مقاله پژوهشی

القای باززایی در ریزنمونه‌های مختلف گیاه دارویی مورد (*Myrtus communis* L.)

نازیلا باقری[۱]، بهرام ملکی زنجانی[۲] و علی عمارلو[۳*]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشدبیوتکنولوژی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشکده ی کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار گروه زیست فناوری گیاهان دارویی، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

*نویسنده مسئول: علی عمارلو، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، ammarellou@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱/۱۸ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۴/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۶/۲۴

چکیده

پیشینه مطالعه و هدف: گیاه مورد (*Myrtus communis* L.) گیاهی چندساله، معطر و با خواص دارویی متعدد می‌باشد. مورد یک گیاه دارویی است که در طب سنتی در بسیاری از نقاط جهان استفاده می‌شود. تکثیر این گیاه از طریق قلمه یا بذر دشوار است. دوره خواب طولانی بذر و تولید گیاهچه‌های کوچک و ضعیف از معایب دیگر تکثیر با بذر می‌باشد. بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت به منظور آسان نمودن استفاده از ترکیبات این گیاه دارویی، بسیار مهم است. بنابراین در این پژوهش به بررسی اثر هورمون‌های مختلف باززایی بر افزایش راندمان باززایی این گیاه دارویی پرداخته شده است.

روش مطالعه: برای اجرای این آزمایش نیاز به تعداد زیادی بذر جوانه‌ی زده‌ی این گیاه در محیط موراشیک-اسکوگ (MS) بود. بعد از ۲۰ روز بذرهای جوانه زده به سه ریزنمونه‌ی ساقه‌چه، ریشه‌چه و برگچه تقسیم شده و در محیط MS حاوی هورمون 2,4-D تقسیم شدند. بعد از گذشت ۷ روز در ریزنمونه‌ها کالوس‌زایی ایجاد شد. ریزنمونه‌ها برای ارزیابی درصد باززایی در محیط MS حاوی هورمون کنتین، BAP، TDZ و ترکیب دو هورمون BAP+TDZ در چهار سطح (۰-۱-۲-۳) میلی‌گرم بر لیتر قرار داده شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی و سرعت رشد کالوس در ریزنمونه‌های برگچه بدست می‌آید. هورمون کنتین کم اثرترین هورمون در جهت باززایی این گیاه بود و هورمون TDZ تاثیری بیشتر از دو هورمون کنتین و BAP بر باززایی داشت. همچنین بیشترین درصد باززایی کالوس در ریزنمونه برگچه در حضور ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون TDZ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ریزنمونه برگچه و حضور هر دو هورمون TDZ و BAP میزان باززایی چشمگیری در گیاه مورد ایجاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: باززایی، کشت بافت، کالوس‌زایی، گیاه دارویی، گیاه مورد

مقدمه

گیاه مورد (*Myrtus communis* L.) متعلق به جنس (Myrtus) و از خانواده‌ی (Myrtaceae) می‌باشد. این گیاه بیشتر درمناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جنوب آمریکا و استرالیا رشد می‌کند. گیاه مورد درختچه‌ی کوچکی است که ارتفاع آن درشرایط عادی بین ۳-۱ متر ولی در آب وهوای مساعد به ارتفاع بیشتر از ۳ متر هم می‌رسد. برگ‌هایی به رنگ سبز تیره و معطر دارد. گل‌های درشت و سفید رنگی داشته و میوه ی آن از نظررنگ بر دو گونه است: حالت اول سیاه متمایل به آبی و حالت دوم تا زمان رسیدن میوه همچنان سفید باقی می‌ماند. گیاه مورد تحمل بالایی به شرایط خشکسالی دارد و ریشه‌ی آن دو تا چهار برابر عرض تاج گیاه رشد می‌کند (Mitrushi, 1955; EL-

