Plant Production and Genetics
Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2022, p. 225-234

تولید و ژنتیک گیاهی
جلد ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحه ۲۳۴-۲۲۵

مقاله پژوهشی

DOI: 10.34785/J020.2022.007

تکثیر کشت بافتی گیاه مرزه سهندی (*Satureja sahandica* Bornm) یک گونه با ارزش دارویی

اسعد معروفی*[۱]، هلیا بهمنی[۲]، براتعلی فاخری[۳]، محمد مجدی[۱]

۱. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
و دانشیار، مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۹

چکیده

مرزه سهندی (*Satureja sahandica* Bornm) یکی از گونه‌های بومی ایران است که دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی است. ارزش بالای مواد مؤثره گیاه دارویی مرزه سهندی باعث شده است که نیاز به روش‌هایی برای تکثیر سریع و مطمئن مانند کشت سلول و بافت احساس شود. به همین دلیل در این تحقیق بهینه‌سازی یک روش تکثیر درون‌شیشه‌ای برای گیاه مرزه سهندی انجام شد. ابتدا ریزنمونه‌ها از کشت گیاهچه‌های بذری استریل تهیه شدند. تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی مورداستفاده برای کالوس‌زایی در محیط کشت MS شامل ترکیبات 2,4-D در سه سطح همراه با BA (بنزیل‌آدنین) در چهار سطح و یا ترکیب NAA در دو سطح به همراه با BA در پنج سطح بودند. همچنین تیمار BA در پنج سطح برای شاخه‌زایی کالوس‌ها استفاده شد. ریزنمونه‌ها تحت تأثیر ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متفاوت، عکس‌العمل‌های کال‌زایی متفاوتی را نشان دادند. ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌اضافه یک میلی‌گرم در لیتر BA و ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بالاترین میزان القاء کالوس‌زایی (۱۰۰٪) را نشان دادند. کالوس‌های تولیدشده سبزرنگ و دارای ساختار کروی و بافتی سفت و فشرده بودند. همچنین بیشترین تعداد شاخه‌های باززا شده (سه نوشاخه) از کالوس‌ها مربوط به غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بود. این نتایج می‌تواند به‌عنوان یک روش ساده و مناسب در باززایی گیاه مرزه سهندی برای ریز ازدیادی در شرایط درون‌شیشه‌ای و یا انتقال ژن مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژگان: کالوس، کشت بافت، گیاهان دارویی، مرزه سهندی

