جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ریزازدیادی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

Micropropagation of lemon balm

محمدصادق عربزادگان[1] ، مریم تقی زاده[2]، فاطمه تقی زاده[3]

چکیده

بادرنجبویه *Melissa officinalis* L. ازگیاهان معطری است که مردم بعضی سرزمینها از مدتها پیش خواص دارویی آن را می دانستند و برای درمان برخی بیماریها از آن استفاده می کردند. ازآنجاییکه در سالهای اخیر علاقه زیادی به مواد طبیعی معطوف شده و اکثر داروهای رایج مورد استفاده از منابع طبیعی استخراج می گردد و کمپانی های دارو سازی عمدتا" به مواد تولید شده از گیاهان وابسته اند کشت بافت گیاهی روش دیگری برای تکثیر تجاری گیاهان دارویی است و بطور وسیعی مورد استفاده واقع می شود. این پژوهش راهکار مناسبی برای تکثیر درون شیشه ای بادرنجبویه است که در آن با استفاده از ریزنمونه های شاخساره بطول 10 میلی متر و دیسک های پهنک برگ به قطر 10 میلی متر در شرایط گندزدایی شده انجام شد. از تنظیم کننده های رشد (بنزیل آدنین، بنزیل آمینوپورین، کینتین، ایندول بوتریک اسید، نفتالین استیک اسید، ایندول استیک اسید)در محیط کشت پایه موراشیگی و اسکوگ (M.S) که به آن 3٪ سوکروز و 8 گرم درلیتر آگار افزوده شده بود کشت شدند. ترکیب 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA ، 1/5 میلی گرم در لیترBAP و 0/01 میلی گرم در لیتر IAA ، 1 میلی‌گرم در لیتر BA برای پرآوری شاخساره هر دو ریزنمونه مناسب ترین تیمار بودند. نتایج حاصل نشان داد که ریز نمونه های پهنک برگ نسبت به ریز نمونه های شاخساره واکنش بهتری در محیط درون شیشه ای نشان می دهند. ترکیب 0/01 میلی گرم در لیتر Kin ، 0/5 میلی گرم در لیتر IBA و 1 میلی‌گرم در لیتر NAA ، برای ریشه زایی طول ریشه و وزن تر ریشه مناسب ترین بودند. گیاهچه ها پس از سازگاری به محیط بیرون انتقال داده شدند.

کلمات کلیدی: بادرنجبویه ، ریزازدیادی ، تنظیم کننده های رشد ، شاخساره ، پهنک برگ.

[1] – مدرس دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت
[2] – کارشناس ارشد زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
[3] – مربی کشاورزی مرکز آموزش فنی وحرفه ای جهرم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

بادرنجبویه گیاهی معطر وداروی با نام علمی *Melissa officinalis* L. ونام انگلیسی Lemon-balm ازتیره Lamiaceae می باشد (12،1،2،4،5). این گیاه به صورت علفی ، پایا ، ساقه راست ، بندرت خوابیده ، به ارتفاع 30 تا 120سانتیمتر، برگها پهن تا لوزی ویا بیضوی شکل، برگها متقابل، برنگ سبز تیره سطح آن ناصاف با برجستگیهای متعدد، گل‌ها درزاویه برگها تشکیل می شوند. رویش این گیاه از طریق بذر به کندی صورت می گیرد. این گیاه درطول رویش به هوای گرم و نور کافی نیاز دارد. خاکهای غنی از ترکیبات کلسیم دار برای رویش این گیاه بسیار مناسب است. (4،3،2،1). منشاء این گیاه شرق وجنوب اروپا گزارش شده و درایران در شمال (جنگل گلستان، گنبدکاووس، طالش) در آزربایجان(حسن بگلو) در غرب وتهران نیز می روید (2 ،5). اسانس این گیاه خاصیت تسکین دهندگی، ضد ویروس وباکتری می باشد (8 ،2). همچنین برای درمان نارحتیهای عصبی ، مداوای بیماریهای معدی وقلبی وروده ای که منشا عصبی دارندمورد استفاده قرارمی گیرد (2،5). اسانس بادرنجبویه دارای ترکیبات با ارزش از جمله سیترال ، سیترونلال ، ژرانیول ، لینالول ، استات اوگنول ، اسیدرزماری و اسیدکافییک می باشد (10، 9 ، 5 ، 2 ، 1). بررسی های مرجع شناسی گسترده ای که برای تدوین این پژوهش انجام شد نشان داد که تاکنون پژوهشی در زمینه کشت درون شیشه ای این گیاه با ارزش در ایران انجام نگرفته و یا گزارش نگردیده. مجد و ایرانبخش نشان دادند که با تغییر ترکیبات محیط کشت ، مقدار ونوع هورمونها وحتی تغییرشرایط فیزیکی (نور تاریکی و دما) می توان تولید متا بولیت های ثانویه را درنمونه های حاصل از کشت درشیشه افزایش داد(7). همچنین دیباه در بررسی کشت درون شیشه ای گزنه دوپایه با تغییر هورمون های گیاهی در محیط کشت M.S بهترین اندام زایی را بوجود آورده است (3). سیلوا توانست با تغییر نوع هورمون های گیاهی مقدار روغن فرار را در بادرنجبویه تغییر دهد (13). تاورز در کشت درون شیشه ای بادرنجبویه موفق به پراوری شاخساره از ساقه های جانبی با استفاده از تنظیم کننده های رشد شد (14). هورمونهای IBA ، TDZ و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