(Zefzafy *et al.*, 2011). مورد یکی از گیاهان دارویی مهم است که در طب سنتی در بسیاری از نقاط جهان استفاده می‌شود. برگ و میوه‌ی آن به طور گسترده‌ای به عنوان یک طب عامیانه ی سنتی برای درمان بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها استفاده می‌شود. روغن مورد را می‌توان از برگ‌های آن استخراج کرد. این روغن خاصیت دارویی دارد و در دمای اتاق مایع است. گیاه مورد می‌تواند موجب افزایش و یا کاهش فعالیت تیروئید بسته به شرایط فرد شود (Scarpa *et al.*, 2000; Dejam and Farahmand, 2017). میوه‌ها و برگ‌های گیاه ذکر شده خاصیت ضد جهش‌زایی و ضدالتهابی دارد و ضدعفونی کننده است و برای درمان عفونت‌های داخلی و موضعی استفاده می‌شود (Bonjar, 2004; Hayder *et al.*, 2004; Aleksic and Knezevic, 2014). از اسانس گیاه مورد برای تولید داروهای طبیعی و از برگ‌های آن به عنوان چای نوشیدنی استفاده می‌شود (Ogur, 1994; Hayder *et al.*, 2004; Dejam and Farahmand, 2017). در دهه‌های گذشته اسانس شاخ و برگ مورد استفاده‌ی گسترده‌ای در زمینه‌ی موادغذایی، مواد گیاهی و همین‌طور عطرسازی دارد (Taylor, 1996; Atik *et al.*, 2020). این گیاه عموما از طریق بذر تکثیر می‌گردد. برخی از گزارشات حاکی از امکان تکثیر آن با قلمه نیز می‌باشد. در هر دو روش ذکر شده تکثیر گیاه مورد با دشواری‌های عمده‌ای همراه است. دوره خواب طولانی بذر و تولید گیاهچه‌های کوچک و ضعیف از معایب تکثیر با بذر می‌باشد. درصد ریشه‌زایی قلمه از عمده‌ترین محدودیت‌های قلمه زنی آن است (Canhoto, 1999). مبحث کشاورزی مولکولی یکی از موضوعات نوین و کاربردی در حوزه ی کشاورزی است. کشت گیاهان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب، آنزیم‌ها یا متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای صنعتی و درمانی از طریق مهندسی ژنتیک، کشاورزی مولکولی نامیده می‌شود (Haque and Ghosh, 2013). کالوس‌زایی یکی از فرآیندهای مهم کشاورزی مولکولی می‌باشد. اولین گزارش مربوط به کشت بافت در گیاه دارویی مورد به سال ۱۹۹۴ توسط نوبر باز می‌گردد (Nobre, 1994). در این پژوهش امکان کشت بافت گیاه مورد با هدف باززایی از بافت‌های مختلف آن در پاسخ به غلظت‌های مختلف هورمون‌های کنتین،BAP، TDZ و BAP+TDZ با چهار سطح (۰-۱-۲-۳) میلی گرم بر لیتر بر روی بذرهای گیاه دارویی مورد بررسی گردید.

