بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه علوم باغبانی
پایان‌نامه کارشناسی ارشد

اثر تیمارهای هورمونی و الیسیتورها بر کشت سوسپانسیون گیاه دارویی *Menthea arvensis*

سارا قزلباش

اساتید راهنما

دکتر حجت‌اله بداقی
دکتر اردشیر قادری

اساتید مشاور

دکتر زیبا قسیمی حق
مهندس امیر رضا زارع

بهمن ماه ۱۳۹۴

تقدیم به

همسرم به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامتی و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

مقدس‌ترین واژه‌ها در لغت نامه دلم، مادر و پدر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت آنان می‌دانم

تقدیر و تشکر

در ابتدا یزدان هستی بخش را شکرگزارم که باری دگر لطف و مهربانیش را شامل حال من نمود و این توانایی را در من ایجاد کرد تا این پژوهش را با موفقیت به پایان برسانم.

برخود لازم می‌دانم از تمامی عزیزانی که به خوبی درانجام این مهم حقیر را یاری نموده اند صمیمانه سپاس گزاری نمایم.

از استاد راهنمای عزیزم جناب آقای دکتر حجت اله بداقی که نه تنها از نظر علمی بلکه از لحاظ اخلاقی نیز برای من الگو بودند بسیار سپاس گزارم. با تشکر و قدردانی از استاد راهنما و فرهیخته جناب آقای دکتر اردشیر قادری که زحمات و تلاش فراوان در انجام این پایان‌نامه داشتند.

از سرکار خانم دکتر زیبا قسیمی حق که درتمام مراحل این تحقیق مشاوره این پایان نامه را برعهده داشتند کمال تشکر را دارم. با قدردانی و سپاس فراوان از استاد صبور و بزرگوار جناب آقای مهندس امیر رضا زارع کاریزی استاد مشاور که با زحمات و راهنمایی‌های بی‌دریغ و خالصانشان در طی انجام این پژوهش همواره یاری رسان من بودند. از اساتید گرامی جناب آقی دکتر مهدی رضایی و جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک بابت داوری این پژوهش در طول دوران تحصیل سپاس گزارم. از استاد محترم سرکار خانم دکتر نرگس خان پور اردستانی از راهنمایی‌های ارزنده ایشان بی‌نهایت سپاس گزارم .

از همکاری صمیمانه تمامی اعضای دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود به خصوص گروه علوم باغبانی بسیار سپاس گزارم. از کلیه مسئولین و کادر آزمایشگاه بیوتکنولوژی مجموعه گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج بخصوص خانم لاله پورپیکری و خانم خدیجه سمیعی بخاطر حضور امید بخششان، نهایت تشکر را دارم. از دوستان عزیزم مطهره السادات چهل ستونی، نجمه السادات حسینی و عزت نخعی، که در تمام این دوره همراه و همکار بنده بودند کمال تشکر را دارم.

و از تمامی کسانی که به نوعی در این پژوهش همراه من بودند سپاس گزارم و از خداوند سلامتی و موفقیت این عزیزان را خواستارم. امیدوارم بتوانم گوشه‌ای از دریای پرمهرشان را جبران نمایم.

تعهد نامه

اینجانب سارا قزلباش دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه اثر تیمارهای هورمونی و الیسیتورها بر کشت سوسپانسیون گیاه دارویی*Menthea arvensis* تحت راهنمایی دکتر حجت اله بداقی و دکتر اردشیر قادری متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

گیاه نعناع با نام علمی *Mentha arvensis* L یکی از گیاهان دارویی با اهمیت از خانواده Lamiaceae می‌باشد. اندام‌های هوایی این گیاه حاوی تعداد زیادی از ترکیبات آروماتیک بوده که در صنایع غذایی، عطر سازی و داروسازی استفاده می‌شود. با توجه به ارزش تجاری بالای این گیاه، تولید در مقیاس بزرگ از اسانس منتول هدف مناسبی در سال‌های اخیر است. این پژوهش در دو فاز اجرا شد، در فاز اول پس از دست‌یابی به ریزنمونه استریل، ریزنمونه‌های برگ در محیط MS همراه با غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D یا NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BAP یا KIN به منظور کالزایی کشت گردید. جهت تعیین بهترین محیط کشت برای فاز سوسپانسیون سلولی، دو ریز نمونه‌ی برگی و کالوس به محیط کشت‌های، N6(chau)، (Eriksson) ER، WPM (wody plant medium)،MS و B5 (Gamborg) حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کشت گردید. پس از دست‌یابی به محیط کشت مناسب، جهت بررسی تغییرات بیوسنتز ترکیبات فنلی، ریزنمونه‌های کالوس در محیط MS وB5 با 2,4-D در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه غلظت‌های مختلف زغال فعال، اسید سیتریک، اسیدآسکوربیک، زردچوبه و پلی ونیل پیرولیدون کشت شدند. در فاز دوم کالوس‌ها به محیط کشت سوسپانسیون شامل محیط کشت MS و B5 به همراه هورمون 2,4-D در غلظت‌های مختلف و مقدار ۳۰ و۶۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شد. پس از تکثیر سلول‌ها و رسیدن به فاز رشد مطلوب تمام سوسپانسیون‌ها با الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و کیتوزان تیمار شدند. نتایج آزمایش نشان داد که محیط کشت $MS_{1/2}$ همراه با ۲ گرم در لیتر زغال فعال بیشترین تاثیر را بر تعداد و قطر (۱۲/۶) ساقه‌ها (۰/۰۳۵ میلی‌متر) داشت. بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس (۱۲/۳ و ۱/۸۸ گرم) در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. در مقایسه بین محیط کشت‌های مختلف بیشترین وزن خشک (۰/۶ گرم) در محیط کشت B5 مشاهده گردید. بیشترین میزان فنل در محیط‌کشت (۱۲۷µg/ml) و کمترین میزان فنل در کالوس‌ها (۷۲/۹µg /ml) در محیط حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر زردچوبه مشاهده شد. در فاز سوسپانسیون بیشترین وزن خشک سلول در محیط B5 حاوی ۳۰ و۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. همچنین هورمون 2,4-D در غلظت ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش وزن خشک گردید. بیشترین رشد سلول در روز ۱۶ شاخص رشد (۰/۲۵ گرم وزن خشک) و

بیشترین تعداد سلول نیز در همان روز (۷۳۵۰۰۰۰) در محیط B5 حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکاروز مشاهده شد. طبق نتایج بدست آمده از آنالیز GC/Mass ترکیبات مهمی مثل منتول به میزان ۸/۹۶ درصد، لیمونن، تیمول، ، منتون و کارواکرول مشاهده شد. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند به عنوان جایگزینی سودمند در راستای تولید متابولیت‌های ثانویه با روش‌های مختلف زیست‌فناوری از جمله کشت سلولی استفاده گردد.

کلمات کلیدی: *Mentha arvensis* L.، سوسپانسیون سلولی،کالزایی، منتول،فنل

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده
فصل اول ۱
۱-گیاهان دارویی ۲
۱-۱-تعریف واهمیت گیاهان دارویی ۲
۱-۲- فناوری زیستی ۳
۱-۳-اهمیت متابولیت‌های ثانویه ۳
۱-۴- کشت بافت ۴
۱-۵-کشت کالوس یا توده‌های سلولی تمایز نیافته ۴
۱-۶-باززایی در شرایط درون شیشه‌ای ۴
۱-۷-کشت سوسپانسیون سلولی ۵
۱-۷-۱- مراحل چرخه رشد سوسپانسیون سلولی ۶
۱-۸- تنظیم‌کننده‌های رشد ۶
۱-۹- الیسیتور ۷
۱-۱۰-مراحل بیو سنتز منتول ۸
۱-۱۱- گیاه‌شناسی ۱۰
۱-۱۱-۱-اسامی متداول ۱۰
۱-۱۱-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی ۱۰
۱-۱۱-۳- پراکنش جغرافیایی و نیازهای اکولوژی ۱۱
۱-۱۱-۴- خصوصیات درمانی ۱۲
۱-۱۱-۵- ویژگی اسانس ۱۳
۱-۱۱-۶- ترکیبات اسانس ۱۴
۱-۱۱- ۷-اهمیت اقتصادی منتول ۱۴
۱-۱۲- لزوم تحقیق ۱۵
۱-۱۳- اهداف مشخص تحقیق ۱۶
۱-۱۴- سؤالات تحقیق ۱۷
۱-۱۵ - فرضیه‌های تحقیق ۱۷
فصل دوم ۱۹
۲- بررسی منابع و تحقیقات انجام شده در موضوع ۲۰
فصل سوم ۲۵
۳-۱- تهیه ریزنمونه استریل ۲۶
۳-۲- سترون کردن ظروف، ادوات آزمایشگاهی و لامینار ایرفلو ۲۷
۳-۳- محیط کشت ۲۷

-۳-۱- روش تهیه محیط کشت..... ۲۷
۳-۳-۱-۱- تهیه محلول‌های ذخیره..... ۲۷
۳-۳-۱-۲- محلول ذخیره عناصرپرمصرف ۲۸
۳-۳-۱-۳- محلول ذخیره عناصرکم‌مصرف ۲۸
۳-۳-۱-۴- محلول ذخیره آهن..... ۲۸
۳-۳-۱-۵- محلول ذخیره ویتامین‌ها..... ۲۸
۳-۳-۱-۶- محلول ذخیره تنظیم کننده‌های رشد..... ۲۹
۳-۴-ریز ازدیادی..... ۲۹
۳-۴-۱-صفات اندازه‌گیری در ریزازدیادی..... ۳۰
۳-۵- شرایط کشت..... ۳۰
۳-۶- فاز کالزایی..... ۳۱
۳-۶-۱-صفات اندازه گیری شده در فاز کالزایی..... ۳۱
۳-۶-۱-۱- درصد کالزایی..... ۳۱
۳-۶-۱-۲ -اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس در محیط جامد..... ۳۲
۳-۷-بررسی محیط کشت‌های مختلف..... ۳۴
۳-۷-۱- صفات مورد اندازه‌گیری..... ۳۴
۳-۷-۱-۱- درصد کالزایی..... ۳۴
۳-۷-۱-۲-اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس‌ها در محیط‌های مورد نظر..... ۳۴
۳-۸- اثر ترکیبات مختلف آنتی اکسیدانی در کنترل میزان فنول کالوس‌ها..... ۳۵
۳-۸-۱-اندازه‌گیری میزان فنول تولید شده در محیط کشت وکالوس‌ها..... ۳۶
۳-۹- فاز دوم کشت سوسپانسیون..... ۳۷
۳-۹-۱-تهیه محیط کشت..... ۳۷
۳-۹-۲- انتقال کالوس‌ها به محیط کشت سوسپانسیون..... ۳۷
۳-۹-۳-نگه‌داری و بهینه سازی شرایط کشت سوسپانسیون..... ۳۸
۳-۹-۴-اندازه‌گیری وزن خشک سوسپانسیون سلولی..... ۳۸
۳-۹-۵-اندازه‌گیری سرعت رشد سلولی در محیط کشت سوسپانسیون..... ۳۹
۳-۹-۶- اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها..... ۴۰
۳-۹-۶-۱-نحوه کار با لام هموسایتومتر..... ۴۱
۳-۹-۷-الیسیتورها..... ۴۲
۳-۹-۷-۱-تهیه استوک متیل جاسمونات و کیتوزان..... ۴۲
۳-۹-۷-۲- استفاده از الیسیتورها در فاز سوسپانسیون سلولی..... ۴۲
۳-۹-۸- تهیه عصاره از سلول‌های تیمار شده..... ۴۳
۳-۹-۸-۱- استفاده از دستگاه ۴۳
۳-۱۰- آنالیز داده‌ها..... ۴۵
فصل چهارم..... ۴۷
۴-۱-بارزایی..... ۴۸

۴-۲ فاز اول کالزایی..... ۵۱
۴-۳ بررسی محیط‌های کشت..... ۵۶
۴-۴ اندازه گیری میزان فنل تولید شده..... ۵۹
۴-۵ فاز سوسپانسیون..... ۶۳
۴-۵-۱ اندازه‌گیری وزن خشک سلول درفاز سوسپانسون..... ۶۴
۴-۵-۲-شکل سلول‌ها..... ۶۸
۴-۵-۳ منحنی رشد سلول بر اساس وزن خشک..... ۷۰
۴-۵-۴ تعداد سلول‌ها ۷۱
۴-۵-۵- استفاده از الیسیتورها در محیط سوسپانسیون ۷۱
۴-۵-۶-نتیجه گیری کلی ۷۹
۴-۵-۷-پیشنهادات ۸۰
فهرست منابع ۸۱

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱-ساختار شیمیایی و کریستال های منتول ۸
شکل ۱-۲- مراحل بیو سنتز منتول ۹
شکل ۱-۳- تصویری از گل و برگ گیاه ۱۱
شکل۱-۴- اجزای گیاه ۱۱
شکل ۱-۵- طرح کلی کرک غده‌ای سپر مانند گیاه نعناع ۱۴
شکل ۳-۱- برگ و ساقه نعناع جمع‌آوری شده از مزرعه ۲۶
شکل ۳-۲- شمایی از دستگاه کولیس و گیاه‌چه‌های بازا شده ۲۹
شکل ۳-۳- کشت ریزنمونه‌های برگی در محیط کشتMS ۳۱
شکل ۳-۴- مراحل تشکیل کالوس از ریزنمونه برگی ۳۱
شکل۳-۵- کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی زغال فعال و زرد چوبه ۳۶
شکل۳-۶- ایجاد کمپلکس آبی رنگ ۳۷
شکل۳-۷ انتقال کالوس‌ها به محیط کشت مایع در فاز سوسپانسیون ۳۸
شکل ۳-۸- شمایی از الک‌های فلزی ۳۹
شکل ۳-۹-شمایی از اندازه‌گیری وزن خشک و محیط سوسپانسیون صاف شده، قیف بوخنر، کاغذ صافی واتمن ۴۰
شکل ۳-۱۰- سلول‌های کاملا رنگ شده ۴۱
شکل ۳-۱۱-شمایی کلی و سطح لام همو سایتومتر و شمارش سلول به وسیله لام ۴۲
شکل۴-۱-مقایسه میانگین اثر محیط کشت و زغال فعال بر تعداد ساقه ۴۹
شکل۴-۲-مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر قطر ساقه ۵۰
شکل ۴-۳- مقایسه میانگین اثر شدت نور در قطر ساقه ۵۱
شکل۴-۴-کالوس‌های بهینه تشکیل شده از برگ در محیط ۵۲
شکل۴-۵- تصویرکالوس‌های بهینه تشکیل شده از ریزنمونه برگ در محیط ۵۳
شکل۴-۶- ریزنمونه باززا شده به صورت مستقیم ۵۴
شکل۴-۷- ریزنمونه باززا شده به صورت مستقیم ۵۴
شکل۴-۸- ریزنمونه باززا شده به صورت مستقیم ۵۴
شکل ۴-۹- مقایسه میانگین اثر هورمونهای مختلف در درصد کالوس زایی گیاه ۵۵
شکل۴-۱۰- مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر وزن تر کالوس‌ها در گیاه ۵۵
شکل ۴-۱۱- مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر وزن خشک کالوس‌ها در گیاه ۵۶
شکل۴-۱۲- مقایسه میانگین درصد رشد کالزایی در محیط‌کشت‌های تعیین شده ۵۷
شکل۴-۱۳ مقایسه میانگین میزان وزن تر کالزایی در محیط‌کشت‌های تعیین شده ۵۸
شکل۴-۱۴- مقایسه میانگین میزان وزن تر کالزایی در محیط‌کشت‌های تعیین شده ۵۹
شکل۴-۱۶- کالوس رشد یافته در محیط کشت حاوی زرد چوبه، PVP و زغال فعال ۶۰
شکل۴-۱۷- مقایسه میانگین نوع محیط کشت در میزان فنل در کالوس ۶۲

