درون شیشه تأیید شده است (Joy et al., 1998). تیمار گلوکاتایون 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 گلابول، کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدان باعث تحریک و افزایش ساقه‌زایی گیاه شد (Dutaa- Gupta & Datta, 2003). احتمالاً افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان 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 گلوکاتایون 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 آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در تنظیم تقسیم سلولی و افزایش آن دارند.

در آزمایش دوم غلظت‌های مختلف هورمون BAP در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۲ میکرومول بر لیتر گلوکاتایون احیا تأثیر معنی‌داری ($p\text{-value} \leq 0.05$) بر ساقه‌زایی داشت (جدول ۲). غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد در محیط القای ساقه، اثر تنظیمی متفاوتی به روی مورفوزن دارند. کاربرد خارجی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، نقش بسیار مهمی در تشکیل ساقه دارند و شدیداً بر ساقه‌زایی تأثیر گذار هستند (Rout, 2000). بیشترین درصد ساقه‌زایی به محیط کشت MS ۱/۲ + ۲ میکرومول بر لیتر گلوکاتایون احیا + غلظت‌های هورمون BAP ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر مربوط بود. همچنین بیشترین تعداد ساقه تولید شده در محیط کشت MS ۱/۲ + ۲ میکرومول بر لیتر گلوکاتایون احیا +

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. Micropropagation 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 camaldensis*. – 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., Mohaghezhadeh, A. and Mehregan, I.** 2003. Quantity and composition of the SDE prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Bross. – 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

قابل توجهی افزایش یافت که این موضوع احتمالاً به اثر مثبت ریشه بر بقای گیاهچه‌ها 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 جوانه‌های انتهایی گیاه *Salvia lerifolia* Benth. محیط کشت 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 ساقه‌های 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 می‌گردد.

- 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.
- Sulistiari, 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: ۱۹۸-۲۰۵.