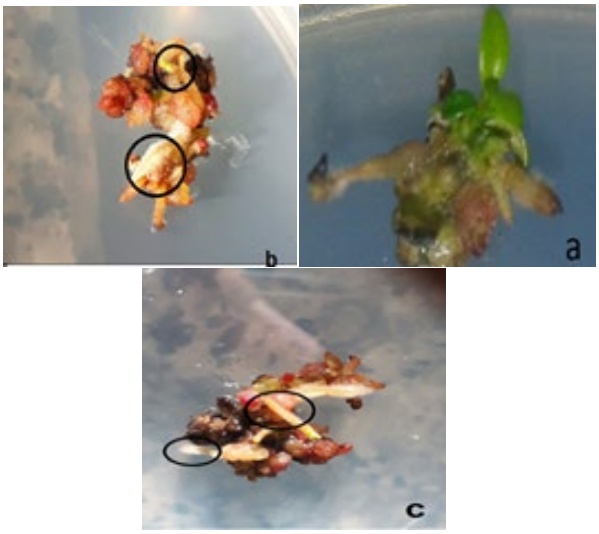
روش مطالعه

بذرهای گیاه دارویی مورد از کلکسیون زنده‌ی گیاهان دارویی پژوهشکده‌ی کشاورزی دانشگاه زنجان تهیه گردید. بذرها به مدت۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ٪۲ (w/v)، ۵ دقیقه در محلول آب اکسیژنه٪۱۱ (v/v) و به مدت ۲ دقیقه در اتانول ٪۷۰ (v/v) ضدعفونی شدند. بذرها بعد از هر مرحله ۲ بار با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند. به منظور شکستن خواب بذرها از اسید جیبرلیک، سرما، خراش دهی و قرار دادن در آب جوش استفاده گردید. سپس بذور استریل شده در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) درون پتری دیش‌ها کشت شدند و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد و دوره‌ی نوری ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی در زیر نور فلورسنت سفید ملایم بر روی قفسه نگهداری گردیدند. بعد از گذشت ۳۰ روز، بذرها شروع به جوانه‌زنی کردند. از بذرهای جوانه زده تحت شرایط استریل ریزنمونه‌های برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه تهیه گردید. ریز نمونه‌های ذکر شده، به محیط کشت MS حاوی هورمون کالوس زایی انتقال داده شدند. محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها در اتاقک رشد قرار داده شد که پس از گذشت ۴۰ روز کالوس‌زایی انجام دادند. حال این ریزنمونه‌های به کالوس رفته (برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه) به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های باززایی کنتین، BAP، TDZ و TDZ+BAP با چهار سطح (۰-۱-۲-۳) میلی گرم بر لیترانتقال داده شدند. جهت باززایی گیاه مورد، از محیط کشت MS استفاده شد. بعد از تهیه‌ی محیط کشت MS، pH آن در حدود ۵/۷ تنظیم شد و آگار به میزان ۱۰ گرم جهت بستن محیط اضافه گردید. برای حل شدن آگار در محیط کشت موراشیک-اسکوگ و همینطور استریل شدن تمامی ترکیبات داخل آن، محیط در دستگاه اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از قرارگیری اکسپلنت‌ها در محیط کشت موراشیک –اسکوگ تحت شرایط کنترل شده ی نوری و دمایی (متوسط دما ۲۵ درجه و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) در اتاقک رشد قرار گرفت. همه‌ی مراحل ذکر شده در اتاقک کشت انجام گرفت. این اتاقک مجهز به هود لامینار ایرفلو و دستگاه استریلایزر می‌باشد. داده‌های تحقیق در قالب آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با چهار تکراردر سه سطح مورد تجزیه وتحلیل واریانس قرار گرفتند.

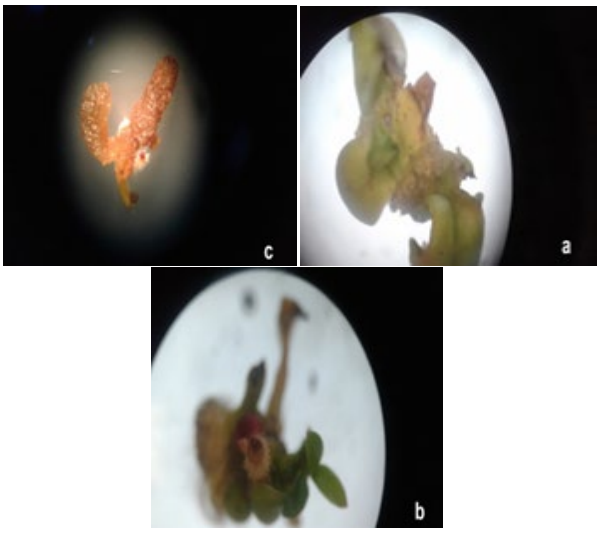
نتایج

ریزنمونه‌های به کالوس رفته بعد از گذشت شش هفته به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های باززایی کنتین، BAP، TDZ و هورمون ترکیبی BAP+TDZ با سطوح مختلف هورمونی منتقل شدند. شروع باززایی بعد از حدود ۴۰ روز مشاهده شد (شکل‌های ۱ تا ۴). ریزنمونه‌ی برگچه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها درصد باززایی بالایی به همراه داشت و کمترین میزان باززایی متعلق به ریزنمونه‌ی ریشه‌چه بود. از سطوح مختلف هورمونی، غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر از هورمون‌های ذکرشده درصد باززایی قابل توجهی را ایجاد کرد (نمودارهای ۱ تا ۴). استفاده از هورمون ترکیبی باززایی، BAP+TDZ