* ایمیل نویسنده مسئول: a.maroufi@uok.ac.ir

مقدمه

طی نیم‌قرن گذشته، استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به‌شدت رواج یافته ولی به دلیل آثار منفی در بیشتر موارد علاوه بر هزینه‌های زیاد تهیه آن‌ها سبب گرایش مجدد انسان به گیاهان داروئی شده است. مرکز سلامت جهانی تخمین زده است که امروزه بیش از ۸۰ درصد از مردم در جهان هنوز هم به درمان‌های سنتی ازجمله استفاده از گیاهان به‌عنوان منابع دارویی تکیه‌دارند. همچنین گزارش‌ها نشان می‌دهند که حدود یک‌چهارم داروهای تجویزشده حاوی عصاره گیاهی یا ترکیبات فعال به‌دست‌آمده از آن‌ها هستند (Omid Beigi, 2005). با افزایش مصرف داروهای حاصل از گیاهان در پی رویکرد جدی جامعه به این دسته از داروها، شرکت‌های داروسازی نیز به‌طور گسترده به تولید داروها و فرآورده‌های آرایشی بهداشتی با منشأ گیاهی روی آورده‌اند. این مسئله سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده است. از طرف دیگر، به دلیل ساختمان شیمیایی و یا چرخه‌های تولید بسیار پیچیده، تولید مواد مؤثره گیاهان (متابولیت‌های ثانویه) به روش سنتتیک در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار زیاد است (Farsi and Zolali, 2005). از نیم قرن گذشته داروهای زیادی از منابع گیاهی (متابولیت‌های ثانویه) به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم تهیه شده‌اند، که شامل محصولات مشتق‌شده از محصولات طبیعی و یا سنتزی بر پایه مدل‌های طبیعی هستند. به عنوان مثال، داروهای ارزشمندی چون تاکسول، وین‌بلاستین، وین‌کریستین، کامپتوتسین، پودوفیلوتوکسین و آجمالیسین از مهم‌ترین داروهای ضد سرطان با منشأ گیاهی هستند که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. سلول‌های گیاهی مقادیر متنوعی از این فرآورده‌ها را تولید می‌کنند که نه‌تنها در داروسازی بلکه در صنایع دیگر نیز کاربرد دارند. بنابراین تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش آن‌ها در گیاهان داروئی نقش مهمی در داروسازی و صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی، عطرسازی و رنگرزی به‌دست آورده است. به دلیل، اهمیت گیاهان دارویی در صنایع ذکرشده استفاده مستقیم از آن‌ها و برداشت بی‌رویه باعث تهدید هر چه بیشتر گیاهان دارویی شده است. همچنین پتانسیل تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط طبیعی بسیار محدود می‌باشد و عوامل مختلفی نظیر شرایط اقلیمی و محیطی تولید این ترکیبات با ارزش را با محدودیت مواجه می‌نماید. محققین استفاده از تکنیک‌های جدید نظیر کشت سلول و بافت گیاهی، مهندسی ژنتیک گیاهان دارویی و مهندسی متابولیک و بیورآکتورها را یکی از راهکارهای مهم جهت برطرف کردن این مشکلات معرفی کرده‌اند. یکی از شاخه‌های مهم بیوتکنولوژی، کشت بافت و سلول گیاهان است که کاربردهای آن در رابطه با گیاهان دارویی، از جنبه‌های مختلفی ازجمله تکثیر و ازدیاد، ایجاد تنوع ژنتیکی و افزایش توان تولید بسیار چشم‌گیر است. استفاده از روش‌های بیوتکنولوژیکی به‌منظور تکثیر و افزایش توان ژنتیکی گیاهان دارویی در تولید مواد مؤثره و باارزش و همچنین شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر ژنوتیپ‌هایی که فرآورده بیشتری تولید می‌کنند، می‌تواند هم ازلحاظ زیست‌محیطی بسیار مفید بوده و هم سودآور باشد. بکارگیری روش‌های ریزازدیادی، کشت سلول و اندام‌های گیاهی منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان در مقیاس وسیع شده است (Ramachandra and Ravishankar, 2002). با توجه به این که سلول‌های گیاهی خاصیت پرتوانی دارند، هر سلول تحت کشت بافت و یا گیاهان باززا شده در کشت این‌ویترو[1] تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را دارا خواهند بود و بر همین اساس، توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای را که در گیاه والد یافت می‌شود خواهند داشت (Ramachandra and Ravishankar, 2002). مزیت این روش در مقایسه با تولید از طریق کشت‌های رایج و سنتی علاوه بر تولید با هزینه کم‌تر و سرعت بالاتر، شامل تولید مستقل از تغییرات فصلی، جغرافیایی و فاکتورهای محیطی می‌باشد. به‌علاوه، در مواردی تولید متابولیت‌های ثانویه با تمایز بافت و یا تمایز سلولی ارتباط تنگاتنگی دارد. این ارتباط ممکن است به ساختار خاصی از سلول و یا توسعه آن بافت بستگی داشته باشد. همچنین ممکن است در مواردی به ارتباط فیزیولوژیکی خاصی مرتبط با سن گیاه نیاز باشد. تولید گیاهان سالم و تمایزیافته از طریق کشت بافت این نیازها را برطرف می‌کند (Asghari *et al*., 2013). بنابراین روش کشت بافت جهت تولید بافت‌های تمایزیافته بسیار حائز اهمیت است، زیرا یک ویژگی کشت بافت و ارگان گیاهی این است که اندام به روشی مشابه با گیاه والد رشد و تکوین

[1] *In vitro*

می‌یابد (Farsi and Zolali, 2005). این سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های باززا شده گیاهی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Farsi and Zolali, 2005).