BAP پرآوری شاخساره و ریشه‌زایی شاخساره های تولید شده را در شرایط کشت درون شیشه‌ای تحریک می کنند (14،9). با توجه به عدم گزارشی از ایران در مورد کشت درون شیشه ای بادرنجبویه و نیاز مبرم به ترکیبات دارویی وارزشمند موجود در اسانس این گیاه همچون سیترال، سیترونلال ، ژرانیول و افزایش تولید متابولیت های ثانویه در نمونه های حاصل از کشت درون شیشه ای (کالوسها یا گیاهچه ها) ، کشت درون شیشه ای گیاه بادرنجبویه ، بهینه سازی شرایط آن و بررسی مقایسه ای بین گیاهان طبیعی ونمونه های حاصل از کشت درون شیشه ای از دیدگا ههای مختلف ، از اهداف پژوهش حاضر می باشند.

مواد و روش ها

گیاهان دو ساله بادرنجبویه از کلکسیون گیاهان دارویی خانم حسن زاده تهیه و در گلخانه بخش باغبانی در گلدان کشت شدند. مخلوط خاکی یک سوم خاک رس، یک سوم ماسه و یک سوم کود حیوانی پوسیده برای این منظور به کار گرفته شد. دمای گلخانه27 ± 3درجه سانتی‌گراد با میانگین رطوبت نسبی 70 ± 5٪ تنظیم شد. پس از چهار هفته، گیاهچه ها شروع به تولید برگ وشاخه های جدید کردند که ساقه وبرگهای جوان حاصل از آنها برای تهیه ریزنمونه های مورد استفاده به آزمایشگاه کشت بافت منتقل شدند. محیط کشت پایه M.S (11) با 8 گرم در لیتر آگار و3درصد سوکروز و هیپوکلریت سدیم (0/8 درصد وزن به حجم) مورد استفاده قرار گرفت. براساس آزمایش ها ، غلظت های 0/5، 1 و 1/5 میلی گرم در لیتر BA، 0/01 و 0/1 میلی گرم در لیترIAA ، 0/5، 1، 1/5 و 2 میلی گرم در لیتر BAP ، 0/1 و 0/5 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 8 گرم در لیتر آگار برای آزمایش های اصلی شاخه زایی انتخاب شدند. پژوهش های ریشه زایی پس از آزمایش های مقدماتی انجام شد. غلظت های 1/5، 1 و 0/5 میلی گرم در لیتر IBA ، 1، 0/5 و 0/1 میلی گرم در لیتر NAA ، 0/01 میلی‌گرم در لیترKin انتخاب شدند. پس از افزودن تمام مواد به جز آگار، حجم محلول با آب مقطر به میزان مورد نیاز رسانده شد و pH محلول روی 5/7 تا 5/8 تنظیم و سپس آگار اضافه شد و به اتوکلاو انتقال داده شدند. ظروف حاوی محیط کشت،