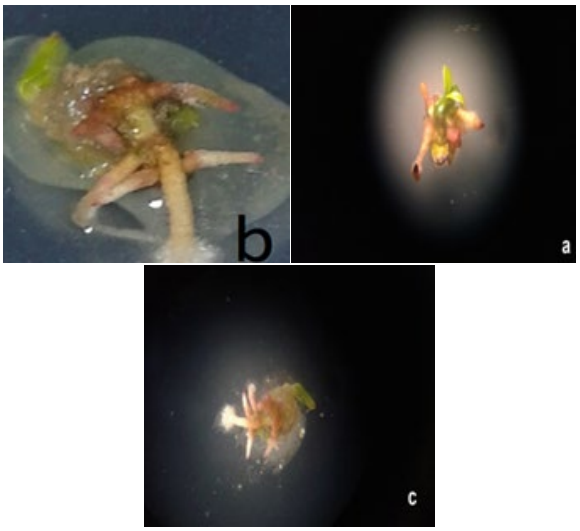
موفقیت چشمگیری در باززایی گیاه دارویی مورد داشت، به طوری که ریزنمونه‌ی برگچه با سطح ۳ میلی گرم بر لیتر از هورمون ترکیبی BAP+TDZ باززایی بیشتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشت (نمودار ۱). مکانیسم اصلی فرآیند باززایی بسیار پیچیده بوده و درصد باززایی در گیاهان مختلف و هورمون‌های مورد استفاده و همین‌طور محیط کشت‌های مختلف متفاوت است. با این حال توان باززایی گیاه مورد به دلیل سر سخت بودن این گیاه با مشکلاتی مواجه است.



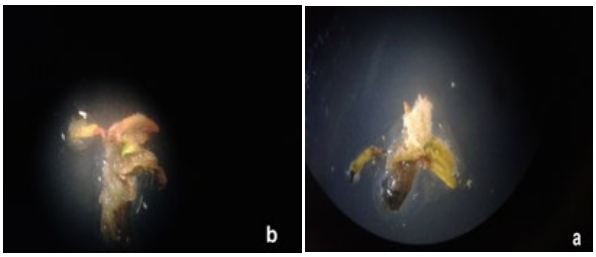
شکل ۱- باززایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی هورمون BAP+TDZ. (a) باززایی ریزنمونه‌ی برگچه در محیط کشت حاوی هورمون BAP+TDZ، (b) باززایی ریز نمونه‌ی ساقه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون BAP+TDZ، (c) باززایی ریز نمونه‌ی ریشه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون BAP+TDZ.



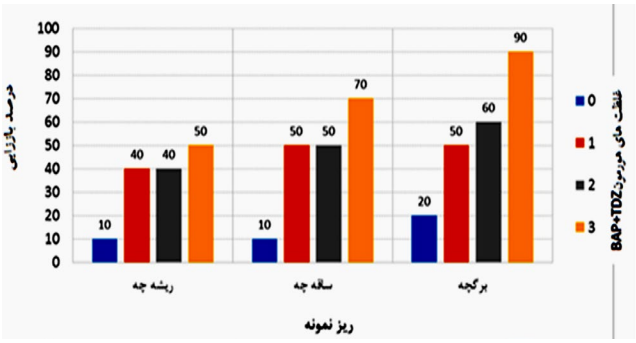
شکل ۲- باززایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی هورمون BAP. (a) باززایی ریزنمونه‌ی برگچه در محیط کشت حاوی هورمون BAP، (b) باززایی ریز نمونه‌ی ساقه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون BAP، (c) باززایی ریز نمونه‌ی ریشه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون BAP.



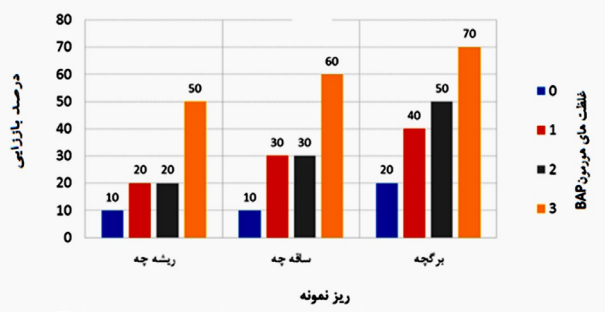
شکل ۳- باززایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی هورمون TDZ. (a) باززایی ریزنمونه‌ی برگچه در محیط کشت حاوی هورمون TDZ، (b) باززایی ریز نمونه‌ی ساقه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون TDZ، (c) باززایی ریز نمونه‌ی ریشه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون TDZ.