شکل ۴- ۱۸-نمودار مقایسه میانگین اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در کنترل فنل در کالوس..... ۶۲
شکل ۴-۱۹- محیط سوسپانسیون به همراه کالوس‌ها ۶۴
شکل ۴-۲۰- کالوس‌های بازا شده در محیط سوسپانسیون ۶۶
شکل ۴-۲۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ساکاروز و هورمون 2,4-D در رشد سلولی در فاز سوسپانسیون..... ۶۶
شکل۴-۲۲- مقایسه میانگین اثر محیط‌کشت‌های MS و B5 در رشد سلول..... ۶۷
شکل۴-۲۳- مقایسه میانگین محیط کشت و ساکاروز بر رشد سلول..... ۶۷
شکل۴-۲۴- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌کشت‌های MS وB5 وغلظت‌های مختلف ساکاروز و هورمون2,4-D در رشدسلول در فاز سوسپانسیون..... ۶۸
شکل۴-۲۵- سلول‌های طویل شده حاصل از کشت سوسپانسیون..... ۶۹
شکل۴-۲۶-سلول‌های تمایز یافته در محیط سوسپانسیون..... ۶۹
شکل ۴-۲۷- سلول‌های در حال تقسیم در محیط سوسپانسیون..... ۶۹
شکل۴-۲۸- منحنی شاخص رشد در محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز..... ۷۰
شکل۴-۲۹-منحنی تعداد سلول در محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ و ۳۰ گرم ساکاروز..... ۷۱
شکل ۴-۳۰- گروماتوگراف تیمار متیل جاسمونات در غلظت۰۰/۰۰۴۴ µM و زمان ۴۸ ساعت..... ۷۴
شکل۴-۳۱-گروماتوگراف تیمار کیتوزان در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیترو زمان ۷۲ ساعت..... ۷۴
شکل۴-۳۲- گرماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر..... ۷۵
شکل۴-۳۳- گرماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر..... ۷۶
شکل۴-۳۴-گرماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر..... ۷۷
شکل۴-۳۵- گرماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر..... ۷۷
شکل۴-۳۶- گرماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر..... ۷۸
شکل۴-۳۷-گرماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر..... ۷۹

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول۳-۶- ترکیبات مورد استفاده از غلظت‌های 2,4-D، BAP، NAAوKIN برحسب mgl^{-1} در محیط کشت پایه MS به منظور بررسی کالزایی..... ۳۳

جدول شماره ۳-۷- مشخصات دستگاه GC/Mass مورد استفاده..... ۴۴

جدول۴-۱ – تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، زغال فعال و نور و اثرات متقابل بین آنها بر تعداد و طول نوساقه‌ها، فاصله بین برگ دوم و سوم و قطر ساقه یک ماه پس از کشت..... ۴۸

جدول۴-۲ تجزیه واریانس اثرنوع محیط کشت وریز نمونه و اثر متقابل آن‌ها در وزن تر وخشک و درصد کالزایی..... ۵۷

جدول۴-۳ تجزیه واریانس اثر آنتی‌اکسیدان‌ها و نوع محیط کشت و اثرمتقابل آن‌ها بر میزان کنترل فنول کالوس‌ها در دو ریز نمونه برگ و کالوس..... ۶۰

جدول۴-۴ اثر میزان ساکاروز، نوع محیط کشت و هورمون و اثر متقابل هریک بر میزان وزن خشک سلول..... ۶۵

جدول۴-۵- ترکیبات بدست آمده از آنالیز GC/Mass در تیمار – شاهد ۷۳

جدول۳-۱- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه MS.بر حسب میلی‌گرم..... ۸۸

جدول۳-۲- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایهB5 بر حسب میلی‌گرم در لیتر..... ۸۹

جدول۳-۳- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه N6بر حسب میلی‌گرم در لیتر..... ۹۰

جدول۳-۴- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه ERبر حسب میلی‌گرم در لیتر..... ۹۱

جدول۳-۵- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه WPMبر حسب میلی‌گرم در لیتر..... ۹۲

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-گیاهان دارویی

۱-۱- تعریف و اهمیت گیاهان دارویی

گیاهان دارویی به گستره وسیعی از گیاهان اطلاق می‌شود (بوته، درختچه و درخت) که در درمان بیماری‌ها و یا در پیشگیری از بروز آن مورد استفاده قرار می‌گیرند. اکثر این گیاهان در سه گروه عطری، ادویه‌ای و طبی قرار می‌گیرند. گیاهان دارویی منبع با ارزشی از متابولیت‌های موثر در درمان بیماری‌های انسانی می‌توانند باشند، به طوری‌که تخمین زده شده، حدود هفتاد هزار گونه گیاهی از گلسنگ تا درختان تنومندی چون ژینکو[1]، حداقل یک بار در طول تاریخ طب از گذشته‌های دور تا کنون، به عنوان دارو در جوامع بشری استفاده شده‌اند (زارع کاریزی،۱۳۸۷).

استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی، صنایع غذایی و بهداشتی از دیرباز مورد توجه بوده است ولی در طی سال‌های اخیر با گرایش هر چه روز افزون مردم به مصرف داروهایی با منشا گیاهی، به دلیل عوارض جانبی و سوء داروهای شیمیایی، توجه جهانیان به این بحث بیشتر شده است. از سوی دیگر، تاکید سازمان بهداشت جهانی در جایگزینی تدریجی مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی موجب شده تا کشورها نسبت به سرمایه گذاری، برنامه ریزی کشت و تولید انبوه گیاهان دارویی در سطوح صنعتی و استفاده از آن در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی اقدام کنند. چنین توجه و اقبالی به سوی گیاهان دارویی، کشت و تجارت آن‌ها را در جایگاه اقتصادی مناسبی قرار داده است، اما با توجه به پیشینه کهن استفاده از گیاهان دارویی در ایران، چنین به نظر می‌رسد که هنوز نتوانسته‌ایم ازظرفیت‌های موجود در کشور به خوبی بهره برداری کنیم و در جایگاه مناسبی در عرصه تجارت جهانی گیاهان دارویی جایی برای خود پیدا کنیم (امیدبیگی، ۱۳۷۹؛ سیفی، ۱۳۸۵).

[1] - *Ginkgo biloba*

۱-۲ -فناوری زیستی[1]

کلمه فناوری زیستی برای اولین بار در سال ۱۹۱۷ برای توصیف فرآیندهایی با استفاده از موجودات زنده برای تولید یک محصول یا اجزای یک فرآیند مانند کارخانجات صنعتی مورد استفاده قرار گرفت. تعریف حاضر از فناوری زیستی عبارت است از" هر گونه فعالیت هوشمندانه بشر درخلق، بهبود و عرضه محصـــولات گوناگون با استفاده از موجودات زنده مخصوصاً از طریق دست‌کاری ژنتیکی آن‌ها در سطـح مولکـولی می‌باشد. (Van, 2009). استفاده از فناوری زیستی در دهه‌های گذشته منحصر به کشورهای توسعه یافته نبوده و کشورهای در حال توسعه نیاز به استفاده از آن را احساس کرده و با سرمایه‌گذاری در این بخش به دنبال دست‌یابی به آن بوده‌اند. می‌توان گفت که امروزه مهمترین کاربرد فناوری زیستی در بخش کشاورزی می‌باشد. زیست فناوری کشاورزی در زمینه‌های مختلف از جمله گیاهی کاربردهای چشم‌گیری داشته است (اسمعیل زاده و شریفی،۱۳۹۲).

۱-۳- اهمیت متابولیت‌های ثانویه

تولید فرآورده‌های حاصل از متابولیسم ثانویه گیاهی که جزء گران‌بهاترین ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند، امروزه با استفاده از زیست‌فن‌آوری گیاهی امکان تولید تجاری آن به وسیله رآکتورها فراهم گردیده است، با استفاده از کشت بافت می‌توان متابولیت‌های ثانویه را در شرایط آزمایشگاهی تولید نمود. تحقیقات زیادی در زمینه استفاده از کشت سوسپانسیون و سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است. لازم به ذکر است که متابولیت‌های ثانویه دسته‌ای از مواد هستند که به صورت عصاره یا پودرهای گیاهی در درمان بسیاری از بیماری‌های شایع به کاربرده می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی با خصوصیات دارویی، بهداشتی و صنعتی در شرایط آزمایشگاهی، فواید زیادی در مقایسه با استخراج این مواد از گیاهان، تحت شرایط طبیعی دارد. کنترل دقیق پارامترهای مختلف، سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند. در حالی که در شرایط طبیعی مرتباً تحت تاثیر شرایط آب و هوایی و آفات است (فارسی و ذوالعلی،۹۰).

[1] - biotechnology

۱-۴-کشت بافت

کشت بافت به طور کلی به کشت درون شیشه‌ای[1] هر اندامی از گیاه اعم از سلول انفرادی، بافت و یا اندام در شرایط کاملا استریل اتلاق می‌شود (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۹۰). در حال حاضر تکنیک‌های کشت بافت به عنوان ابزاری قوی جهت مطالعات اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر آن در سال‌های اخیر این روش‌ها کاربردهای تجاری گسترده‌ای در اصلاح گیاهان داشته است. در حال حاضر می‌توان گفت که کشت بافت به مرحله بلوغ خود رسیده است، در کشورهای توسعه یافته و نیز در حال توسعه خصوصاً کشورهای آسیایی به صورت گسترده مورد توجه قرار گرفته است (اثنی عشری و خسروشاهی، ۱۳۸۸).

۱-۵-کشت کالوس یا توده‌های سلولی تمایز نیافته

کشت اندام‌های جدا کشت گیاهان بر روی محیط‌های حاوی آگار که منجر به تولید توده‌های سلولی بی‌شکل می‌گردد را کشت کالوس می‌نامند. که شامل ۳ مرحله شروع تشکیل کالوس، تقسیم سلولی و تکثیر و تمایز سلول‌های کالوس می‌شود. در مرحله اول (تشکیل کالوس) همزمان با آماده شدن سلول‌ها برای تقسیم، متابولیسم سلولی افزایش می‌یابد (فارسی و ذوالعلی ۱۳۹۰).

۱-۶-باززایی در شرایط درون شیشه‌ای

موفقیت در بسیاری از تکنیک‌های درون شیشه‌ای و اعمال فنون دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان عالی، به باززایی موفق گیاهان در محیط درون شیشه‌ای بستگی دارد. باززایی به فرآیند تمایز سلولی، هسته‌زایی و اندام‌زایی اطلاق می‌شود که در نتیجه آن اندام‌های گیاهی یا یک گیاه کامل تشکیل می‌شود (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۹۰).

[1] - in vitro

۱-۷-کشت سوسپانسیون سلولی

کالوس ایجاد سلول‌های قابل تبدیل به گیاه مادری را ایجاد می کند، ولی بافت آن یکنواخت نیست. به منظور تولید سلول‌های یکنواخت از سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود (امیدی و طباطبایی، ۱۳۸۸). کشت سوسپانسون عبارت است از مجموعه‌ای از سلول‌های منفرد یا توده‌های سلولی با سرعت تقسیم زیاد که در یک محیط مایع در حال گردش رشد می‌کنند. کشت سوسپانسیون سلول گیاهی هم برای فعالیت‌های تحقیقاتی و هم برای اهداف تجاری کاربردهای زیادی دارد. از مزایای مهم این نوع کشت بافت تماس مستقیم اغلب سلول‌ها با محیط کشت و در نتیجه عدم تاثیر شیب غلظت می‌باشد. همچنین اندازه کوچک توده‌های سلولی در این سیستم موجب نفوذ سریع و بهتر و در نتیجه یکنواختی اثر تنظیم کننده‌های رشد و سایر مواد آزمایشی می‌شود. این روش برای اهداف مختلفی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و تجاری کشت بافت تولید می‌شود که از آن جمله می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه به منظور مصارف دارویی و صنعتی را نام برد که بیشترین کاربرد کشت سوسپانسیون سلولی، تولید مواد شیمیایی و پروتئین‌های دارویی جدید (که تا کنون در گیاهان کامل یافت نشده‌اند) می‌باشد (اثنی عشری و خسروشاهی، ۱۳۸۸). به طور معمول سوسپانسیون سلولی با انتقال کالوس به محیط کشت مایع (دارای ترکیب مشابه با محیط کشت کالوس) و تکان دادن آرام سوسپانسیون با استفاده از شیکر افقی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید. در این حالت سلول‌های کالوس از هم جدا می‌شوند و تولید سوسپانسیونی از سلول می‌کنند که دارای تجمعی از سلول‌ها با تعداد و اندازه‌های مختلف هستند و سلول‌های انفرادی را نیز شامل می‌شوند (امیدی و طباطبایی، ۱۳۸۸).

۱-۷-۱- مراحل چرخه رشد سوسپانسیون سلولی

سلول های کشت سوسپانسیونی پنج مرحله زیر را در چرخه رشد طی می‌نمایند: مرحله خفته[1]: در این مرحله سلول‌ها به محیط کشت تازه منتقل می‌شوند و تقسیم سلولی صورت نمی‌گیرد. در این مرحله ممکن است متابولیت‌های خاصی در سلول‌ها تولید شود و یا سرعت یک فعالیت فیزیولوژیکی در آنها افزایش یابد.

[1] -log phase

مرحله تصاعدی[1]: در این مرحله یک دوره تقسیم سلولی قرار دارد. این فاز یک محدوده زمانی کوتاه در اوایل کشت است که طی آن سرعت رشد افزایش می‌یابد.

مرحله خطی[2]: تقسیم سلولی کند می‌شود ولی روند حجیم شدن سلول‌ها افزایش می‌یابد.

مرحله کند شدن [3]: در این مرحله سرعت تقسیم سلول‌ها و همچنین حجیم شدن آنها کاهش می‌یابد.

مرحله سکون [4]: تعداد و اندازه سلول‌ها ثابت می‌مانند و در طی آن وزن خشک سلول‌ها کاهش می‌یابد (اثنی عشری و خسروشاهی، ۱۳۸۸).

۱-۸- تنظیم‌کننده‌های رشد

تنظیم‌کننده‌های رشد ترکیبات آلی هستند که به طور طبیعی در گیاهان عالی سنتز می‌شوند و رشد و نمو را تحت تاثیر قرار می‌دهند. دوگروه اصلی از تنظیم کننده‌های رشد که در کشت بافت گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها می‌باشند. ویژگی عمومی اکسین‌ها القا تقسیم کالوس، تقسیم سلول، تورم بافت‌ها و تشکیل ریشه‌های نابجا می‌شود. در غلظت‌های بالای اکسین، ریشه تشکیل نمی‌شود و بافت کالوس ایجاد می‌گردد. ترکیباتی که بیشترین کاربرد را داشته و بسیار موثراند، ۴،۲-دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و نفتالین استیک اسید (NAA) می‌باشند. سیتوکنین‌ها مشتقات آدنین بوده و نقش مهمی در القاء ساقه دهی ایفا می‌نمایند. ترکیباتی که بیشترین استفاده را دارند، عبارتند از کینتین (KIN)، بنزیل آدنین (BA) یا بنزیل آمینوپورین (BAP) و ذآتین. این هورمون‌ها غالبا برای تحریک رشد و نمو به کار می‌روند. اگر همراه با اکسین به کار برده شوند، تقسیم سلولی را سرعت می‌بخشند (فارسی و همکاران،۱۳۹۰). به طورکلی تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین و سایتوکینین) با تحریک تقسیم سلول، طویل شدن سلول، تشکیل و تکثیر کالوس را در شرایط درون شیشه‌ای تسریع می‌کنند (اثنی عشری و خسروشاهی، ۱۳۸۸).