گلدان‌های حاوی ورمی کولایت برای سازگاری نمونه ها به مدت 20 دقیقه در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار بخار 1/5 کیلوگرم بر سانتیمتر مربع گندزدایی شدند. تمام ادوات شامل پنس ها ، چاقوی آزمایشگاه و کاشی سرامیک درون ورقه های آلومینیومی پیچیده و سپس همراه چند عدد بشر برای آبکشی نمونه ها و بطری های حاوی آب مقطر در اتوکلاو به مدت 30 دقیقه با دمای 121 درجه سانتی گراد و فشار بخار 1/5 کیلوگرم بر سانتیمتر مربع گندزدایی شدند. نمونه‌های گرفته شده از گیاهچه های درون گلخانه درون یک بشر یک لیتری به همراه چند قطره مایع ظرفشویی به مدت نیم ساعت زیر آب جاری شستشو داده شدند و سپس چند بار دیگر در همان آب بدون اضافه کردن مایع ظرفشویی آبکشی شدند. پس از نیم ساعت شستشو، غوطه ور کردن نمونه ها در الکل اتیلیک 70٪ حجمی به مدت 1 دقیقه و پس از آن در محلول کلراکس (0/8 درصد وزن به حجم) به مدت 20 دقیقه نمونه ها به طور کامل گندزدایی سطحی شدند و هیچ گونه آلودگی درونی نیز مشاهده نشد. پس از گندزدایی سطحی و سه بار آبکشی با آب مقطر سترون شده ، نمونه ها با یک پنس گندزدایی شده روی کاشی سرامیک از پیش گندزدایی شده منتقل شدند. با استفاده از چاقوی آزمایشگاه ریزنمونه های شاخساره به طول 10میلی متربرای پرآوری تقسیم شدند.کالوس های تولید شده از کشت دیسک های برگ به قطر10میلی متر پس از 3 هفته روی بهترین محیط شاخه‌زایی زیرکشت شده و شاخساره های حاصله به همین ترتیب تا 4 زیرکشت برای ارزیابی قدرت شاخه زایی افزونه ها استفاده و نتایج پس از 8 هفته آنالیز شدند. برای ریشه زایی شاخساره های به دست آمده محیط کشت های یاد شده برای ریشه‌زایی در ریزنمونه ها پس از یک هفته در محیط حاوی تنظیم کننده های رشد گیاهی ریشه زایی به محیط های بدون این مواد منتقل شدند تا در صورت تشکیل سرآغازه های ریشه ، طویل شدن ریشه ها در این محیط ها صورت گیرد و پس از 3 هفته شاخساره های ریشه دار شده و بدون ریشه در ورمی کولایت گندزدایی شده در معرض نور با شدت 2000 لوکس قرار گرفتند. برای سازگاری گیاهچه های ریشه دار شده به گلدان های حاوی مخلوط های خاکی گندزدایی شده ، شامل ورمی‌کولایت ، ماسه ،

ماده آلی به نسبت حجمی مساوی یک سوم تحت شرایط رطوبت بالای 70٪ منتقل شدند. آبیاری گلدان‌ها به ترتیب با استفاده از آب معمولی به همراه نمک‌های M.S با غلظت یک هشتم به مدت یک هفته انجام شد. تمامی محلول‌های مورد استفاده در آبیاری حاوی 0/01 درصد قارچکش سیستمیک بنومیل بودند. به مرور درصد رطوبت را کم کرده و گیاهان با شرایط محیط بیرون سازگار و پس از 2 هفته به گلخانه منتقل شدند. پس از 6 هفته، میانگین های وزن تازه برگ، ریشه ، میانگین تعداد کل برگ و تعداد شاخساره یاد داشت شدند. تمامی آزمایش ها به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی برای شاخه زایی با 6 تکرار و هر تکرار با 4 ریزنمونه و ریشه زایی با 6 تکرار انجام گرفت. تمامی داده ها به صورت آماری تجزیه و مقایسه میانگین ها براساس آزمون چند دامنه ای جدید دانکن در سطح 1٪ توسط نرم افزار MSTATC انجام گرفت.