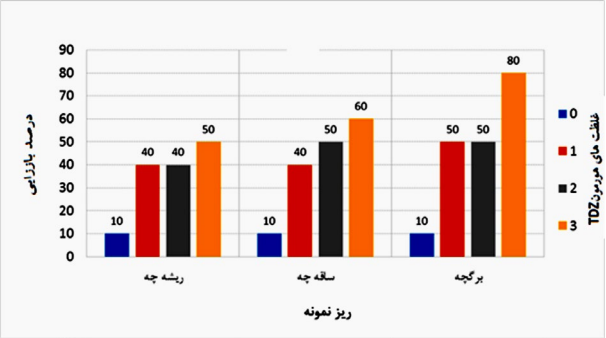
شکل ٤- باززایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی هورمون کنتین. (a) باززایی ریزنمونه‌ی برگچه در محیط کشت حاوی هورمون کنتین، (b) باززایی ریز نمونه‌ی ساقه‌چه در محیط کشت حاوی هورمون کنتین.



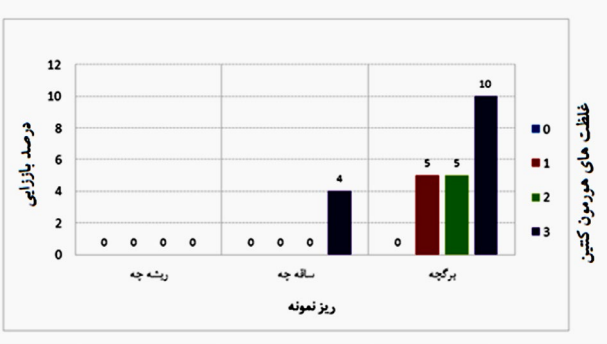
نمودار ۱- درصد باززایی سه ریزنمونه‌ی برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه گیاه مورد با چهار سطح هورمون ترکیبی BAP+TDZ



نمودار ۲– درصد باززایی ریزنمونه‌های برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه گیاه مورد با هورمون BAP



نمودار ۳– درصد باززایی ریزنمونه‌های برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه گیاه مورد با هورمون TDZ



نمودار ٤– درصد باززایی ریزنمونه‌های برگچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه مختلف گیاه مورد با هورمون کنتین

بر اساس نتایج این پژوهش هورمون کنتین کم اثرترین هورمون در جهت باززایی این گیاه بوده و هورمون TDZ تاثیری بیشتر از دو هورمون کنتین و BAP داشته است. همان‌طور که قبلا نیز بیان شد ترکیب دو هورمون ۱/۵میلی گرم TDZ +۱/ ۵میلی گرم BAP (۳ میلی گرم بر لیتر BAP+TDZ) بالاترین درصد باززایی را در برداشته است. از طرفی ریزنمونه‌ی برگچه بالاترین موفقیت را در زمینه‌ی باززایی نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشته است.

بحث

هدف از این پژوهش استفاده از هورمون‌های مهم باززایی، کنتین، BAP، TDZو BAP+TDZ بود. همان طور که مشاهده شد استفاده از هورمون کنتین تاثیر زیادی بر باززایی ریزنمونه‌های گیاه دارویی مورد نداشت و فقط در غلظت ۳ میلی گرم بر لیتر از این هورمون باعث باززایی در ریزنمونه‌ی برگچه شد. هورمون BAP در مقایسه با هورمون کنتین تاثیر زیادی بر روی باززایی ریزنمونه‌ها داشت. در این هورمون ریزنمونه‌ی برگچه بیشترین درصد باززایی و ریزنمونه‌ی ریشه‌چه کمترین درصد باززایی را به خود اختصاص دادند. باززایی گیاه مورد در محیط کشت حاوی هورمون TDZ به مراتب بیشتر از سایر هورمون‌های استفاده شده بود، به طوری که درصد باززایی ریزنمونه‌ی برگچه در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون TDZ برابر ۸۰ درصد می‌باشد. ترکیب دو هورمون BAP و TDZ تاثیراتی به مراتب بیشتر از حالتی که دو هورمون به صورت مجزا استفاده می‌شوند داشت. استفاده‌ی همزمان از این دو هورمون موجب افزایش فرآیند باززایی شد. به طوری که باززایی ریزنمونه‌ی برگچه به میزان ۹۰ درصد در سطح ۳ میلی گرم بر لیتر (۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP +۱/۵ میلی گرم بر لیتر TDZ) افزایش یافته است. همین طور می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت هورمون‌های استفاده شده به صورت ترکیبی و یا به صورت جداگانه تاثیر بیشتریبر میزان باززایی گیاه مورد مشاهده می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ریزنمونه برگچه و همچنین استفاده از هر دو هورمون TDZ و BAP به صورت ترکیبی موجب باززایی چشمگیر در گیاه مورد می‌شود.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زنجان کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

مراجع

Aleksic, V. and Knezevic, P. 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of myrtus communis l. Microbiological Research, 169(4): 240-254.