انواع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش قابل‌ملاحظه‌ای در باززایی گیاهان و القاء کالوس در کشت بافت و ریزازدیادی گیاهان زراعی و زینتی دارند. بدین منظور در این پژوهش، تکثیر کشت‌بافتی و ایجاد کالوس با استفاده از چندین تنظیم‌کننده رشد گیاهی مهم روی گیاه مرزه سهندی مورد بررسی قرار گرفت. مرزه سهندی (*Satureja sahandica* Bornm) گیاهی از خانواده لامیاسه و با ویژگی‌های دارویی با ارزش است. ترکیب‌های ثانویه و معطر آن در صنایع دارویی، غذایی، بهداشتی و آرایشی کاربرد فراوان دارد. این گیاه دارویی از گونه‌های منحصربه‌فرد ایران است که وجود آن در بخش‌های شمال غرب ایران گزارش شده است. گل‌های آن سفیدرنگ، بسیار معطر و جاذب زنبور عسل هستند (Tabatabaei *et al.*, 2007). عصاره مرزه سهندی دارای ترکیبات مونوترپنی است. ترکیب روغن به‌دست‌آمده از بخش‌های هوایی خشک‌شده مرزه سهندی شمال غرب ایران با استفاده از گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شامل مونوترپنوییدها (مونوترپن‌های هیدروکربن و مونوترپن‌های اکسیژنه) و همچنین یک نسبت جزیی از سزکویی ترپنوئیدها با درصد کمتری بودند. مونوترپن‌های هیدروکربن با ۶۰/۶ درصد و مونوترپن‌های اکسیژنه با ۳۳/۶ درصد دو گروه غالب بودند. هیدروکربن مونوترپن‌های اصلی اسانس مرزه به ترتیب α-terpinene (۵/۱ درصد)، p-cymene (۶/۵ درصد)، γ-terpinene (۴۲/۲ درصد)، α-thujene (۱درصد)، limonene (۱/۱درصد) و myrcene(۲/۳درصد) می‌باشند (Hassanpouraghdam *et al.*, 2009). تیمول و کارواکرول که به طور مستقیم از گاما ترپینن توسط سیتوکروم p450 تشکیل می‌شوند از ترکیبات بسیار با ارزش در مرزه هستند (Crocoll, 2010). بیشتر گونه‌های مرزه‌ی اهلی و وحشی به علت دارا بودن ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول در اسانس و یا اسید رزمارینیک و سایر اسیدهای فنلی در عصاره، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی قوی می‌باشند (Sefidkon *et al.*, 2007). به نظر می‌رسد با توجه به اهمیت دارویی گیاه مرزه سهندی و در معرض خطر انقراض بودن آن به‌دلیل استفاده بی‌رویه در طبیعت، تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کنترل‌شده درون‌شیشه‌ای و همچنین ایجاد گیاهان تراریخت، نیاز به یک روش ساده و در عین حال با کارآیی بالای کشت بافت وجود دارد که پژوهش حاضر تلاشی در جهت رفع این نیاز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

ریزنمونه‌ها برای استفاده در کشت بافت از کشت گیاهچه‌های بذری استریل تهیه شدند. بذرهای گیاه مرزه سهندی از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. گیاهان بالغ نیز از مناطق کوهستان‌های شمال غرب کشور تهیه شدند. بذرهای مرزه سهندی ابتدا با آب و مایع ظرف‌شویی به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. سپس بذور با قارچ‌کش ویتاواکس به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. برای اعمال تیمار سرما ابتدا بذور در پتری‌دیش روی یک لایه کاغذ صافی استریل قرار گرفتند و به مدت ۳۰ روز در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از طی این مدت، ضدعفونی نهایی در زیر هود لامینار استریل انجام گرفت. به این صورت که، ابتدا بذور با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه تیمار شدند. سپس با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بلافاصله پس از این مرحله، بذرها در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و با آب مقطر استریل سه مرتبه آبکشی شده و آب آن‌ها با کاغذ صافی استریل گرفته شد. نهایتاً، بذرها در بطری‌های حاوی محیط کشت استریل 1/2MS (نیم غلظت) قرار داده شدند. بطری‌ها به ژرمیناتور با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند.

القای کالوس

جهت کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های ساقه که از رشد گیاهچه‌های جوان حاصل شده‌اند استفاده شد. تیمارهای تنظیم‌کننده رشد گیاهی شامل ترکیبات 2,4-D در سه سطح (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) همراه با بنزیل آدنین (BA) در چهار سطح (صفر، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)(آزمایش شماره ۱) و ترکیبات نفتالین استیک‌اسید (NAA) در غلظت‌های (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با بنزیل آدنین (BA) در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵

میلی‌گرم در لیتر)(آزمایش شماره ۲) بودند. ریزنمونه‌های تهیه‌شده درون ظروف شیشه‌ای حاوی محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) با ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ذکرشده زیر هود لامینار قرار داده شدند. کشت‌ها به اتاق رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. کالوس‌زایی در ترکیبات متفاوت به صورت روزانه بازدید شد. هر دو هفته یک‌بار واکشت ریزنمونه‌ها انجام شد. نهایتاً پس از اطمینان از تولید کالوس‌ها، چهار هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها درصد کالوس‌زایی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Chaudhry *et al.*, 2014).

$$\text{درصد کالوس‌زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس‌های تولیدشده}}{\text{تعداد ریزنمونه کشت‌شده}} \times ۱۰۰$$

شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های کشت‌بافتی

در این بخش، باززایی شاخه‌ها از کالوس‌های القاشده در آزمایش‌های قبل (آزمایش شماره ۱ و ۲) بررسی شد (آزمایش شماره ۳). تیمارها شامل BA در غلظت‌های (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در درون ظروف شیشه‌ای حاوی محیط MS بودند. کشت‌ها به اتاق رشد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. شاخه‌زایی نیز در ترکیبات مورداستفاده، به صورت روزانه بررسی شد. هر دو هفته یک‌بار واکشت ریزنمونه‌ها انجام شد. نهایتاً پس از اطمینان از تولید شاخه‌ها بعد از گذشت چهار هفته تعداد و طول شاخساره‌های باززایی شده اندازه‌گیری شدند. پس از تولید نوشاخه‌ها، آن‌ها به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. به‌منظور ریشه‌زایی از IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. این تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای اکثر گیاهان جهت القای ریشه، مناسب معرفی شده است (Debnath *et al.*, 2006; Sharafzadeh and Alizadeh, 2012). گیاهچه‌های کشت‌بافتی، پس از ریشه‌دار شدن کامل، به گلدان حاوی بستر کشت مناسب منتقل شده و سطح آن‌ها با پوشش پلاستیکی پوشانده شد. به‌طور روزانه از گیاهان بازدید شده و هر روز یک تا چند سوراخ در پوشش پلاستیکی ایجاد گردید. زمانی که گیاهان توانستند به محیط سازگار شوند و فتوسنتز انجام دهند، پوشش پلاستیکی برداشته شد.

آنالیزهای آماری

آزمایش کالوس‌زایی به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار و هر تکرار شامل ده ریزنمونه در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا و آنالیز شد. اجرا و آنالیز آزمایش شاخه‌زایی نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار شامل چهار ریزنمونه بود. محاسبات آماری با نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

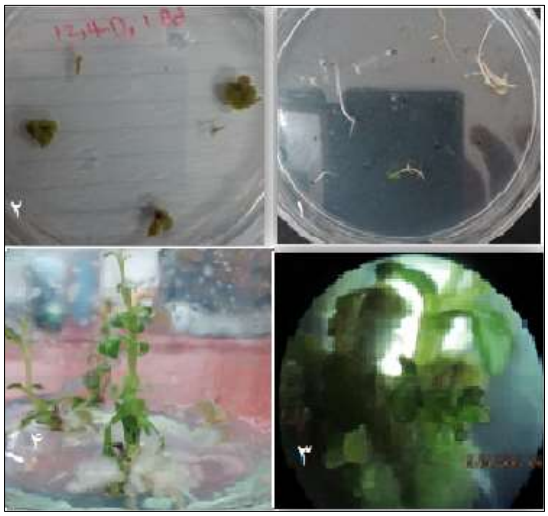
کالوس‌زایی

تیمار سرما بر جوانه‌زنی بذرها بسیار مؤثر بود و درصد بالایی از آن‌ها جوانه زدند (شکل ۱-۱). از این بذرها ریزنمونه‌های سالم جهت آزمایش کالوس‌زایی با موفقیت تهیه شد. پس از گذشت ۷ روز از کشت ریزنمونه‌های سرشاخه جوان روی محیط کشت حاوی ترکیبات متفاوت تنظیم‌کننده رشد گیاهی، القاء کالوس بررسی شد. بعد از گذشت تقریباً یک ماه، کالوس‌ها در تیمارهای القاءکننده در دو آزمایش به‌طور کامل قابل‌مشاهده بودند. ریز نمونه‌ها تحت تأثیر ترکیبات متفاوت، کالوس‌زایی متفاوتی را نشان دادند. همچنین کالوس‌های تولیدشده اکثراً سبز رنگ، با ساختار کروی و دارای بافتی سفت و متراکم بودند (شکل ۱-۲). به‌طورکلی در مطالعه اثر متقابل ترکیبات NAA با BA و همچنین 2,4-D با BA بر کالوس‌زایی نتایج متفاوتی به‌دست آمد.

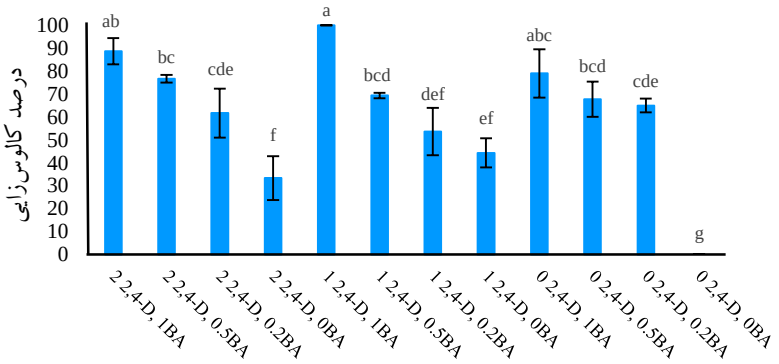
در آزمایش شماره ۱ محیط کشت MS حاوی ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌اضافه یک میلی‌گرم در لیتر BA بالاترین میزان کالوس‌زایی را نشان داد (۱۰۰ درصد، شکل ۲)، و کالوس‌های تولیدشده سبز رنگ و دارای ساختار کروی و بافتی سفت و فشرده بودند. سایر تیمارهای به‌کار رفته در این آزمایش مانند ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA نیز کالوس‌زایی بالایی را نشان دادند (۸۹ درصد).