نتایج

شاخه زایی

پرآوری شاخساره بین دو ریزنمونه شاخساره ودیسک های برگ در مرحله استقرار در سطح احتمال 1٪ دارای اختلاف معنی‌داری نمی باشد. محیط کشت حاوی BA با غلظت 0/5، 1، 1/5 میلی گرم در لیتروIAA با غلظت 0/01 و 0/1 میلی گرم در لیتر در سطح احتمال 1٪ برای میانگین تعداد برگ و تعداد شاخساره دارای اختلاف معنی داری نبود. برهمکنش ریزنمونه و تنظیم کننده های رشد گیاهی طول شاخساره های تولید شده در سطح احتمال 1٪ معنی دار شد. اختلاف معنی داری در سطح احتمال 1٪ در میانگین وزن‌تر برگ در هر شاخساره بین ریزنمونه تک گره و نوک شاخساره مشاهده شد. محیط کشت حاوی BA با غلظت 1/5 میلی گرم در لیتروIAA 0/01 میلی گرم در لیتر به طور معنی داری در سطح احتمال 1٪ نسبت به سایر تیمارها دارای وزن تر برگ بیشتری بود و نسبت به تیمارحاوی 0/5 میلی گرم در لیتر BA ، 0/1 میلی گرم در لیتر IAA باعث افزایش وزن بیشتری شد. همچنین اختلاف معنی داری در سطح احتمال 1٪ در میانگین وزن تر ریشه در بین ریزنمونه ها مشاهده شد به طوری که در محیط‌های کشت حاوی BA با غلظت 1

میلی گرم در لیتر، IAA 0/01 میلی گرم در لیتر وزن تر ریشه بیشتری مشاهده شد. میانگین‌های تعداد برگ و تعداد شاخساره در سطح احتمال 1٪ معنـی دار نشـد. در پـژوهش دیگـری بیشـترین تعداد شاخساره در غلظت 0/1 میلی‌گرم در لیتر NAA و 1/5 میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد ، ولی در مجموع غلظت های 0/5، 1، 1/5 و 2 میلی گرم در لیترBAP به همراه 0/1 و 0/5 میلـی گرم در لیتر NAA تفاوت معنی داری در سطح 1٪ بین تعدا شاخساره های تولید شده دیده نشـد. همچنین ، بیشترین وزن تر برگ در تیمار حاوی 0/1 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 1/5 میلی گرم در لیترBAP حاصل شد و نسبت به سایر تیمارها در سـطح احتمـال 1٪ تفـاوت معنـی داری داشتند. مشاهده شد که تیمار حاوی 1/5 میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه 0/1 میلی گرم در لیتر NAA وزن تر ریشه بیشتری در سطح احتمال 1٪ نسبت به تیمار NAA بـا غلظـت 0/5 میلـی گرم در لیتر وBAP با غلظت 1 میلی گرم در لیتر داشت.

ریشه زایی

در این آزمایش مشاهده شد که درصد ریشه زایی در تیمار حاوی 1 میلی گرم در لیترNAA 0/01 میلی گرم در لیتر IBA به همراه 0/01میلی گرم در لیترKin دارای بیشـترین مقـدار مـی باشـد. طول ریشه های تولید شده دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1٪ بود و مشاهده شـد کـه طول ریشه ها در محیط کشت حاوی 1 میلی گرم در لیترNAA و 0/01 میلی‌گرم در لیتـر IBA به همراه 0/01 میلی گرم در لیتر Kin نسـبت بـه سـایر تیمارهـا دارای طـول ریشـه بیشـتر بـود. همچنین مشاهده شد که تیمار حاوی 1 میلی‌گرم در لیتر NAA و 0/01 میلی گرم در لیتر IBA به همراه 0/01 میلی گرم در لیتر Kin دارای وزن تر ریشه بیشتری در سطح احتمال 1٪ نسبت به تیمار NAA با 0/1 میلی گرم در لیتر وIBA با0/5 میلی گرم در لیتر همـراه بـا Kinبـا غلظـت 0/01 میلی گرم در لیتر می باشد. داده ها نشان دادند که تیمارNAA با غلظـت 1 میلـی گـرم در لیتر وIBA با غلظت 5/ 1میلی گرم در لیتر به همراه Kin بـا غلظـت 0/01 میلـی گـرم در لیتـر