Atik, H., Bülbül, T., Özdemir, V., Avci, G. and Bülbül, A. 2020. Effect of myrtle) myrtus communis l.) essential oil on oxidant–antioxidant balance in rats with propylthiouracil-induced hypothyroidism. Journal of Food Biochemistry: e13498.

Bonjar, G.S. 2004. Antibacterial screening of plants used in iranian folkloric medicine. Fitoterapia, 75(2): 231-235.

Dejam, M. and Farahmand, Y. 2017. Essential oil content and composition of myrtle (myrtus communis l.) leaves from south of iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 20(3): 869-872.

EL-Zefzafy, M.M., Dawoud, G.T. and Hegazy, E.A. 2011. Biotechnological and phytochemical studies on myrtus communis l. Including determination of essential oil content and antioxidant activity. J. Drug Res. Egypt, 31(1): 23-32.

Haque, S.M. and Ghosh, B. 2013. High frequency microcloning of aloe vera and their true-to-type conformity by molecular cytogenetic assessment of two years old field growing regenerated plants. Botanical Studies, 54(1): 46.

Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. 2004 .Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (tunisian) myrtus communis. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 564(1): 89-95.

Mitrushi, I. 1955. Drurët e shkurret e shqipërisë.

Nobre, J. 1994. In vitro shoot proliferation of myrtus communis l. From field-grown plants. Scientia horticulturae, 58(3): 253-258.

Ogur, R. 1994. A review about myrtle (myrtus communis l.). Çevre Dergisi, 10: 21-25.

Scarpa, G.M., Milia, M. and Satta, M. 2000. The influence of growth regulators on proliferation and rooting of in vitro propagated myrtle. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62(3): 175-179.

Taylor, R. 1996. Lemon myrtle, the essential oil. Rural Res, 172: 18-19.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 2, 2020 Pages 1-5

Research Article

A regeneration induction in different explants of medicinal herb *Myrtus communis* L.

Nazila Bagheri[1], Bahram Maleki zanjani[2] and Ali Ammarellou[3,*]

[1] MSc in Biotechnology, Zanjan University, Zanjan, Iran

[2] Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Medicinal Plants Research Institute, Zanjan University, Zanjan, Iran

*Correspondence to Ali Ammarellou, Ph.D., ammarellou@yahoo.com

Received 6th April 2020 Revised 15th July 2020 Accepted 14th September 2020

Abstract

Introduction and Aim: *Myrtus communis* L. is a perennial and aromatic herb with numerous medicinal properties. *Myrtus communis* L is a medicinal plant that is used in traditional medicine in many parts of the world. Propagation of this plant with cuttings or seeding is associated with particular difficulties. The long seed dormancy period and the production of small and weak seedlings are the disadvantages of seed propagation. The optimization of *in vitro* tissue culture to facilitate the extraction of the component of this plant is important. Consequently, this study aimed to investigate the callus induction rate and callus initiation of *Myrtus communis* L. in different hormones.

Methods: This experiment required a large number of germinated seeds of *Myrtus communis* L. in a Murashic-Scug (MS) medium. The seeds began to germinate after 20 days. Then, germinated seeds were divided into three studied explants: shoot explants, root explants, and leaf explants in MS medium containing 2,4-D. After 7 days, the callus production was recognized. The explants then were used to evaluate the regeneration rate of *Myrtus communis* L. in the MS medium containing growth regulators kinetin, BAP, TDZ, and combining the two hormones (BAP+TDZ) at four levels (0-1-2-3) mgl^{-1}.

Results: The results of this study showed the highest callus regeneration rate and callus growth rate were obtained from the leaf explants. Kentin hormone was the least effective hormone for regeneration of *Myrtus communis* L. and TDZ hormone had a greater effect than Kentin and BAP hormones. Additionally, the combination of 1.5 mgl^{-1} BAP with 1.5 mgl^{-1} TDZ, produced the highest callus regeneration in leaf explants.

Conclusion: From the results of this study, it can be concluded that the regeneration of *Myrtus communis* L. is feasible through the application of leaf explants and a combination of BAP+TDZ hormones.

***Keywords*:** Regeneration, Tissue culture, Callus regeneration, Medical herb, *Myrtus communis* L.