در آزمایش شماره ۲، ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بالاترین درصد کالوس‌زایی را به خود اختصاص داد (شکل ۳). محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز به مقدار قابل‌توجهی در تولید کالوس مؤثر بود (۸۷ درصد).

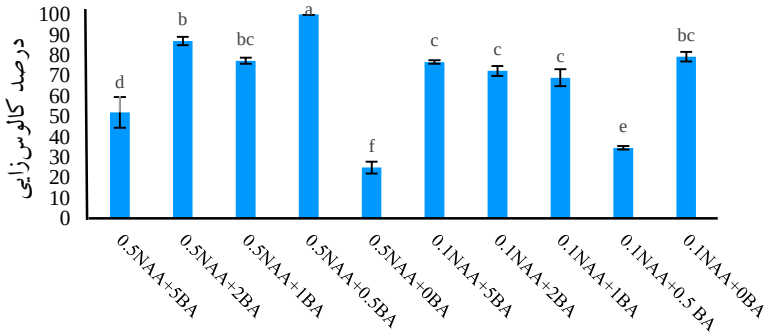
نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای مقادیر درصد تشکیل کالوس در تیمارهای مورد مطالعه در دو آزمایش نشان داد اثر تیمارهای متفاوت بر میزان کالوس‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است. به نظر می‌رسد محیط کشت MS حاوی ترکیبات NAA با BA و همچنین 2,4-D با BA، در دو آزمایش در قدرت القای کالوس مؤثر بوده‌اند (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۱- مراحل کشت بافت مرزه سهندی: (۱) جوانه‌زنی بذر، (۲) کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه، (۳) القاء و شاخه‌زایی کالوس‌ها، (۴) گیاهچه‌های سالم پس از واکشت



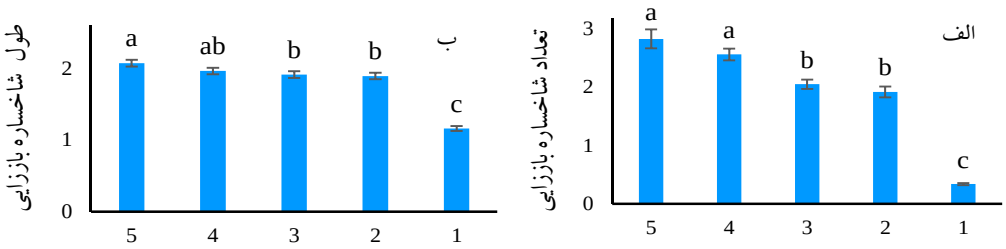
شکل ۲- مقایسه میانگین‌های درصد کالوس‌زایی در ترکیبات مختلف 2,4-D و BA (آزمایش شماره ۱)
داشتن حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های درصد کالوس‌زایی در ترکیبات NAA و BA (آزمایش شماره ۲)
داشتن حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است

شاخه‌زایی

در آزمایش شماره ۳، القاء نوشاخه‌ها از کالوس‌های به‌دست‌آمده در آزمایش‌های ۱ و ۲ با استفاده از غلظت‌های متفاوت BA بررسی شد. پس از گذشت دو هفته مشخص شد برخی از این تیمارها در القاء شاخه مؤثر هستند (شکل ۱-۳). پس از گذشت پنج هفته که تمامی نوشاخه‌های باززا شده به اندازه کافی رشد کردند (شکل ۱-۴)، تعداد و طول شاخساره‌های باززایی‌شده محاسبه شد. طول آن‌ها پس از پنج هفته، از یک تا دو سانتی‌متر متفاوت بود. آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها برای این آزمایش نشان داد بیشترین تعداد شاخه باززا شده (۳ شاخه) مربوط به غلظت‌های ۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA بود (شکل ۴ الف). همچنین طول شاخساره‌های باززایی‌شده در این غلظت‌ها ماکزیمم (۲ سانتی‌متر) بودند (شکل۴ ب). به‌طورکلی قدرت شاخه‌زایی با افزایش غلظت BA افزایش نشان داد.