دارای وزن تر برگ بیشتری نسبت به تیمار NAA با 0/1 میلی گرم در لیتر ، IBA با 0/5 میلی گرم در لیتر به همراهKin با 0/01 میلی گرم در لیتر می باشد.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که BA با غلظت 0/5 تا 1/5 میلی گرم در لیتر، IAA با غلظت 0/01 و 0/1 میلی گرم در لیتر برای میانگین تعداد برگ و تعداد شاخساره اختلاف معنی داری مشاهده نشد ولی برای وزن تر برگ و وزن تر ریشه اختلاف معنی‌دار مشاهده گردیده که با پژوهش های انجام گرفته (5،6،12) در مورد بادرنجبویه توسط تاورز در تناقض است. همچنین از تنظیم کننده های NAA وBAP نیز جهت آزمایش استفاده گردید و نشان داده شد که غلظت های NAA وBAP به کار رفته در آزمایش تفاوت معنی داری برای تعداد شاخساره نشان ندادند که با نتایج به دست آمده از گزارش های پیشین (5،14،11) مطابقت دارد. بیشترین وزن تر برگ در محیط حاوی NAA با 0/1 میلی گرم در لیتر و BAP با 1/5 میلی گرم در لیتر به دست آمد که با نتایج گزارشات پیشین (14،11،8) مطابقت دارد. در این پژوهش وزن تر ریشه نیز اندازه گیری شد و مشاهده شد که محیط حاوی NAA با 0/1 میلی گرم در لیتر،BAP با 1/5 میلی گرم در لیتر بیشترین وزن تر ریشه نشان داد که با نتایج گزارشات پیشین (5،14) مطابقت دارد. بیشترین وزن تر برگ، وزن تر ریشه، طول ریشه و درصد ریشه زایی در محیط حاوی IBA با 0/5 میلی گرم در لیتر، NAA با 1 میلی گرم در لیتر همراه با Kin با 0/01 میلی گرم در لیتر تشکیل شد که با نتایج به دست آمده از گزارشات پیشین (15،10،6) مطابقت دارد. ولی در نوع اکسین و سایتوکینین تناقض دارد (12،6،15).

منابع:

1- اصغریان ، ب. 1374. بررسی گیاه شناسی و فیتوشیمیایی گیاه بادرنجبویه (پایان نامه دکترای داروسازی) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

2- امیدبیگی ، ر. 1383. تولید و فراوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی (به نشر). جلد سوم. 397 صفحه.

3- دیباه ، مجد.1385. بهینه سازی شرایط کشت در شیشه گیاه گزنه دوپایه. فصلنامه زیست شناسی دانشگاه آزاداسلامی واحد گرمسار. جلد اوا. صفحه 20-13.

4- قهرمان ، ا. 1365. فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع. جلد نهم. 1064 صفحه.

5- کمیته تدوین فارما کوپه گیاهی ایران. 1381. فارما کوپه گیاهی ایران. انتشارات وزارت بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی. 795 صفحه.

6- گل پرور ، ا. 1385. کاربرد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی در اصلاح گیاهان دارویی. مجموعه مقا لات اولین همایش منطقه ای گیاهان دارویی ، ادویه ای و معطر. دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد. 312 صفحه.

7- مجد ، ایرانبخش. 1373. ساختمان و فراساختمان سلول های بیوسنتزکننده آتروپین درگیاه شابیزک واثر برخی عوامل محیطی بر میزان آتروپین دراین گیاه (پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاداسلامی واحد تهران شمال).

8- Alicia, c. 2004. HPLC analysis of phenolic acids in *Melissa officinalis* L. Journal of liquid chromatography & Related Technologies. Vol. 24: 2647- 2659.

9- Annamaria, Me. And Andrea,B. 2004. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. Plant cell, Tissue and organ culture. Vol. 57:199.

10- Carnat, A. P. 1998. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm tea. Pharmaceutica Acta Helvetiae. Vol. 72:301-305.

11- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Arrevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant physiol. 15:473-479.

12- Rechinger, K. H. Lemon balm in: Rechinger, K. H.(ed). Flora Iranica. Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstalt.vol. 150:494-495.

13- Silva, S. 2005. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *In vitro* produced under the influence of growth regulators. Journal of the Braz. Chem. Soc. Vol. 16 no. 6b.

14- Tavares, A.C.and Goncalves, M.T.1996. Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoot. Plant cell Rep. 15:441-444.