---

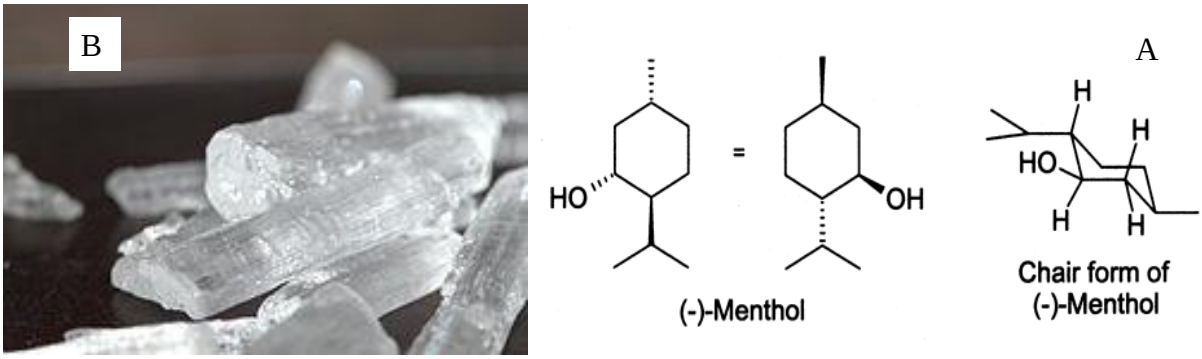
[1] - Exponential phase
[2] - Linear phase
[3] - Deceleration
[4] - Stationary phase

۱-۹- الیسیتور

الیسیتورها ترکیباتی با منشأ زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (Zhao *et al*. 2001). الیسیتورهای زیستی شامل پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشد (Vasconsuelo and Boland, 2007). الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیب مشخص مانند کیتین و کیتوزان باشند و یا نامشخص مانند قارچ و عصاره مخمر و مجموعه‌ای از ترکیبات زیستی باشند. به طور کلی استفاده از الیسیتورها در پژوهش‌های مربوط به زیست‌فناوری متابولیت‌های ثانوی گیاهی دو هدف اصلی را دنبال می‌کند: نخست کسب یافته‌هایی در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانوی می‌شود. دوم افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی برای کاربرد تجاری. در طبیعت گیاهان به حمله پاتوژن‌ها، حشرات، علف‌خواران و دیگر تنش‌های زیستی و غیر زیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی شامل القای تشکیل متابولیت‌های ثانوی نظیر فیتوالکسین‌ها، پاسخ‌های فوق حساسیتی و سدهای دفاعی ساختاری مانند رسوب لیگنین در دیواره سلول پاسخ می‌دهند (Vasconsuelo and Boland, 2007). در گیاهان کامل، متابولیت‌های ثانویه اغلب در واکنش به تنش تغذیه‌ای تولید می‌شوند. در محیط درون شیشه‌ای نیز تنش تغذیه‌ای می‌تواند عامل محرکی برای سنتز فرآورده‌ها باشد. همچنین آلودگی‌های میکروبی گیاهان کامل، اغلب سنتز متابولیت‌های خاصی را تحریک می‌کنند. بهترین مثال در این رابطه پاتوژن‌های قارچی است که باعث تولید برخی ترکیبات محرک می‌شوند. به منظور درک مکانیسم عمل عوامل محرک، اثرات آنها بر روی متابولیت‌های ثانویه گیاهان در سطح آنزیمی بررسی شده است. اگرچه مکانیسمی که به واسطه آن عوامل محرک باعث افزایش بازدهی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شوند، هنوز روشن نیست، ولی بدیهی است که اگر یک عامل محرک مناسب برای تحریک سنتز فراورده خاصی انتخاب شود، اثر تحریکی آن کاملا واضح و معنی‌دار خواهد بود (اثنی عشری و خسرو شاهی، ۱۳۸۸).

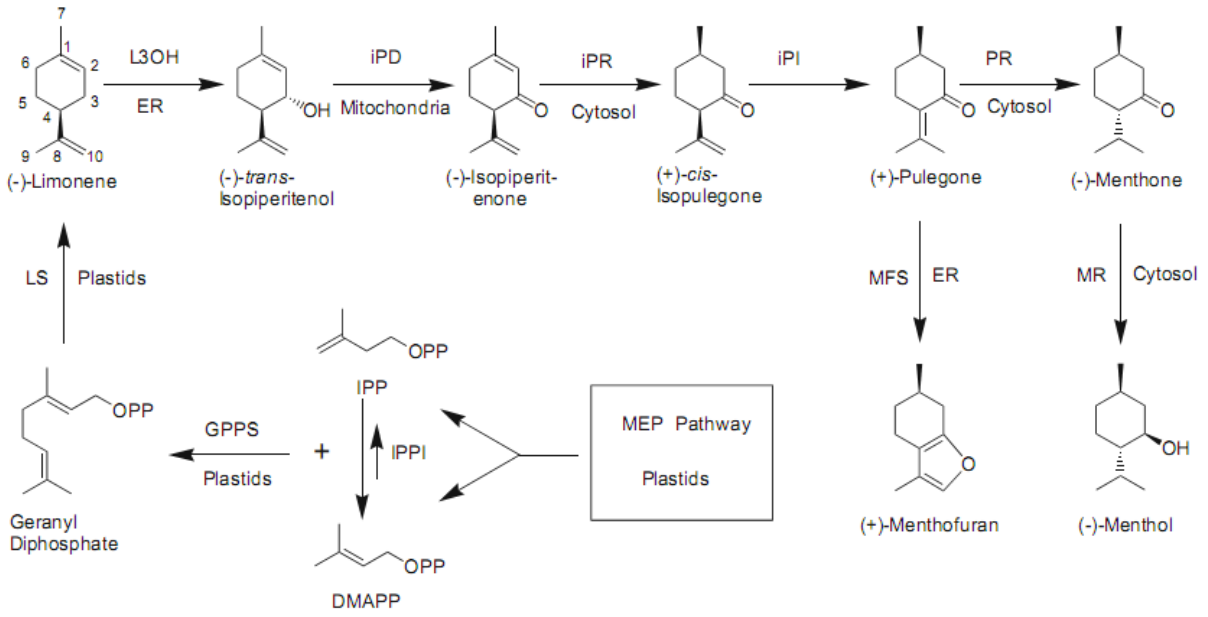
۱-۱۰-مراحل بیو سنتز منتول

ترکیب با ارزش منتول (شکل۲-۱) با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{19}OH$ و وزن ملکولی ۱۵۶/۲۷گرم، ماده کریستالی سفید براق است که در دمای اتاق به صورت جامد مشاهده می‌شود.



شکل(۱-۱) A - ساختار شیمیایی منتول B-کریستال‌های منتول (Rodney *et* al,2005).

ژرانیل فسفات سنتتاز اولین واکنش ترپنوئیدی (IPP) و دی متیل آلیل پیروفسفات (DMAPP) به ژرانیل فسفات را کاتالیز می‌کند.لیمونن سنتتاز(LS)، لیمونن-۳-هیدروکسیلاز(L3OH)، ترانس ایزوپیپریتنول دهیدروژناز(iPD)، ایزوپیپریتنون ردوکتاز(iPR)، سیس ایزوپولیگون ایزومراز(iPl)، پولیگون ردوکتاز(PR)، منتون ردوکتاز(MR) و منتوفوران سنتتاز(MFS) دیگرآنزیم‌هایی هستند که در مسیر ۸ مرحله‌ای سنتزمنتول شرکت می‌کنند و آخرین مرحله که تبدیل ملکول منتون به منتول می‌باشد توسط منتون ردوکتاز کاتالیز می‌شود (Rodney *et al*.2005).



شکل(۱-۲) مراحل بیو سنتز منتول (Rodney *et* al.2005).

هر کدام از واکنش‌ها در اندامک‌های مجزا از جمله پلاستید، سیتوزول، میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی صورت می‌گیرد (Rodney *et* al, 2005). مراحل اولیه بیوسنتز منوترپن در پلاستید انجام می‌شود. لیمونن سنتتاز که مسئول اولین مرحله اختصاصی در بیوسنتز منوترپن در گونه نعناع، به عنوان یک پیش پروتئین حمل کننده یک پپتید گذرا پلاستیدی طویل ترجمه می‌شود. لیمونن سنتتاز حلقوی شدن ژرانیل دی فسفات (پیش ماده ده کربنه عمومی منوترپن) به لیمونن را کاتالیز می‌کند. تبدیل گرانیل دی فسفات به لیمونن یکی از ساده‌ترین واکنش‌های حلقوی شدن ترپنوئیدها است. یک پروتئین با جرم مولکولی ۷۲/۴ kDa از cDNA لیمونن سنتاز تولید می‌شود و تجزیه توالی اسیدآمینه آن حضور یک پپتید در پایانه آمینو را نشان می‌دهد. مکان لیمونن سینتاز تائید کرد که منوترپن‌ها منشاء پلاستیدی دارند. چندین شاخه یا بخش از متابولیسم ترپنوئیدها خارج از پلاستید در سیتوزول، شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری رخ می‌دهد. پولگان نقش مرکزی در متابولیسم منوترپن در نعناع را به عنوان پیش ماده برای منتوفوران و منتون به عهده دارد. محصول میانی مسیر، پولگان است که در سیتوزول رخ می‌دهد. پولگان ردوکتاز سیتوزولی منتون تولید کرده و محصول جانبی منتوفوران می‌تواند از پولگان توسط واکنش منتوفوران سینتاز که در شبکه آندوپلاسمی قرار دارد تسریع شود (Turner *et al*. 1999).

۱-۱۱- گیاه‌شناسی *Mentha arvensis* L.

۱-۱۱-۱-اسامی متداول: Field Mint, Corn mint, Mint

نام علمی: *Mentha arvensis* L.

خانواده: Lamiaceae

۱-۱۱-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی گونه *arvensis* L.

Mentha arvensis L. متعلق به خانواده Lamiaceae (نعناعیان) از واریته piperascens است. گیاهی علفی پایا و دارای دو نوع خزنده و زیر زمینی می‌باشد. گیاهی هگزاپلویید با عدد کروموزومی2n=72 می‌باشد. هیبریدی از دو گونه *M.arvensis* و *M.aquatica* است (Husseian *et* al, 2010). ضخامت ریشه‌های نعناع به ۳ تا ۴ سانتی‌متر می‌رسد. از نوع اول آن در محل گره‌ها، دسته‌ای از ریشه‌های نابجا به درون زمین نفوذکرده است که از سمت مقابل آن یک شاخه قائم، برگدار و کوچک خارج می‌شود. اندام‌های زیرزمینی نعناع به رنگ سفید، نازک و به طول ۵ تا ۲۰ سانتی‌متر می‌رسند. ریشه نعناع چندان عمیق نیست و به صورت پراکنده در سطح خاک قرار دارد. ساقه این گیاه چهارگوش و به واسطه وجود آنتوسیانین‌ها در آنها به رنگ قرمز مایل به بنفش یا مایل به ارغوانی است طول ساقه متفاوت بوده و به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه بستگی دارد و بین ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر است. قسمت بالایی ساقه نسبت به قسمت پایینی از انشعابات بیشتری برخوردار است. در محل هر یک از گره‌های ساقه‌ی این گیاه دو برگ متقابل دیده می‌شود. برگ‌ها بلند به طول ۱-۲ ×۲-۵ سانتی‌متر، بیضوی شکل، نوک تیز، دندانه دار، کمی پوشیده از کرک و به رنگ سبز مشاهده می‌شوند. رگبرگ‌ها به رنگ آبی و در پهنک برگ دارای انشعاب‌های فراوانی هستند.گل‌های این گیاه بنفش روشن یا کم و بیش ارغوانی مایل به بنفش است (شکل ۲-۳) که در ماه‌های مرداد و شهریور ظاهر می‌گردند. گل‌ها به صورت خوشه‌های مجتمع روی محورهایی قرار دارند که هر محور از ۶ تا ۷ گل تشکیل شده است. عمر گل‌ها کوتاه بوده و مدت کمی پس

از تشکیل از گیاه جدا می‌شوند. نعناع میوه کپسولی کوچک به رنگ قرمز تیره دارد. بذر این گیاه فاقد قوه رویشی است (Brick Ell 1996).

(شکل۱-۳) A – تصویری از گل *Mentha arvensis* B- برگ گیاه *Menthea arvensis*

شکل۱-۴- اجزا گیاه Mentha arvensis

۱-۱۱-۳- پراکنش جغرافیایی و نیازهای اکولوژی

در مورد منشا این گیاه اختلاف نظرهایی وجود دارد. عده‌ای از گیاه‌شناسان آسیا را منشا نعناع می‌دانند. در حالی‌که، برخی دیگر منشا آن را انگلیس دانسته و معتقدند که این گیاه در قرن هفدهم در انگلیس به وجود آمده است. نعناع در مناطق معتدل آسیا، اروپا، شمال آمریکا و استرالیا در سطوح وسیعی می‌روید. نعناع را در

اکثر نقاط می‌توان کشت کرد. گیاه رشد یافته در اقلیم نسبتا سرد و مرطوب مقدار زیادی اسانس تولید می‌کند اما مناطق خیلی سرد برای کشت این گیاه مناسب نمی‌باشد. اندام‌های زیرزمینی این گیاه قادرند تا دمای ۱۷- درجه سانتی‌گراد را هم برای مدت محدودی تحمل کنند. درجه حرارت مناسب به منظور تسریع در رشد و نمو گیاه و همچنین افزایش در تولید اسانس ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد است. اگر گیاه در سایه قرارگرفته باشد مقدار استرهای منتول در آن کاهش می‌یابد در حالی‌که سرمای شدید مقدار این مواد را افزایش می‌دهد. بعضی از محققان معتقدند که هر چند در درجه حرارت‌های بالاتر (۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) مقدار تولید اسانس در گیاه افزایش می‌یابد، ولی در مقدار اسانس (منتول) تاثیر منفی داشته و باعث کاهش آن می‌گردد. مقدار اسانس تولید شده در نعناع فلفلی رابطه مستقیمی با مقدار رطوبت، آب ، نورکافی و همچنین مواد غذایی موجود در خاک داشته و باعث افزایش عملکرد می شود (امیدبیگی، ۱۳۸۴).