شکل۴- مقایسه میانگین تعداد (الف) و طول (ب) شاخساره‌های باززایی شده در غلظت‌های مختلف BA (محور افقی بر حسب میلی‌گرم بر لیتر) داشتن حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است

کشت بافت و سلول گیاهی ازجمله روش‌های قدرتمند زیست‌فناوری جهت تکثیر در مقیاس وسیع، ایجاد تنوع، تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای و کنترل‌شده نسبت به کشت و تکثیر گیاهان به روش سنتی و نیز تولید گیاهان تراریخته می‌باشد. کشت بافت‌های گیاهی بر اساس خاصیت توتی‌پتنسی[1] گیاهان که هر سلول توانایی رشد، نمو و تبدیل‌شدن به گیاه کامل را دارد، استوار است. کشت بافت به‌منظور تکثیر سریع گیاهان به‌ویژه گیاهانی که تکثیر غیرجنسی آن‌ها با روش‌های سنتی، غیرممکن و یا مشکل است از اهمیت بالایی برخوردار است (Hussain *et al.*, 2012). علاوه بر این، کشت بافت گیاهی می‌تواند روش مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا در حال انقراض طبیعی و نیز منابع با ارزش ژرم‌پلاسم محسوب شود (Arikat *et al.*, 2004). در مورد گیاهان دارویی، روش‌های کشت بافت علاوه بر به‌دست آوردن تعداد زیادی گیاه مشابه و سالم با ظرفیت تولید بالا، یک روش مناسب جهت تولید متابولیت‌های ثانویه حاصل از این گیاهان است (Sajc *et al.*, 2000; Radulović *et al.*, 2007).

در کشت بافت گیاهی، محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) بیشترین کاربرد را در تکثیر و کشت بافت در شرایط درون‌شیشه‌ای دارا می‌باشد. هورمون‌های گیاهی یا تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی هم اثرات بسزایی در پاسخ ریزنمونه‌ها در القاء کالوس، تکامل سلول‌ها و بافت‌های گیاهی و شاخه‌زایی دارند (Hussain *et al.*, 2012). القاء کالوس یکی از مراحل بسیار مهم در باززایی و تکثیر، به‌ویژه در کشت سلول در گیاهان دارویی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. همچنین یکی از مراحل اساسی در استفاده موفق از روش‌های جدید اصلاح ژنتیکی گیاهان، تولید کالوس‌های باکیفیت و داشتن یک روش باززایی مناسب می‌باشد (Khalafalla *et al.*, 2010). محققان توانستند با تغییر نسبت اکسین به سیتوکینین در محیط کشت، نتایج متفاوتی را در تولید کالوس‌ها مشاهده کنند (Delany *et al.*, 1994). پژوهشگران دیگری هم موفق شدند کالوس‌زایی گیاه توتون را با استفاده از تعادل اکسین و سیتوکینین در محیط کشت به انجام برسانند (Bhojwani and Razdan, 1996). در تحقیق حاضر نیز القاء کالوس در ریزنمونه‌های سرشاخه جوان گیاه مرزه سهندی تحت تأثیر ترکیبات 2,4-

[1] Totipotency

D با BA و NAA با BA در چندین غلظت بسیار موفقیت‌آمیز بود. ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌اضافه یک میلی‌گرم در لیتر BA و همچنین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA دارای اثرات بسیار معنی‌داری در تولید کالوس بودند. در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه مرزه تابستانه در محیط کشت MS، ترکیب BA با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، بیشترین وزن تر و خشک کالوس به دست آمد (Mottaghinia, 2011).

همچنین کشت ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه مرزه اورامانی (*Satureja avromanica*) در محیط MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف، ترکیب (۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA) و ترکیب (۰/۵ میلی‌گرم در لیترD-2,4 به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA)، مشخص شد بالاترین میزان القای کالوس در محیط حاوی (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) و (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌اضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیترD-2,4) حادث می‌شود (Karimi *et al.*, 2014). به عبارت دیگر، ترکیبات 2,4-D به‌اضافه BA و همچنین NAA به همراه BA ترکیبات مؤثری در القاء کالوس در گیاه مرزه بوده‌اند که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر کاملاً سازگار است. به‌علاوه، این ترکیبات در بسیاری از گیاهان دیگر نیز در تشکیل کالوس موفق عمل کرده‌اند. ترکیب BA به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی ارزان و قابل‌دسترس از خانواده سایتوکینین در باززایی بسیاری از گیاهان مؤثر بوده است. در این تحقیق نیز غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA در باززایی نوشاخه از کالوس‌ها بسیار مؤثر بودند. این نتایج، مشابه باززایی در دیگر گیاهان در حضور BA می‌باشد. به عنوان مثال گیاه مرزه تابستانی (*Satureja hortensis*)(Navroski *et al.*, 2012)، گیاه ریحان کافور (*Ocimum kilimandscharicum*)(2010 Saha *et al.*,)، گیاه حاشا (*Thymus capitatus*)(El-Makawy *et al.*, 2008) و گیاه کوینلا (*Cunila galioides*)(Fracaro, and Echeverrigaray, 2001). با این وصف، محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از BA بهترین ترکیب جهت باززایی می‌باشد. همچنین Ghorban Babaei و همکاران (2012) در مطالعه خود روی باززایی گیاه مرزه موتیکا (*Satureja mutica*) اظهار داشتند در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BA بیشترین تعداد شاخه‌ها باززایی می‌شوند. در مطالعه Karami (2014) نیز بیشترین تعداد شاخساره‌های باززایی شده گیاه مرزه اورامانی (*Satureja avromanic* Maroofi) در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BA در مقایسه با BAP و TDZ به‌دست آمد. Zahedi و Sahraroo (2015) هم در مطالعه کشت بافت گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) در ترکیب ۳ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین میزان شاخه‌زایی را مشاهده کردند. در دیگر گونه‌های خانواده لامیاسه مانند گیاه ریحان نیز حداکثر باززایی در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده گردید (Asghari *et al.*, 2012). به نظر می‌رسد تنظیم‌کننده رشد BA قادر است در گیاه مرزه سهندی و دیگر گونه‌های مرزه و حتی در کل گیاهان خانواده لامیاسه ترکیب مناسبی برای شاخه‌زایی در کشت بافت باشد.

نتیجه‌گیری کلی

کالوس‌زایی گیاه مرزه سهندی در محیط کشت MS شامل ترکیب اکسین‌های نفتالین استیک‌اسید (NAA) یا 2,4-D همراه با بنزیل آدنین (BA) در غلظت‌های مختلف موفقیت‌آمیز بود. برخی ترکیبات ازجمله ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌اضافه یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه میلی‌گرم در لیتر BA در کالوس‌زایی برتر بودند. همچنین تیمار BA برای شاخه‌زایی کالوس‌ها کاملاً مؤثر بود، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه‌های القاءشده مربوط به غلظت‌های ۵ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA بود. این ترکیبات در محیط کشت MS می‌توانند در تکثیر درون‌شیشه‌ای و یا به‌عنوان روش کشت بافت در انتقال ژن گیاه مرزه سهندی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

از کارشناسان آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان جهت تمامی مساعدت‌ها در انجام این پژوهش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Arikat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S. and Shibli, R.A. 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientia Horticulturae, 100: 193-202.

Asghari, F. Hossini, B., Hassani, A., Asghari, M. and Farokhi, J. 2012. Effect of different hormonal combination on *In vitro* direct shoot regeneration of basil (*Ocimum basilicum*). Agricultural Biotechnology, 4(2): 1-15. (In Persian).

Asghari, F., Hassani A., Hosseini, B. and Farokhi, J. 2013. Effect of genotype and different concentration of BAP on *in vitro* direct regeneration of basil (*Ocimum Basilicum*). Agricultural Sciences and Technology), 26(4): 434-439. (In Persian).

Bhojwani, S. and Razdan, M. 1996. Haploid production. Plant tissue culture: theory and practice. New York: Elsevier.

Chaudhry, H., Fatima, N. and Ahmad, I.Z. 2014. Evaluation of *Nigella sativa* L. callus extracts under elicitation for phytochemical and antibacterial activity. Pharma and Bio Sciences, 5: 903-916.

Crocoll, C. 2010. Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Ph.D. thesis. Jena, Germany: University Jena, 143 pp.

Debnath, M., Malik, C. and Bisen, P.S. 2006. Micropropagation: a tool for the production of high-quality plant-based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology, 7: 33-49.

Delany, W., Desmond, K., Prussack, D.A., Varevice, S. and Smith, R.A. 1994. Investigating the Skoog-Miller Model for Organogenesis Using Sweet Potato Root Explants. The American Biology Teacher, 56(1): 44-46.

El-Makawy, M., Yasser, M., Allah, M.A. and Nishawy, S. 2008. *In vitro* clonal propagation of *Thymus capitatus* L. through direct regeneration. Pakistan Journal of Biotechnology, 5(1-2): 39-44.

Farsi, M. and Zolali, J. 2005. Principles of plant biotechnology. Ferdowsi university of Mashhad press, 508 pp. (In Persian).

Fracaro, F. and Echeverrigaray, S. 2001. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64(1): 1-4.

Ghorban Babaei, N., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Mir Masoumi, M. and Zanganeh, E. 2012. The effect of growth regulators on *in vitro* micropropagation of *Satureja mutica*. National Congress of genetic resources and biodiversity. (In Persian).

Guarda, G., Padovan, S.G. and Delogu, G. 2004. Grain yield, nitrogen use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels. European Journal of Agronomy, 21(2): 181-192.

Hassanpouraghdam, M.B., Shalamzari, M.S., Aazami, M.A. and Shoja, A.M. 2009. γ-Terpinene and carvacrol rich volatile oil of *Satureja sahendica* Bornm. from Maragheh district in Northwest Iran. Chemija, 20(3): 186-189.

Hussain, A., Qarshi, I.A., Nazir, H. and Ullah, I. 2012. Plant tissue culture: current status and opportunities. Recent advances in plant *in vitro* culture, 6(10): 1-28.