۱-۱۱-۴- خصوصیات درمانی

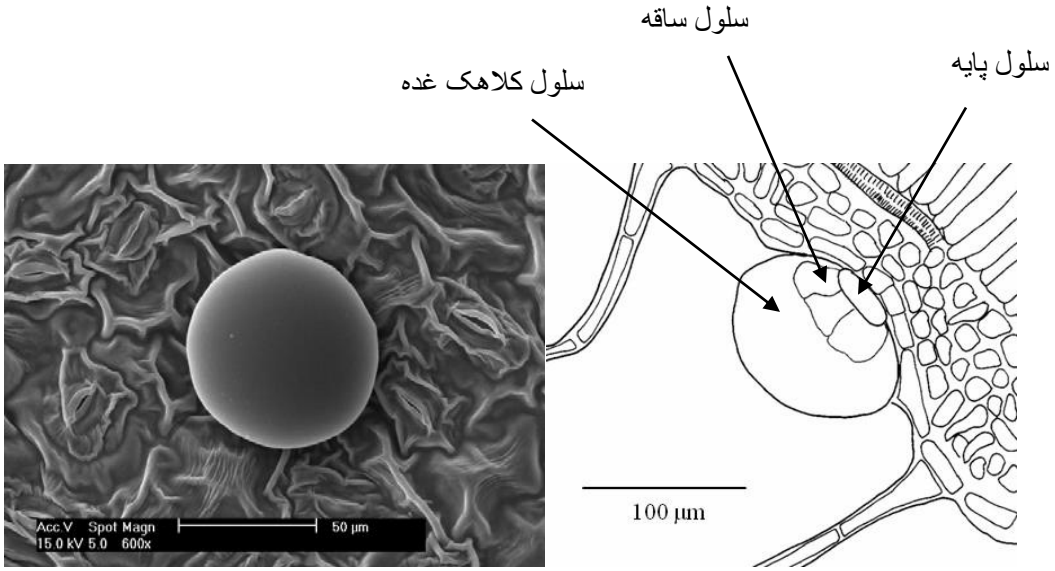
قسمت‌های مورد استفاده دارویی نعناع، برگ و یا سرشاخه گل‌دار آن است. سرشاخه‌های گل‌دار و برگ تازه گیاه اثرات نیروبخشی، مقوی معده، ضد نفخ و ضد تشنج داشته و همچنین منتول موجود علاوه بر اثر تسکین درد از آنتی ویروس قوی محسوب می‌گردد (زرگری، ۱۳۷۶). همچنین عصاره آن اثر بازدارنده بر رشد میسیلیومی قارچ دارد. روغن نعناع برای درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها مانند آکنه، عفونت قارچی، خارش، سردرد، دندان درد، روماتیسم، آفتاب‌سوختگی، گال، سرگیجه، خواب آلودگی، افسردگی، خستگی روانی، کولون اسپاستیک، سینوس، سوزش و درد معده، سوء هاضمه، قولنج، ذات الریه، احتقان سینه و اختلالات عصبی، تنش، آسم، سل، برونشیت و وبا استفاده می‌شود (جعفرنیا و همکاران، ۱۳۸۶). همچنین در بررسی‌های انجام شده در اندام‌های سرطانی موش مشخص شده که اسانس نعناع فلفلی از پیش‌روی این سلول‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین در برخی گزارشات به عنوان کاهنده کلسترول و سطح تری‌گلیسیرید و سمیت زدایی ناشی از گلوکز در موش‌های دیابتی معرفی شده است (Samarth *et al*, 2009). در حال حاضر در ایران از اسانس نعناع همراه با

دیگر گونه‌های گیاهی در ساخت داروهای گیاهی زیر که در ایران به ثبت رسیده است، استفاده می‌شود. قرص مکیدنی آلتادین (موارد مصرف: التهابات مخاط گلو و دهان)، قرص روکش‌دار آلیکوم (موارد مصرف: پایین آورنده فشار و چربی خون، ضد تصلب شرایین، ضد نفخ، اشتهاآور)، گرانول پلانتازل (موارد مصرف: اسهال‌های ساده)، قرص درگلیس (موارد مصرف: درمان زخم معده و زخم اثنی عشر، گاستریت و نفخ معده)، پودر کارامین (موارد مصرف: اختلالات هضم همراه نفخ) شربت کاراوی میکسچر (موارد مصرف: دل درد نوزادان و اختلالات گوارشی در کودکان)، قرص مکیدنی ماسومنت (موارد مصرف: التهاب گلو در سرماخوردگی و سرفه)، قرص جویدنی مانت (موارد مصرف: اسپاسم‌های دستگاه گوارش، نفخ معده وخوشبو کننده دهان)، ژل منتاژل (موارد مصرف: قارچ کچلی لای انگشتان پا و کشاله ران، ضد خارش و سوزش و گزیدگی‌ها و سوختگی‌های سطحی). اسانس نعناع فلفلی در بهبود کرامپ‌های شکمی موثر است (معاونی، ۱۳۸۸).

۱-۱۱-۵- ویژگی اسانس در *Mentha arvensis* L.

به طور کلی استخراج اسانس از کل گیاه قبل از گل‌دهی انجام می‌شود. حفره‌های محتوی اسانس در هر دو طرف برگ وجود دارند. به واسطه وجود اسانس از کلیه قسمت‌های هوایی این گیاه بوی معطر و مطبوع استشمام می‌شود و دارای مزه‌ای خنک و کمی تند است. اسانس در ابتدای رویش گیاه در پیکر رویشی ذخیره می‌گردد. با رشد گیاه، سرعت سنتز اسانس افزایش می‌یابد. اسانس در حفره‌های زیر کوتیکول ساخته و ذخیره می‌شود که با جدا شدن کوتیکول از دیواره رأس سلول‌های ترشحی تشکیل می‌شود. مکانیسم ترشحی دقیق هنوز نامشخص است، اگر چه فرض شده ترشح اجزاء اسانس از طریق پخش فرارها از طریق کوتیکول یا توسط تخریب کوتیکول انجام می‌شود .در نعناع فلفلی رشد گیاه و عملکرد اسانس تحت تاثیر شدت دوره نوری قرار می‌گیرد. روزهای کوتاه موجب گیاهان خزنده، برگ‌های کوچک و استولون‌های زیاد می‌شود در حالی‌که روزهای بلند با جریان فتون و دما بالا در شب باعث تولید گیاهان ایستاده، برگ و گل‌های زیاد و بالاترین عملکرد اسانس می‌شود.

شدت نور، طول روز و دمای محیط، ترکیبات اسانس را تحت تاثیر قرار می‌دهند. روزهای بلند، جریان فتون بالا و شب‌های سرد باعث تجمع منوترپن‌های اکسید شده منتون می‌شود (Samarth *et al*, 2009).



شکل ۱-۵- طرح کلی کرک غده‌ای سپرمانند نعناع (Saric-Kundalic *et al*,2009)

سلول‌های غده‌ای(شکل ۵-۲) سپرمانند گیاه نعناع به عنوان مدل مناسبی برای مطالعه بیولوژی سلولی غدد اسانس گیاهی توسط ژنتیک مولکولی و آنزیم شناسی بیوسنتز منتول به کار می‌رود (Koerper *et al*,1999).

۱-۱۱-۶- ترکیبات اسانس ***Mentha arvensis* L.**

ترکیبات آن شامل ۱/۳- ۱/۶ درصد روغن است که اسانس آن دارای ترکیباتی از قبیل ۷۰-۸۰ درصد منتول، ۱۰ درصد متیل استات، ۸ درصد متیونین، و ترکیباتی چون لیمونن، پنتین، و کاریوفلین می‌باشد (Savita And Mohan,2002).

۱-۱۱- ۷-اهمیت اقتصادی منتول

محصولات گیاه نعناع از ارزش تجاری قابل توجهی برخوردار است و به طور گسترده‌ای برای تولید اسانس این گیاه کشت می‌شود. عمده مناطق مهم تولیدکننده تجاری این گیاه در حال حاضر ایالات متحده به دلیل شرایط

آب و هوایی مطلوب می‌باشد (Chakraborty *et* al, 2008). از کشورهای دیگر تولیدکننده نعناع می‌توان از روسیه، بلغارستان، برزیل، ژاپن، فرانسه، آرژانتین و مجارستان نام برد (امیدبیگی، ۱۳۸۴). مقدار مصرف سالانه اسانس نعناع در جهان هفت هزار تن با ارزش ماده اولیه نزدیک به ۳۰۰ میلیون دلاراست. در این مورد آمریکا در سال ۱۹۹۲ حدود۳۲۰۰ تن اسانس از ۴۳۰۰۰ هکتار زمین زیر کشت استحصال نمود. از نظر تجاری ایزوپرنوئیدهای گیاهی از جمله منتول بسیار مهم هستند. منتول قطعا یکی از بهترین مونوترپن‌های شناخته شده است که به عنوان یک ترکیب خالص و یا جزء ضروری تشکیل دهنده اسانس گونه .L*arvensis* می‌باشد. به طور متوسط کشورهای چین، ژاپن و هند ۹۰-۸۰٪ اسانس نعناع را از این گیاه استخراج می‌کنند. از ۳۶٪ اسانس به صورت مصرف خوراکی، ۲۲٪ در صنایع داروسازی، ۱۲٪ به عنوان طعم دهنده،۱۷٪ صنعت تنباکو و ۶٪ در موارد دیگر به طور وسیع استفاده می‌شود. منتول مصنوعی در مقیاس تجاری توسط چند روش تولید می‌شود و به شکل کریستالی خالص از تقطیر بخار اسانس به دست می‌آید (Chakraborty *et* al, 2008).

۱-۱۲- لزوم تحقیق

نعناع یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاه دارویی مطرح جهان می‌باشد. استفاده انسان از این گیاه به ۲۵۰ هزارسال قبل باز می‌گردد. از برگ‌ها، پیکر رویشی و اسانس نعناع در اکثر فارماکوپه‌های معتبر به عنوان دارو یاد شده است (امید بیگی، ۱۳۷۹). اندام‌های مختلف اعضای این جنس تنها منابعی برای تولید منتول می‌باشند که یکی از مهم‌ترین اسانس‌ها از لحاظ اقتصادی در جهان است. علاوه بر این زیست‌فعالی‌های مختلفی از جنس نعناع گزارش شده است. فعالیت ضد میکروبی ۳ گونه *M.spicata*، *M.arvensis*، *M.piperita*، فعالیت ضد ویروسی از روغن *M. piperita*، فعالیت ضد سمیت سلول گیاهی *M.spicata*، فعالیت ضد قارچی، محافظت در برابرفعالیت اشعه UV و پیشگیری از پیشروی سلول‌های سرطانی روغن *M. piperita* گزارش شده است. شبیه‌سازی ملکولی و بیان عملکرد آنزیم‌های کلیدی در رابطه با تولید منتول در نعناع مورد مطالعه قرار گرفته و نعناع به عنوان خوشبو کننده و'گیاه معطر با ارزش، هزاران سال مورد استفاده قرار گرفته است با توجه به ارزش تجاری بالای این

گیاه، تولید در مقیاس بزرگ از اسانس منتول هدف مناسبی در سال‌های اخیر است (Chakraborty *et* al, 2008). در حال حاضر در دنیا از دو روش برای تولید منتول استفاده می‌شود که شامل سنتز شیمیایی و استخراج اسانس طبیعی از گیاه نعناع می‌باشد. تولید اسانس‌های شیمیایی علاوه بر داشتن دانش پیچیده و صرف هزینه‌های بالا در کشور ما، می‌تواند اثرات نامطلوبی برسلامت انسان داشته باشد. تولید اسانس به صورت طبیعی نیازمند کشت وسیع گیاه نعناع و بهینه سازی شرایط محیطی به منظور بدست آوردن حداکثر میزان اسانس از گیاه می‌باشد که خود متحمل صرف هزینه‌های بالای به‌زراعی و عملیات کاشت، داشت و برداشت نعناع است. تولید انبوه وسریع اسانس‌ها در مقیاس زیاد ازطریق روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و از سویی محدودیت‌های مختلف مانع تامین این مواد از طبیعت است. استفاده ازراه‌کارهای فناوری زیستی ازجمله کشت سوسپانسیون سلولی، راه‌حلی مناسب برای تولید سریع وانبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Mulabagal and Tsay, 2004; Rao and Ravishankar, 2002).

در این مطالعه تلاش بر بهینه‌سازی سوسپانسیون سلولی *Mentha arvensis* L بوده است که در نهایت سبب افزایش ارزش اقتصادی گیاه می‌شود. همچنین با فراهم آوردن شرایط افزایش متابولیت ثانویه با اعمال تیمارهای مناسب با تعیین بهترین تیمار در محیط سوسپانسیون سلولی میزان ترکیبات ثانویه، بویژه منتول را افزایش دهیم.

۱-۱۳- اهداف مشخص تحقیق:

۱- بهینه سازی کالزایی در گیاه نعناع

۲- تعیین مناسب ترین محیط و تیمار هورمونی به منظور کشت سوسپانسیون سلولی

۳- تعیین منحنی رشد سلولی و شاخص رشد سلول‌ها برای گیاه نعناع

۴- بررسی میزان تولید متابولیت‌ها با استفاده از دستگاه

۱-۱۴- سؤالات تحقیق:

۱- آیا تولید متابولیت ثانویه منتول در کشت سوسپانسیون نعناع امکان پذیر می‌باشد ؟

۲- آیا تیمارهای اعمال شده می تواند تاثیری در تولید منتول داشته باشد؟

۳- آیا تیمارها باعث تغییر در اجزای اسانس نعناع می‌گردد؟

۱-۱۵ - فرضیه‌های تحقیق:

۱-تیمارهای اعمال شده باعث تولید حداکثر کالوس می‌گردد.

۲-متابولیت های ثانویه در کشت سوسپانسیون تولید می‌شوند .

۳-تیمارهای مختلف باعث تغییر میزان متابولیت های ثانویه به ویژه منتول می‌شوند.

فصل دوم

مروری بر تحقیقات انجام شده

۲- بررسی منابع و تحقیقات انجام شده در موضوع

استفاده از تکنیک کشت سوسپانسیون در گیاهان دارویی کاربرد زیادی دارد. مواردی مشاهده شده است که میزان متابولیت‌های موجود در کشت سلولی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است و حتی در کشت سلولی متابولیت‌هایی تولید می‌شود که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود. با توجه به آنکه در طبیعت سرعت و مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه کم بوده، بنابراین تولید تجاری از منابع موجود اقتصادی نبوده و ضروری است برای تولید سریع و تجاری متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی از فنون کشت سوسپانسیون سلولی به طور بهینه استفاده گردد. نیکل و روتین در سال ۱۹۵۶ برای اولین بار حق ثبت اختراع برای تولید مواد از کشت بافت گیاهی را کسب کردند. همچنین محققان متعددی تولید ترکیبات مفید از کالوس و سوسپانسیون سلولی را گزارش کردند. به عنوان مثال در کشت سوسپانسیون سلولی، *Thalictrum minus* ماده ضدباکتریایی berberin و در کشت کالوس گیاه *Catharantus roseus* ماده ضد فشار خون ajmalicine تولید شد. کشت کالوس گیاه *Stizolobium hassjo* تولید دارو ضد پارکینسون دی هیدروکسی بنزین را به همراه داشت که همچنین به عنوان دی اکسی فنیل آلانین یا L- Dopa شناخته شده است. در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه .L *H.niger* ماده آنتی کولینرژیک ان بوتیل بروماید مشتق شده از هیوسین تولید شد. برخی متابولیت‌های ثانویه در غلظت‌های بسیار بالاتر در سلول‌های کشت شده نسبت به گیاهان کامل از همان گونه مشاهده شده است که شامل ginsengoside از گیاه *Panax ginsing* (۲۷ درصد از وزن خشک سلولی در کشت بافت و ۴/۵ درصد در کل گیاه) آنتراکینون‌ها از گیاه *Morinda citrafolia* (۱۸ درصد در کشت بافت و ۲/۲ درصد در کل گیاه) و شیکونین از گیاه *Lothospernum erythrorhizon* (۱۲ درصد در کشت بافت، ۱/۵ درصد در کل گیاه) می‌باشد (Linden, 2006).