Karami., E. 2014. Investigation of regeneration of Satureja avromanic Maroofi under *in vitro* conditions. M.Sc. Thesis. Tehran, Iran: Payame Noor University of Tehran. 124p. (In Persian).

Karimi, N., Ghasmpour, H.R. and Yari, M. 2014. Effect of different growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Satureja* species. Annual Research and Review in Biology, 4(16): 2646-2654.

khalafalla, M.M., Elaleem, K.G. and Modawi, R.S. 2010. Callus formation and organogensis of potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Almera. Phytology, 2(5): 40-46.

Mottaghinia, T. 2011. Effect of explant, medium and plant growth regulators on induction rate of *Satureja hortensis* L. M.Sc. Thesis. Mashhad, Iran: Ferdowsi University of Mashhad. 156p. (In Persian).

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

Navroski, M.C., Waldow, D.A.G., de Oliveira Pereira, M. and de Oliveira Pereira, A. 2012. Calogênese in vitro de segmentos apicais caulinares e internodais em segurelha *(Satureja hortensis* L.). Revista Agroambiente On-line, *6*(3): 228-234.

Omid Beigi, R. 2005. Approaches to the production and processing of medicinal plants. Astan Quds Razavi Press, 346p. (In Persian).

Radulović, N., Lazarević, J., Ristić, N. and Palić, R. 2007. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus Stachys (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan Stachys species. Biochemical Systematics and Ecology, 35(4): 196-208.

Ramachandra, S.R. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2): 101-153.

Saha, S., Dey, T. and Ghosh, P. 2010 .Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Lamiaceae). Acta Biologica Cracovievsia Botanica, 52(2): 50-58.

Sajc, L., Grubisic, D. and Vunjak-Novakovic, G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochemical Engineering, 4(2): 89-99.

Sefidkon, F., Sadeghzadeh, L., Teimouri, M., Asgari, F. and Ahmadi, S. 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. Khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica Bunge*) in two harvesting time. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23(2): 174-182. (In Persian).

Sharafzadeh, S. and Alizadeh, O. 2012. Some medicinal plants cultivated in Iran. Applied Pharmaceutical Science, 2: 134-137.

Tabatabaei, R.A., Khalighi, A., Kashi, A., Asnaashari, S., Bamdad Moghadam, S. and Delazar, A. 2007. Antioxidant activity and chemical compositions of essential oil of aerial parts of *Satureja sahendica* Bornm. Pharmaceutical Sciences, 3:10-20.

Zahedi, B. and Sahraroo, A. 2015. Evaluation of *Satureja khuzistanica* micropropagation as a medicinal plant. Iranian Journal of Horticultural Science, 46(2): 291-296.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol. 3, No. 2, Autumn & Winter 2022, p. 225-234 **جلد ۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحه ۲۳۴-۲۲۵**

Research Article DOI: 10.34785/J020.2022.007

In vitro Micropropagation of Sahendian savory (*Satureja sahendica* Bornm), a species with medicinal value

Asad Maroufi*[1], Helia Bahmani[2], BaratAli Fakhrti[3], Mohammad Majdi[1]

1. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

   Associate Professor, Research Center for Medicinal Plant Breeding and Development, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2. MSc. Graduate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

3. Proffesor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 30-04-2022

Accepted: 10-07-2022

Abstract

Sahendian savory *(Satureja sahendica* Bornm*)* is one of the native species of Iran that contain valuable secondary metabolites. The high value of the active ingredients of Sahendian savory has caused the need for methods for rapid Therefore, in this study, an *in vitro* tissue culture method was optimized for Sahendian savory. First, explants were prepared from sterile seedlings. Plant growth regulators treatments used for callus induction in MS medium included 2,4-D at three levels with BA (Benzyl Adenine) at four levels or NAA at two levels with BA at five levels (0, 0.5, 1, 2 and 5 mgl^{-1}). BA treatment was also used at five levels for shoot induction. Callus formation of explants showed different reactions under the influence of different hormonal compounds. The explants showed different callogenic reactions under the consequence of different plant growth regulators combinations. The combination of 1 mgl^{-1} 2,4-D plus 1 mgl^{-1} BA and the combination of 0.5 mgl^{-1}NAA with 0.5 mgl^{-1} BA showed the highest callus induction rate (100%). The calli produced were green and had a spherical and firm texture. Additionally, the highest number of regenerated shoots (3 shoots) from calli were related to concentrations of 4 and 5 mgl^{-1} BA. These results can be used as a simple and appropriate technique in the regeneration of Sahendian savory plants for *in vitro* micropropagation or gene transfer.

Keywords: Callus, tissue culture, medicinal plants, *Satureja sahendica* Bornm

*Corresponding Author Email: a.maroufi@uok.ac.ir