عوامل متعددی نظیر ترکیبات محیط کشت، ریز نمونه، شرایط فیزیکی، القاء، نفوذپذیری و ... در کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت ثانویه موثرند. عمده اجزای محیط کشت سلول های گیاهی از قبیل قندها، فسفات، نیترات و تنظیم کننده‌های رشد، شاخص‌های مهمی در رشد و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌باشند.

تحقیقات نشان داده است که بهترین غلظت ساکارز برای تجمع ایندول آلکالوئید در کشت سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*) غلظت های ۱۲ تا ۱۴ درصد وزنی حجمی است. کاهش آمونیوم و افزایش نیترات باعث افزایش تولید شیکونین و بتاسیانین می‌شود، در حالی که نسبت‌های بالاتر آمونیوم به نیترات تولید بربرین و یوبیکینون را افزایش می‌دهد. مقادیر زیادی فسفات باعث افزایش رشد سلول می‌شود و عمدتا اثری منفی بر تجمع متابولیت‌های ثانویه دارد .کاهش فسفات تجمع آجمالسین را در کشت سلولی پروانش و آلکالوئیدها را در اسفند (*Peganum harmala*) و افزایش آن سنتز دیگوکسین را در گل انگشتانه (*Purpurea dijitalise*) و بتاسیانین را در سلمه تره (*Chenopodium rubrum*) و سرخاب (*Phytolacca americana*) تحریک می‌کند. علاوه بر مواد غذایی محیط کشت، شرایط محیط کشت مانند: نور، دما، PH و اکسیژن نیز بر تجمع متابولیت‌های ثانویه موثر می‌باشد. نوردهی بر تجمع ترکیب سزکوئی ترین‌ها در کشت‌های کالوس گیاه بابونه و محرومیت از نور بر افزایش تجمع مونوترپن‌ها در کشت‌های کالوس لیمو ترش (*Citrus limon*) تاثیر دارد .افزودن دی اکسیدکربن به سوسپانسیون‌های سلولی انگور موسکات، سنتز مونوترین‌ها و تشکیل سینالول را القا نموده است (Mulabagal and Tsay, 2004). سایر اقداماتی که می‌توانند در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه موثر باشند عبارتند از : افزودن پیش سازها، القاگرهای زنده با منشاء قارچی، باکتریایی و مخمرو غیر زنده پلی ساکاریدها، گلیکو پروتئین‌ها، آنزیم‌های غیر فعال شده، نمک‌های فلزات سنگین و زانتان به عنوان آغازگر در تشکیل متابولیت‌های ثانویه، و پلی ساکاریدهایی مانند کیتوزان و یا اولتراسونیکاسیون، دور کردن محصول از محل تولید، بی تحرک نمودن سلول‌های گیاهی، انتخاب سلول‌هایی با تولید و کارآیی بالا (Rao and Ravishankar,2002). برای مثال : اثر دو فاکتور اسید جاسمونیک و متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون سلولی برای تولید رزمارینیک اسید در گیاه *Mentha piperita* مورد آزمایش قرار گرفت. در این تحقیق بیشترین مقدار اسید رزمارینیک(۱۱۷/۹۵ میلی‌گرم وزن خشک) در نمونه‌هایی دیده شد که به مدت ۲۴ ساعت با ۱۰۰ میکرو مولار متیل جاسمونات تیمار شده بودند (Krz-anowska *et al*, 2011).

در مطالعه که بر روی افزایش میزان ماده موثره منتول انجام گرفت مشخص گردید که استفاده از الیسیتور کیتوزان در محیط کشت LS بر میزان تولید منتول تاثیر افزایشی داشت. استفاده همزمان تیمار منتون با غلظت ۳۵ میکرومولار و تیمار y-cyclodextrin با غلظت ۶۰ میکرومولار پتانسیل افزایش تولید منتول را نشان داد و تیمار الیسیتور قارچی موجب افزایش منتول تا سطح ۱۴۰/۸ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد گردید (Chakraborty and. Chattopadhavy,2008).

در آزمایشی که برای بهینه‌سازی کالزایی و سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش (*catharanthus roseus*) انجام گردید. با تیمار هورمونی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به تنهایی و یا به همراه ۵/. میلی‌گرم در لیتر BAP یا KIN بهترین کالوس را تولید کردند. همچنین در سوسپانسیون سلولی بیشترین وزن خشک سلولی در محیط کشت حاوی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP اندازه‌گیری شد (احمدی و همکاران،۱۳۹۱).

در بررسی تولید آلکالوئیدهای تروپانی در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Datura stramonium L.* سوسپانسیون سلولی از کالوس‌های شفاف حاصل از جداکشت برگی در محیط MS دارای تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیترKIN و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. در مقادیر مختلف ساکاروز، بیشترین تعداد سلول‌ها مربوط به محیط دارای ۴۰ گرم در لیتر ساکارز در هفته هفتم بود. همچنین نتایج این آزمایش مشخص ساخت افزایش غلظت نیترات پتاسیم موجب کاهش بیوسنتزآلکالوئیدهای تروپانی می‌گردد (ایران بخش،۱۳۸۳). درتحقیقی که بر روی کشت سوسپانسیون گیاه *Pueraria tuberose* انجام شد مشخص گردید که استفاده از الیسیتورهای عصاره مخمر، متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان متابولیت ثانویه ایزوفلاونویید می‌گردد. همچنین بیشترین میزان ایزوفلاونوئید تولید شده در ۴۸ ساعت تیمار گیاه با عصاره مخمر در فاز سکون گزارش داده شد (Goyal and Ramawat,2008).

تولید سفالین و امتین از کشت سوسپانسیون ریشه گیاه ایپکاکوانا *Cephaelis ipecacuanha* که میزان تولید شده این مواد آلکالوئیدی در کشت سلولی برابر با مقادیر تولیدی گیاهان مادری در شرایط گلخانه‌ای گزارش شد (Richard ,1988).

در تحقیقی که در بررسی تولید تولید بتاکربولین آلکالوئید درکشت سوسپانسیون‌سلولی مخلوط دوگیاه اسپند *Peganumharmala*L. و عطرسنگ *Varthemia persica* DC. انجام شد در حضور تنظیم کننده‌های رشد میزان این آلکالوئید در اثر افزایش زمان (در طی ۴ هفته متوالی) افزایش یافت. همچنین در عصاره متانولی سوسپانسیون سلولی اسپند آلکالوئیدهای هارمین، هارمالول و هارمول شناسایی شدند (اصغری و همکاران،۱۳۸۸). تولید بیشترین درصد فلاونولیگنان در محیط کشت سلولی گیاه خارمریم (*Siyibum marianum*) درحضور ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و قطعات جدا کشت ریشه مشاهده شد. همچنین استفاده از دو تنظیم کننده NAA وKIN نشان داد که بیشترین در صد کالزایی ۹۷ درصد در قطعات جداکشت ریشه و غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت. در تحقیق انجام شده بر روی گیاه بومادران *Achillea millefolium* مشخص شد که سلول‌های کالوس در محیط MS (موراشگ و اسکوک)، همراه با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نتوانستند اسانس تولید کنند اما در بررسی مقدماتی بر روی عصاره کالوس مشخص شد که سلول‌ها تولید تانن کرده‌اند (شمس اردکانی و همکاران،۱۳۸۴). با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های گیاهی و افزایش تقاضا، محققین به دنبال روش‌هایی به منظور تولید هر چه بیشتر این ترکیبات هستند .با استفاده از روش کشت بافت شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی و نیز مکانیسم تنظیمی آن بدست می‌آید و با استفاده از روش‌های زیست فناوری تولید متابولیت‌های با ارزش در گیاهان را می‌توان افزایش داد. استفاده از الیسیتورهای زیستی روش مناسبی به منظور تولید هر چه بیشتر متابولیت‌های ثانوی در شرایط کشت درون شیشه می‌باشد. به نظر می‌رسد ترکیبات فعال الیسیتورهای زیستی نقش موثری در القای پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی دارند.

فصل سوم

مواد و روش‌کار

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج انجام شد. مراحل کار در دو فاز جداگانه انجام گردید.

۳-۱- تهیه ریزنمونه استریل

گیاهچه نعناع *Mentha arvensis* L. از گل‌خانه پژوهشکده گیاهان دارویی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از جدا کردن برگ‌ها، ساقه‌های سالم و عاری از آفت و بیماری در محیط آزمایشگاه ابتدا به مدت یک ساعت در زیر آب جاری همراه با دو یا سه قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شده و سپس در لامینار ایرفلو ابتدا با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و پس از آن به وسیله هیپوکلرید سدیم[1] با درصد کلر فعال یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه استریل گردید. در مرحله بعد برگ‌ها و ساقه‌ها سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل، شستشو شدند.

شکل۳-۱-برگ و ساقه نعنا ع موجود در مزرعه

[1] - Naocl

۳-۲- سترون کردن ظروف، ادوات آزمایشگاهی و لامینار ایرفلو

ادوات شیشه‌ای شامل ارلن، بشر و دیگر وسایل قابل اتوکلاو نظیر کاغذ واتمن، دستکش و همچنین آب مقطر توسط اتوکلاو با دمای ۱۲۱ سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. جهت ضدعفونی کردن پنس‌ها و اسکالپل‌ها، آن‌ها را درون ورقه آلومینیومی پیچیده و سپس درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده و اتوکلاو گردیدند تا آن‌ها در وضعیت استریل باقی بمانند. برای استریل کردن محفظه لامینار ایرفلو قبل از شروع کار از پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد استفاده شد.

۳-۳- محیط کشت

۳-۳-۱- روش تهیه محیط کشت

از محیط کشت پایه MS به عنوان بستر کشت استفاده شد. (برای تهیه محیط کشت $MS_{1/2}$ یا MS ¼، تمام نمک‌های معدنی 1/2 و 1/4 شدند، اما ویتامین‌ها و ساکارز و آگار به همان اندازه MS کامل استفاده شد.

۳-۳-۱-۱- تهیه محلول‌های ذخیره

برای تهیه محیط کشت، ابتدا محلول‌های مادری حاوی چند برابر غلظت نهایی ترکیبات مورد نیاز تهیه شد. برای تهیه محیط کشت پایه ابتدا محلول‌های مادر عناصر پر مصرف (۱۰×)، کم مصرف (۱۰۰×) یا (۱۰۰۰×)، آهن (۱۰۰×) و ویتامین‌ها (۱۰۰×) به صورت مجزا تهیه شدند. در طول آزمایش به منظور جلوگیری از فساد محلول‌های مادری، تمامی آنها در یخچال و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. کلیه مواد شیمیایی و هورمون‌های مورد استفاده برای تهیه محیط‌های کشت ساخت شرکت Duchefa هلند بودند.

۳-۳-۱-۲-محلول ذخیره عناصرپرمصرف[1]

عناصر پرمصرف ابتدا به میزان ۱۰ برابر غلظت نهایی در آب مقطر حل شدند و به حجم ۵۰۰ میلی‌لیترّ رسانده شدند. برای تهیه یک لیتر محیط کشت ۵۰ میلی لیتراز آن برداشته شد.

۳-۳-۱-۳-محلول ذخیره عناصرکم‌مصرف[2]

همه عناصر کم‌مصرف بجز $CoCl_2$ و $CuSo_4$ را یک۰ برابر کرده (محلول شماره یک میکرو) ولی $CoCl_2$ و $CuSo_4$ را یک۰۰ برابر کرده (محلول شماره ۲ میکرو) و با آب مقطر به حجم cc ۱۰۰ رسانده شد. برای تهیه یک لیتر محیط کشت ۱۰میلی لیتر از محلول شماره یک و یک میلی لیتر از محلول شماره دو برداشته شد.

۳-۳-۱-۴-محلول ذخیره آهن

Na_2EDTA و $FeSO_4.7\ H_2O$ را۱۰ برابر کرده و با آب مقطر به حجم cc ۱۰۰ رسانده شد، سپس برای تهیه یک لیتر محیط کشت ۱۰ میلی‌لیتر از آن برداشته شد.

۳-۳-۱-۵- محلول ذخیره ویتامین‌ها

ویتامین‌های محیط کشت به میزان ۱۰ برابر غلظت نهایی ابتدا در آب مقطر حل شدند و سپس محلول حاصل، با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. حجم مورد استفاده از محلول مادری ویتامین‌ها برای تهیه هر لیتر محیط کشت ۱۰ میلی لیتر در لیتر بود.

---

[1] - Macroelements

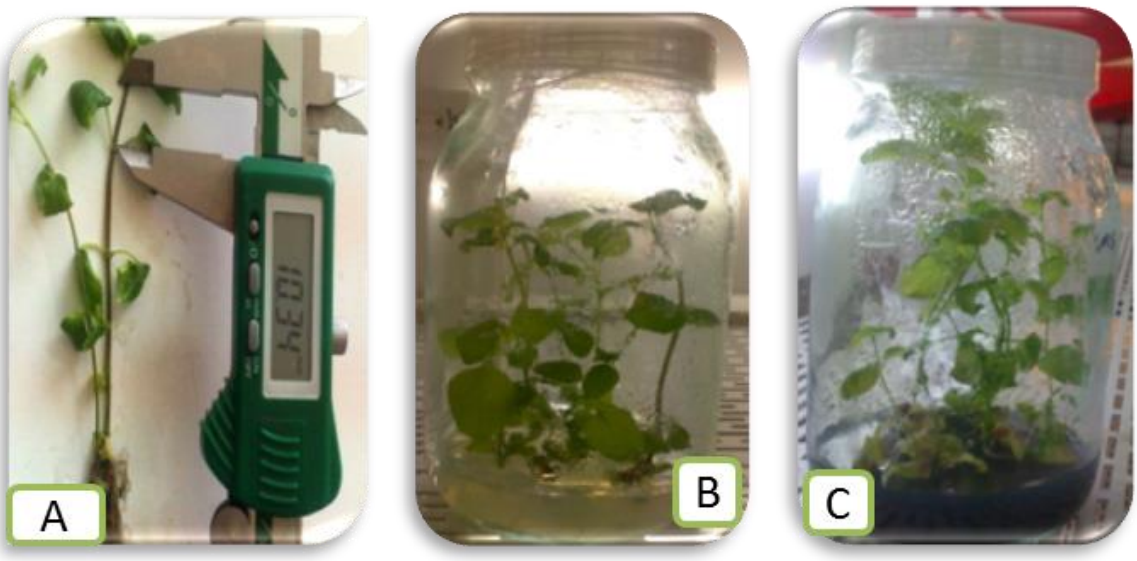
[2] - Microelements

۳-۳-۱-۶-محلول ذخیره تنظیم کننده‌های رشد

در این تحقیق از هورمون‌های BAP، KIN، NAA و2,4-D استفاده گردید. به طور جداگانه برای تهیه محلول مادری ۱۰ میلی‌گرم از اکسین و یا سایتوکنین مورد نظر، ابتدا در حلال مربوط به آن هورمون حل شد. (NAA، KIN و BAP در مقداری NaOH یک نرمال و 2,4-D در چند قطره اتانول ۹۶ درصد حل شد)، سپس زمانی‌که محلول شفاف شد، با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر رسانده شد. توضیح این که محلول‌های مادری توسط ظروف تیره رنگ در یخچال برای استفاده‌های بعدی نگهداری شدند.

۳-۴-ریزازدیادی

به منظور ریزازدیادی، ریزنمونه های استریل شده که حاوی حداقل یک یا دو گره بودند در محیط کشت‌های MS کامل، $MS_{1/2}$ و $MS_{1/4}$ بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و همراه با۰ یا ۲ گرم در لیتر زغال فعال کشت شدند. سپس تیمارهای کشت شده به اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۶ساعت دوره روشنایی و ۸ ساعت دوره تاریکی با شدت نور ۲۵۰۰ و۴۵۰۰ لوکس به مدت ۳۰ روز انتقال داده شد. شدت نور با دستگاه کولیس تنظیم گردید (شکل۲-۳).



شکل (۲-۳) A - دستگاه کولیس. B- گیاهچه‌های باززا شده در محیط MS فاقد زغال فعال. C- گیاهچه‌های باززا شده در محیط حاوی زغال فعال

۳-۴-۱-صفات اندازه‌گیری در ریزازدیادی

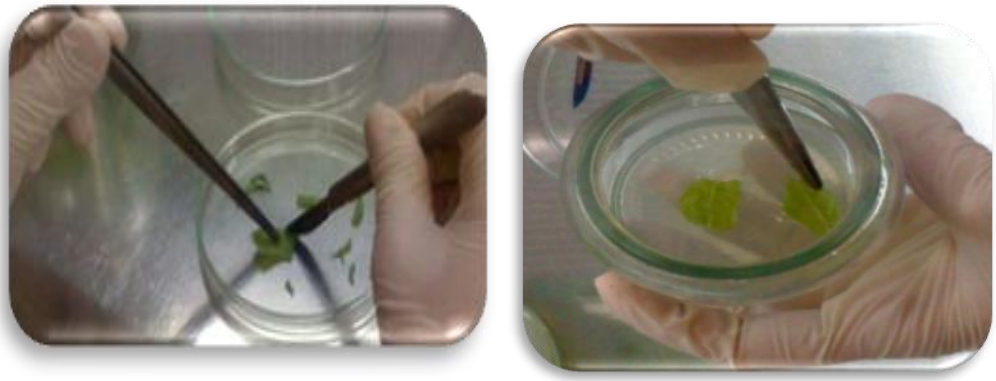
پس از گذشت چهار هفته از کشت، صفات تعداد، طول، فاصله برگ دوم و سوم و قطر ساقه‌ها با استفاده از دستگاه کولیس اندازه‌گیری شد.

۳-۵- شرایط کشت

به تمامی محیط‌های کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار افزوده شد. همچنین PH محیط‌های کشت در ۵/۸ تنظیم گردید. تمامی محیط‌های کشت و ظروف در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و با فشار ۱/۲ بار استریل گردیدند.

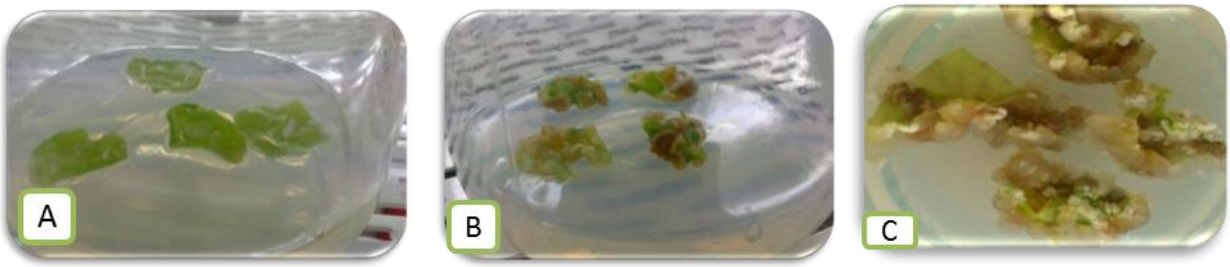
۳-۶- فاز کالزایی

پس از دست‌یابی به ریز نمونه های مناسب از طریق ریزازدیادی ، گیاهچه‌های ۲۱ روزه سترون از شیشه خارج و سپس برگها در قطعات یک الی دو سانتی‌متر مربع بریده شده و در محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم کننده‌های رشدی اکسین (2,4- D و NAA) و سایتوکنین (BAP و KIN) با غلظت‌های ۰، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر کشت شدند. برای آماده کردن اندام‌های برگ گیاه، ابتدا چهار برش از چهار طرف برگ انجام و بعد به وسیله اسکالپل استریل زخم‌هایی بر روی برگ ایجاد گردید و از سمت زیر برگ ریزنمونه بر روی محیط کشت قرار گرفت. ریز نمونه‌های برگی مناسب در شرایط استریل و زیر لامینار ایرفلو که قبلا با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شده بود در ظروف کشت حاوی محیط کالوس‌زایی انتقال یافتند.



شکل(۳-۳) کشت ریز نمونه‌های برگی در محیط کشت MS

برای هر تیمار سه تکرار و برای هر تکرار چهار ریزنمونه قرار داده شد. به منظور القای کالوس، ظروف کشت در اتاق رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز قرار داده شد.



شکل(۳-۴) مراحل تشکیل کالوس از ریزنمونه برگی (A -۵ روز B-۱۴ روز C-۲۱ روز پس ازکشت)

۳-۶-۱-صفات اندازه گیری شده در فاز کالزایی

طی گذشت چهار هفته درصد کالزایی، رنگ کالوس، فرم کالوس مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

۳-۶-۱-۱-درصد کالزایی

در این مرحله رنگ کالوس و فرم کالوس نیز مورد بررسی قرار گرفت. درصد کالزایی براساس نسبت تعداد ریزنمونه‌های دارای کالوس به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده در یک ظرف کشت محاسبه گردید.

۳-۶-۱-۲-اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس در محیط جامد

یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت، میانگین وزن آن‌ها به صورت میانگین مجموع وزن تر بررسی گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک کالوس‌های مورد نظر در ورق آلومینیومی بسته‌بندی و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت۲۴ ساعت در آون قرار داده شد و در نهایت کالوس و ورق آلومینیومی دوباره وزن شدند و وزن کالوس با کم کردن وزن ورق آلومینیومی به دست آمد.

جدول۳-۶- ترکیبات مورد استفاده از غلظت‌های 2,4-D، BAP، NAA وKIN برحسب میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS به منظور بررسی کالزایی

ترکیب هورمونی	سایتوکینین		اکسین	
	KIN	BAP	2,4-D	NAA
۱شاهد				
۲			۰/۵	
۳			۱	
۴			۲	
۵		۰/۵		
۶		۰/۵	۰/۵	
۷		۰/۵	۱	
۸		۰/۵	۲	
۹		۱		
۱۰		۱	۰/۵	
۱۱		۱	۱	
۱۲		۱	۲	
۱۳		۲		
۱۴		۲	۰/۵	
۱۵		۲	۱	
۱۶		۲	۲	
۱۷	۰/۵			
۱۸	۱			
۱۹	۲			
۲۰	۰/۵		۰/۵	
۲۱	۱		۰/۵	
۲۲	۲		۰/۵	
۲۳	۰/۵		۱	
۲۴	۱		۱	
۲۵	۲		۱	
۲۶	۰/۵		۲	
۲۷	۱		۲	
۲۸	۲		۲	
۲۹				۰/۵
۳۰				۱
۳۱				۲
۳۲		۰/۵		۰/۵
۳۳		۰/۵		۱
۳۴		۰/۵		۲
۳۵		۱		۰/۵
۳۶		۱		۱
۳۷		۱		۲
۳۸		۲		۰/۵
۳۹		۲		۱
۴۰		۲		۲
۴۱	۰/۵			۰/۵
۴۲	۰/۵			۱
۴۳	۰/۵			۲
۴۴	۱			۰/۵
۴۵	۱			۱
۴۶	۱			۲
۴۷	۲			۰/۵
۴۸	۲			۱
۴۹	۲			۲

۳-۷- بررسی محیط‌های کشت مختلف

پس از انتخاب بهترین تیمار هورمونی، جهت تعیین بهترین محیط کشت برای فاز سوسپانسیون سلولی، دو ریز نمونه‌ی برگی و کالوس به محیط کشت‌های N6، ER، WPM، MS وB5 انتقال داده شد. محیط‌های کشت در تنظیم کننده رشدی اکسین (2,4- D) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه شدند. برای هر محیط سه تکرار و برای هر تکرار چهار ریزنمونه قرار داده شد. به منظور کالزایی، ظروف کشت در اتاق رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز قرار داده شد. به تیمارهای کالزایی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار افزوده شد. PH محیط کشت ۵/۸ تنظیم گردید. تمام محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردیدند.. تیمارها به اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شدند.

۳-۷-۱- صفات مورد اندازه گیری

۳-۷-۱-۱- درصد کالزایی

در این مرحله رنگ، فرم و نیز میزان تردی کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت. درصد کالزایی براساس نسبت تعداد ریزنمونه‌های دارای کالوس به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده در یک ظرف کشت محاسبه گردید.

۳-۷-۱-۲-اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس در محیط‌های مورد نظر

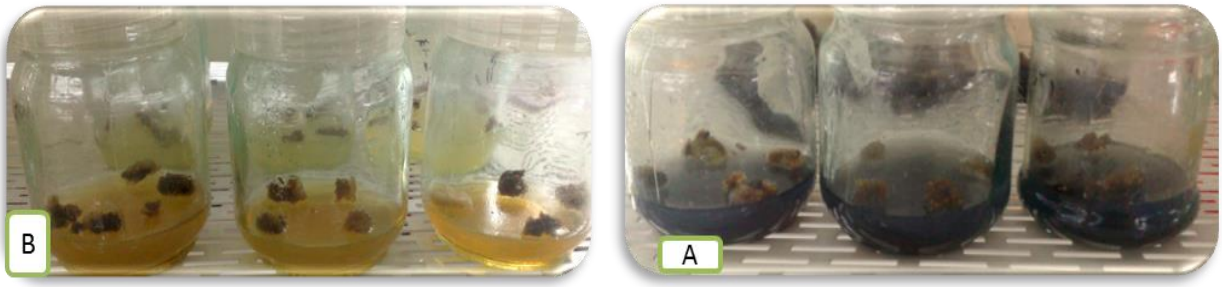
یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت، میانگین وزن آن‌ها به صورت مجموع وزن تر کالوس‌ها تقسیم بر تعدادکالوس‌ها بررسی گردید. برای اندازه‌گیری وزن تر کالوس‌ها به ورق آلومینیومی انتقال داده شد. این کار به سرعت انجام گرفت زیرا کالوس به سرعت آب خود را از دست می‌دهد و برای اندازه‌گیری وزن خشک کالوس‌های مورد نظر در ورق آلومینیومی بسته‌بندی شدند تا تبادل هوایی صورت نگیرد و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت۲۴ ساعت در آون قرار داده شد و در نهایت کالوس و ورق آلومینیومی دوباره وزن شدند و

وزن کالوس با کم کردن وزن ورق آلومینیومی به دست آمد. در مرحله بعد بهترین تیمارها و به کشت سوسپانسیون انتقال داده شد.

۳-۸-اثر ترکیبات مختلف آنتی اکسیدانی در کنترل میزان تولید فنول درکالوس‌ها

پس از دست‌یابی به غلظت مناسب هورمونی، ریزنمونه‌های کالوس در محیط MS وB5 با 2,4-D در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیترتهیه شد. سپس مقدار یک یا دو گرم زغال فعال[1]، ۱۰۰ یا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سیتریک اسید[2]،۵۰۰ یا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید آسکوربیک[3]، ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر زرد چوبه (*Curcuma longa l*) و مقدار ۲۵۰ یا ۵۰۰ میلی‌گرم درلیتر (پلی ونیل پیرولیدون)[4] PVP هر یک به طور مجزا به محیط‌های پایه اضافه شد. نمونه‌های شاهد محیط‌های پایه MS وB5 که فاقد آنتی اکسیدان‌ها بود، در نظر گرفته شد. زغال فعال، اسیدسیتریک، PVP و زردچوبه هر یک در غلظت‌های ذکر شده قبل از اتو کلاو به محیط کشت اضافه گردید ولی اسید آسکوربیک به دلیل عدم پایداری آن به دمای بالا، بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت در زیر لامینار و در شرایط استریل، زمانی که دمای محیط به کمتر از۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید توسط استریلیزاسیون فیلتری به محیط کشت اضافه شد. برای هر تیمار سه تکرار و برای هر تکرار چهار ریزنمونه قرار داده شد. به منظور القای کالوس، ظروف کشت در اتاق رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز قرار داده شد.

[1] -Activated charcoal
[2] -$C_6H_8O_7$
[3] - $C_6H_8O_6$
[4] -poly venil peroledon



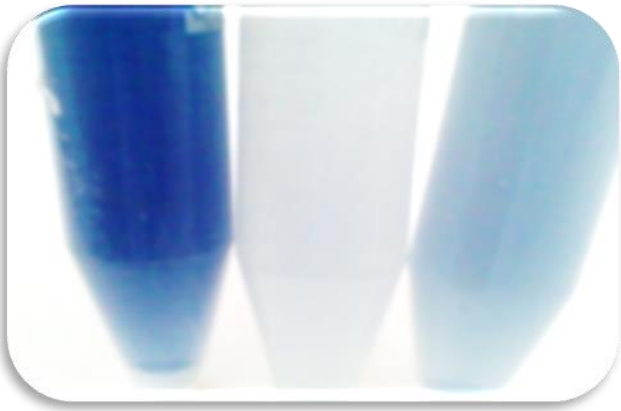
شکل(۳-۵) A-کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی زغال فعال B-کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی زرد چوبه

۳-۸-۱-اندازه‌گیری میزان فنول تولید شده در محیط کشت وکالوس‌ها

روش فولین سیوکالتیو (شریعتی فر و همکاران،۱۳۹۱) از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد. اساس کار در این روش احیا معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را درطول موج ۷۶۰ نانو متر نشان می‌دهد.

حجم مشخصی از محیط کشت‌ها و کالوس‌ها (۱۰ میلی‌لیتر)، جهت تخمین میزان فنول مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها و کالوس‌ها به لوله‌های فالکون انتقال داده شد، سپس به هر لوله مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه شد و با استفاده از یک میله شیشه‌ای کاملا مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر دوار، با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت، سپس محتویات به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، لایه رویی از کاغذ صافی واتمن شماره۴۲ عبور داده شد. محتوی فنول با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. به یک میلی‌لیتر از هر عصاره ۵۰۰ میکرو لیتر واکنش‌گر فولین سیوکالتیو اضافه شد، پس از سه دقیقه مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد کربنات سدیم به آن اضافه گردید مخلوط با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب مخلوط ۱ ساعت بعد در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. میزان ترکیبات فنولی *Mentha arvensis*L. بر مبنای مقادیر جذب ناشی از واکنش عصاره با معرف فولین سیوکالتیو و بر اساس مقایسه آن با محلول‌های استاندارد اسید گالیک و بر طبق معادله خط بدست آمده از منحنی استاندارد اسید گالیک Y=0.0096X

محاسبه گردید. میزان کل فنول بر اساس میزان معادل میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش شد. آزمایش سه بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش گردید.



شکل(۳-۶) ایجاد کمپلکس آبی رنگ

۳-۹-فاز دوم: کشت سوسپانسیون

۳-۹-۱- تهیه محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده در این مرحله شامل محیط کشت MS و B5 به همراه هورمون 2,4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و مقدار ۳۰ و۶۰ گرم ساکارز انتخاب شد. همچنین آگار از ترکیب محیط کشت‌ها حذف گردید.

۳-۹-۲- انتقال کالوس‌ها به محیط کشت سوسپانسیون

در این مرحله ابتدا با استفاده از اسکالپل کالوس‌های ترد[1]حاصل از فاز اول را در شرایط کاملا استریل به قطعات کوچک‌تر تقسیم کرده و به ۲۵ میلی‌گرم محیط کشت مایع انتقال داده شد.

[1] -friable callus

شکل(۳-۷) انتقال کالوس‌ها به محیط کشت مایع در فاز سوسپانسیون

۳-۹-۳- نگه‌داری و بهینه سازی شرایط کشت سوسپانسیون

محیط‌های سوسپانسیونی به شیکرانکوباتور با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. همچنین نمونه‌ها هر هفته واکشت شدند، این عمل تا تولید حجم مناسب از توده سلولی تکرار گردید. در هر واکشت مقدار مشخصی محیط کشت تازه به سوسپانسیون افزوده شد.

۳-۹-۴- اندازه گیری وزن خشک سوسپانسیون سلولی

جهت اندازه گیری وزن خشک کالوس‌ها از فیلترهای فلزی۶۰ (۲۵۰ میکرون) استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت‌ها به میزان ۱۰ میلی‌گرم در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه و استریل گردید سپس در زیر لامینار ایرفلو مقدار ۱۵ میلی‌لیتر محیط حاوی سلول‌های از فیلتر استریل عبور داده و به محیط تازه اضافه و ارلن‌ها به شکیر انکوباتور انتقال داده شدند. به فاصله هفت روز یک‌بار و به مدت ۴ هفته وزن خشک هر یک از

نمونه‌ها با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی انجام گرفت. برای اندازه‌گیری وزن خشک، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس وزن خشک سلول‌ها بررسی شد.

شکل (۳-۸) شمایی از فیلترهای فلزی ۲۵۰ میکرون

۳-۹-۵- اندازه گیری سرعت رشد سلولی در محیط کشت سوسپانسیون:

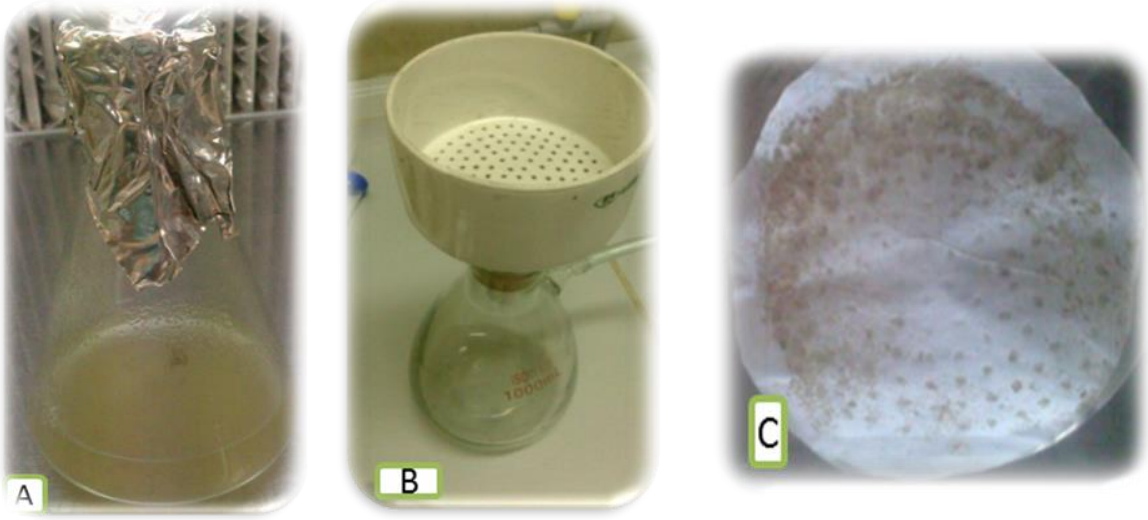
برای این منظور ابتدا محیط کشت‌ها به میزان ۱۰ میلی گرم در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه و استریل گردید در زیر لامینار ایرفلو مقدار ۱۵ میلی لیتر محیط حاوی سلول‌های از فیلتر استرل عبور داده و به محیط تازه اضافه و ارلن‌ها به شکیر انکوباتور انتقال داده شدند. به فاصله یک روز در میان به مدت ۴۰ روز وزن خشک هر یک از نمونه‌ها با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی انجام گرفت. برای اندازه‌گیری وزن خشک، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس وزن خشک سلول‌ها بررسی شد.

به فاصله یک روز در میان شاخص رشد با استفاده از فرمول زیر بررسی گردید:

$$\text{Growt index (GI)} = \frac{fw - dw}{dw}$$

فرمول(۳-۲) اندازه‌گیری شاخص رشد سلول

که در آن W_0 بیوماس اولیه و W_Fبیوماس نهایی می‌باشد.

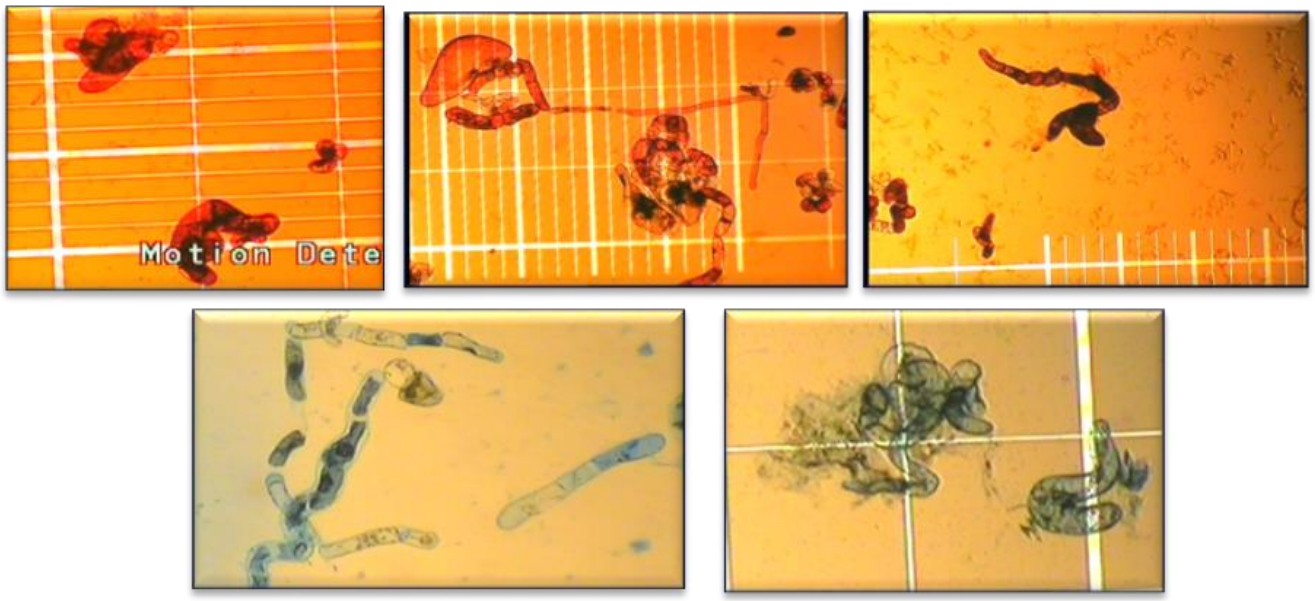


شکل(۳-۹) اندازه‌گیری وزن خشک سلول(A - محیط سوسپانسیون صاف شده به وسیله مش B – قیف بوخنر C– کاغذ صافی واتمن به همراه سلول‌های خشک شده)

۳-۹-۶-اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها

شمارش تعداد سلول‌ها دقیق‌ترین روش اندازه‌گیری میزان رشد در کشت سوسپانسیون سلولی می‌باشد. در این روش تعیین تعداد سلول‌ها در واحد حجم توسط لام هموسیتومتر (hemocytometer) انجام شد. بدین منظور سوسپانسیون سلولی باید طوری رقیق شود که بتوان اندازه‌گیری را حداقل سه مرتبه تکرار نمود. همچنین تعداد کل سلول‌های ثبت شده باید بیش از ۱۰۰۰ عدد باشد. باید توجه داشت که توده‌های سلولی منفرد درشت در بعضی از سوسپانسیون‌ها موجب بارگیری ناقص مخزن شمارش لام هموسیتومتر و در نتیجه بروز خطا در شمارش سلول‌ها می‌شود. به همین دلیل ابتدا محلول سوسپانسیون با آب مقطر دیونیزه به میزان ۱/۲رقیق شد. برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها از محلول safranin (رنگ قرمز) و یا evans blue (رنگ آبی) استفاده شد. ۰/۵ماکرو لیتر از محلول سوسپانسیون را بر روی لام قرار داده سپس مقدار ۰/۵ماکرولیتر محلول safranin و یا evans blue به آن اضافه شد. آن‌گاه لامل روی آن قرار داده شد و پس از سه دقیقه رنگ با آب مقطر شتشو شد و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. سلول‌هایی که کاملا رنگ گرفته بودند مرده و سلول‌هایی که تنها دیواره

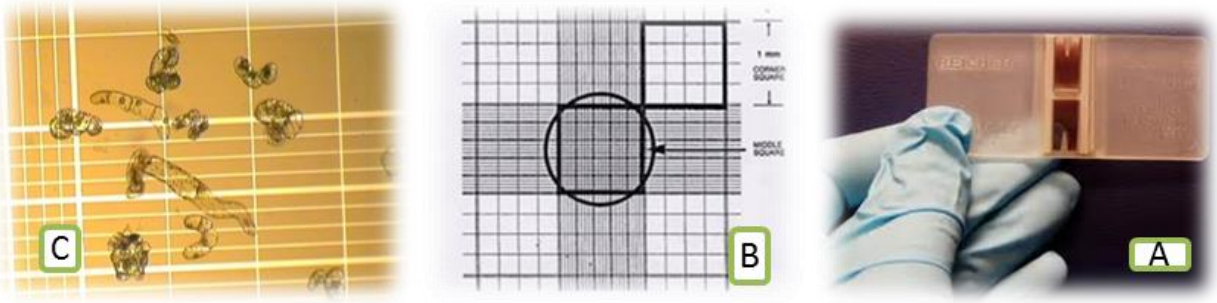
آن‌ها رنگ شده سلول زنده بودند. سه دقیقه پس از رنگ آمیزی، سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ مشاهده و با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش گردید.



شکل(۳-۱۰) تصاویری از سلول‌های کاملا رنگ شده که نشان دهنده مرگ سلول‌ها است.(رنگ آمیزی توسط Safranin و Evans blue)

۳-۹-۶-۱-نحوه کار با لام هموسایتومتر

یک شبکه کامل در لام هموسایتومتر شامل نه مربع است که هر کدام یک میلی‌متر مربع و عمق هر مربع ۰/۱ میلی‌متر است. حجم نهایی هر مربع در این عمق ۱۰۰ نانو متر است. ناحیه شمارش مرکزی هموسایتومتر شامل ۲۵ مربع بزرگ و هر مربع دارای ۱۶ مربع کوچکتر است. حجم واقع در یک مربع بزرگ ۰/۱ میلی‌متر مکعب می‌باشد. برای شمارش سلول‌های بزرگ تنها سلول‌هایی را که بر روی خطوط دو لامل قرار گرفته بر روی مربع‌های بزرگ هستند شمارش می‌شوند تا از شمارش دوباره سلول‌ها اجتناب شود .محلوها باید به میزانی رقیق شود که سلول‌ها روی هم قرار نگیرد. برای سلول‌های بزرگ می‌توان تنها سلول‌های موجود در چهار مربع بزرگ و میانی را شمارش کرد (شکل ۳-۱۱).



شکل(۳-۱۱) A-شمایی کلی از لام همو سایتومترB -سطح کامل هموسایتومترC -شمارش سلول‌ها به وسیله لام در زیر میکروسکوپ

۳-۹-۷-الیسیتورها

۳-۹-۷-۱-تهیه استوک متیل جاسمونات (methyl jasmonate)

ماده متیل جاسمونات در غلظت ۹۵ درصد محلول آبی از شرکت زیگما (با کد ۳۹۲۷۰۷) به مقدار ۵ میلی لیتر خریداری گردید. سپس استوک آن با غلظت ۲/۱۱ مولار تهیه شد .با استفاده از فرمول N1V1=N2V2 در غلظت های ۱و۲ میکرولیتر تهیه گردید

۳-۹-۷-۲ تهیه کیتوزان(chitosan)

ابتدا مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر محلول ۱ درصد استیک اسید تهیه شد. سپس ۱ گرم پودر کیتوزان در محلول استیک اسید در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت حل گردید. اسیدیته محلول با NaOH به ۵/۷ رسید. محلول کیتوزان در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ استریل شد.

۳-۹-۷-۳- القای الیسیتورها در فاز سوسپانسیون سلولی

پس از تکثیر سلول‌ها و رسیدن به فاز رشد مطلوب، تمام سوسپانسیون‌ها با الیسیتورهای متیل‌جاسمونات در غلظت‌های۰/۰۰۴۴و ۰/۰۰۸۹ µM در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت وکیتوزان در غلظت‌های ۵ و۱۰میلی‌گرم

در لیتر در دو بازه زمانی ۷۲ و ۹۶ ساعت به میزان ۵۰ میلی‌لیتر محیط سوسپانسیون تیمار شدند. سلول‌های رشد یافته در محیط سوسپانسیون سلولی، بعد از اعمال تیمار، تا زمان اندازه‌گیری ترکیبات ثانویه جهت آنالیز در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

۳-۹-۸- تهیه عصاره از سلول‌های تیمار شده

جهت تهیه عصاره مقدار ۱۰ میلی لیتر از مخلوط سلول‌ها و محیط کشت در لوله‌های فالکون ریخته سپس مقدار ۳ و ۶ میلی لیتر (نسبت ۲:۱) به ترتیب از حلال‌های دی کلرومتان و N پنتان به آن اضافه شد . لوله‌ها به شیکرانکوباتور با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۷ساعت انتقال داده شدند. لوله‌ها به دستگاه سانتریوفیوژ با شرایط ۵۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند در این مرحله دو فاز تشکیل شد. حلال‌ها به همراه ترکیبات فرار در فاز بالا و محتویات سلولی و ترکیبات قطبی در فاز پایین قرار گرفت. مقدار ۱میلی لیتر از فاز رویی برداشته شد و جهت آنالیز مواد استفاده گردید.

۳-۹-۸-۱- استفاده از GC/Mass

دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent 6890 با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 بود. برای شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، نمونه که توسط n- هگزان رقیق شده بود به مقدار یک میکرولیتر به دستگاه GC/Mass تزریق شد. برنامه دمائی ستون بصورت ذیل تنظیم گردید. دمای ابتدائی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد و سه دقیقه توقف در این دما و زمان پاسخ ۷۵ دقیقه بود. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بصورت split یک به ۳۵ بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل

با سرعت جریان(فلو) ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. محدوده اسکن مس‌ها از ۴۰ تا ۵۰۰ تنظیم گردید و از نرم افزار chemstation استفاده شد. شناسائی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (Adams,2011).

جدول شماره ۳-۷- مشخصات دستگاه GC/Mass مورد استفاده

مدل دستگاه GC	Agilent 6890
مدل دستگاه Mass	Agilent 5973
نوع ستون	BPX5
طول ستون	30 m
قطر داخلی ستون	0.25 µ
دمای اولیه ستون	50
دمای نهایی ستون	300
نوع گاز حامل	He
دتکتور	Mass

۳-۱۰- آنالیز داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار طراحی و انجام شد. برای آزمایشات محیط های کشت جامد برای هر تکرار چهار ریزنمونه در نظر گرفته شد. به منظور آنالیز داده‌ها از نرم افزار آماری MSTATC وSAS استفاده شد و تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد گروه بندی و نمودار ها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم شدند.

فصل چهارم

نتایج وبحث

۱-۴- باززایی

در این مرحله اثر نوع محیط کشت، شدت نور و زغال فعال بر کشت بافت گیاه دارویی *Mentha arvensis* بررسی گردید.

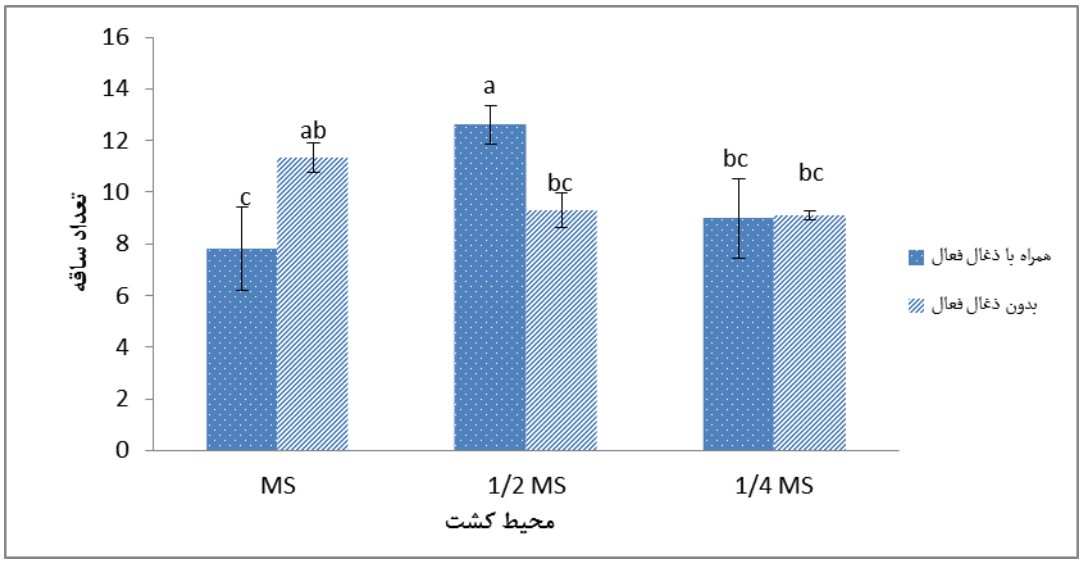
ریز نمونه‌های کشت شده پنج روز پس از کشت شروع به رشد کردند. تجزیه واریانس نشان داد که در صفت تعداد نوساقه اثر متقابل محیط کشت و زغال فعال در سطح پنج درصد و در صفت قطر ساقه فاکتور نور در سطح یک درصد و اثر متقابل محیط کشت و زغال فعال در سطح پنج درصد معنی دار بودند در حالی‌که سایر فاکتورها تاثیر معنی داری بر صفات مورد بررسی نشان نداد (جدول۱-۴).

جدول۴-۱ – جدول تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، زغال فعال و نور و اثرات متقابل بین آنها بر تعداد و طول نو ساقه‌ها، فاصله بین برگ دوم و سوم و قطر ساقه یک ماه پس از کشت

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		تعداد نوساقه	طول نوساقه	فاصله بین برگدوم و سوم	قطر ساقه
نوع محیط کشت (A)	۲	۰/۳۸ ns	۰/۰۳۷ ns	۰/۰۷۹ ns	۰/۰۰۱ ns
زغال فعال (B)	۱	۰/۱۳ ns	۰/۳۳۴ ns	۰/۱۸۹ ns	۰/۰۰۶ ns
محیط کشت × ذغال فعال (A×B)	۲	۱/۲۴ *	۰/۲۲۱ ns	۰/۱۴۶ ns	۰/۰۰۹ *
نور (C)	۱	۰/۰۹۶ ns	۰/۲۹۱ ns	۰/۰۱ ns	۰/۰۲۱ **
محیط کشت × نور (A×C)	۲	۰/۷۰۲ ns	۰/۳۴۶ ns	۰/۱۳۷ ns	۰/۰۰۶ ns
زغال فعال× نور (A×C)	۱	۰/۱۴۱ ns	۰/۰۷۲ ns	۰/۰۱۷ ns	۰/۰۰۵ ns
محیط کشت × زغال فعال× نور (A×B×C)	۲	۰/۲۶۷ ns	۰/۸۹۵ ns	۰/۰۸ ns	۰/۰۰۱ ns
خطا	۲۴	۰/۳۴۳	۰/۳۱۱	۰/۰۸۱	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (٪)		۱۸/۹۹	۲۱/۰۲	۲۶/۸۹	۲۶/۹۹

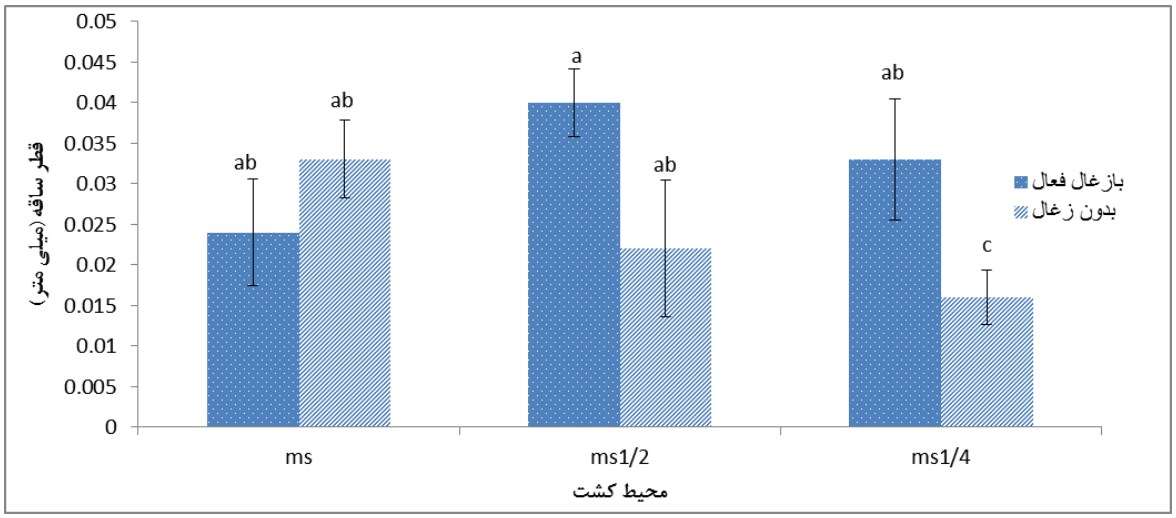
*اختلاف معنی دار در سطح یک درصد، ** اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد و ns بیانگرعدم اختلاف معنی دار است

بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش محیط کشت، اختلاف معنی داری بین محیط کشت‌ها وجود داشت (شکل۴-۱و ۴-۲). محیط کشت $MS_{1/2}$ با زغال فعال بیشترین تاثیر را درتعداد ساقه‌ها (۱۲/۶) داشت. اثر مثبت زغال فعال بر تکثیر گیاهان از طریق کشت درون شیشه‌ای اثبات شده است. از این ماده جهت باند شدن و جذب فنول‌ها و دیگر ترکیباتی که مانع رشد گیاه می‌شوند استفاده می‌گردد. اضافه نمودن زغال فعال به محیط کشت روشی مفید جهت رشد گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد (اطرشی و همکاران،۱۳۸۹).



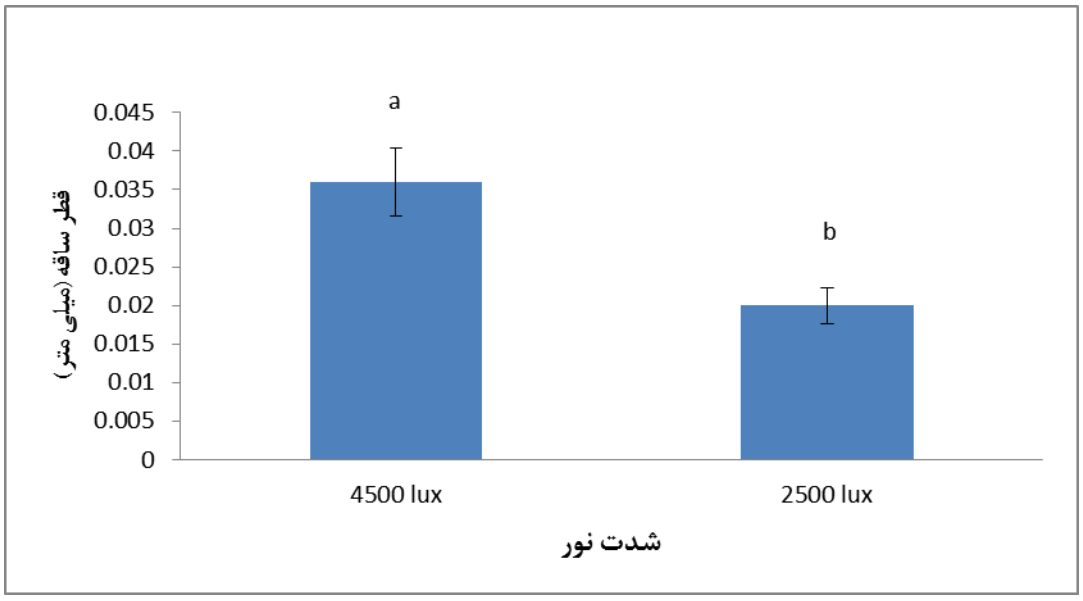
شکل (۴-۱) مقایسه میانگین اثر محیط کشت و زغال فعال بر تعداد ساقه *Mentha arvensis*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

مقایسه میانگین حاصل از داده‌ها نشان داد (شکل ۲-۴) که بیشترین قطر ساقه‌ها (۰/۰۳۵ میلی متر) در محیط $MS_{1/2}$ همراه با دو گرم در لیتر زغال فعال مشاهده شد. همچنین کمترین قطر نوساقه‌ها در محیط $MS_{1/4}$ و بدون زغال فعال مشاهده گردید



شکل (۴-۲) مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر قطر ساقه *Mentha arvensis* . حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

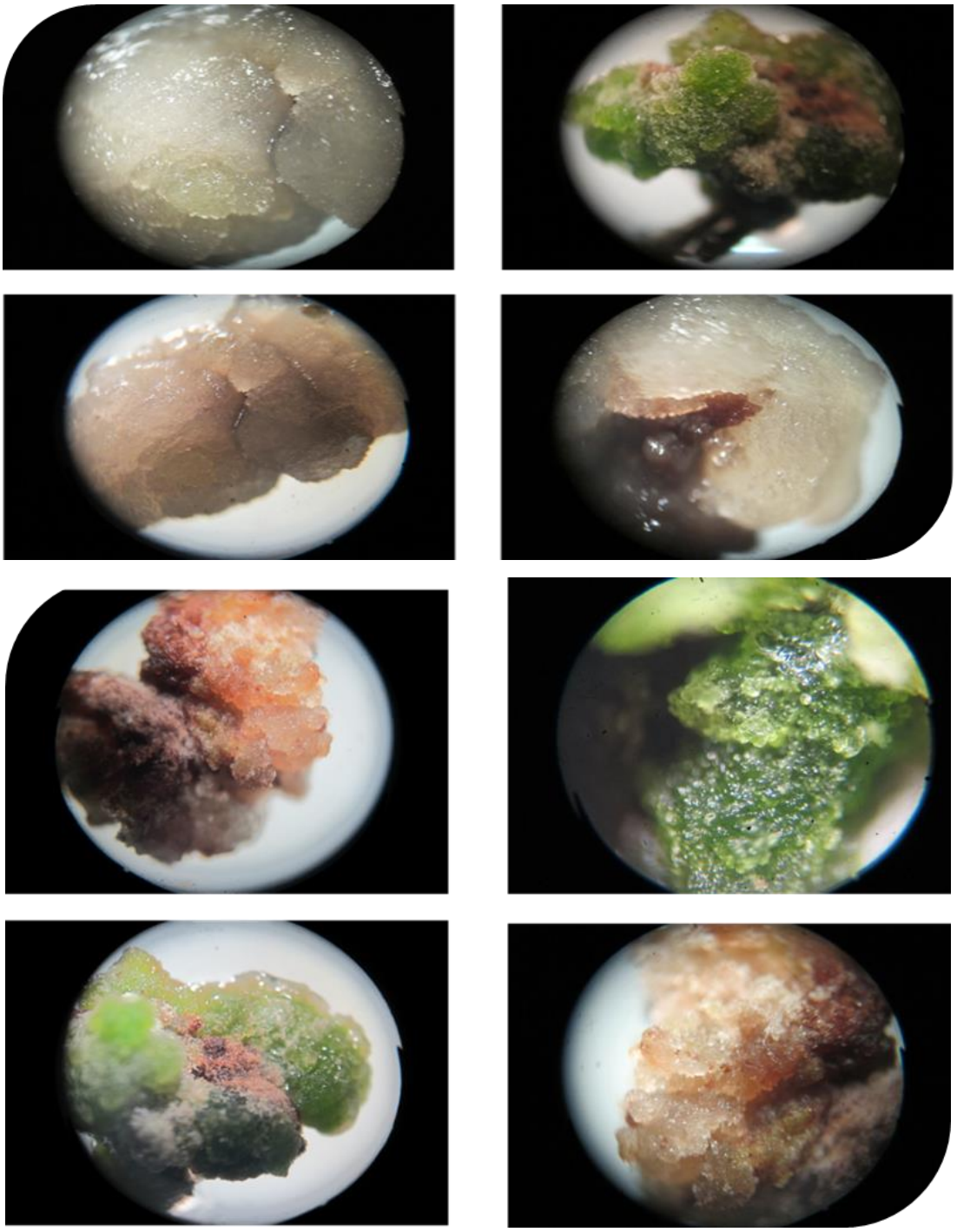
از سویی افزایش قابل توجهی در قطر ساقه (۰/۰۴ میلی‌متر) در شدت نور ۴۵۰۰ لوکس مشاهده شد (شکل ۱-۴). نور صرف نظر از فراهم کردن منبع انرژی برای فتوسنتز، اثرات متعددی روی رشد گیاه دارد. مقدار کربوهیدرات‌ها در شدت‌های پایین و یا تاریکی کاهش می‌یابد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که نور در تمایز جوانه‌ها وغالبیت انتهایی ساقه تاثیر می‌گذارد و باعث به وجود آمدن ساختارهای تمایز یافته و انشعابات ساقه‌ها می‌شود (زارعی و همکاران،۱۳۹۲). این بررسی نشان داد که نوع محیط کشت تاثیر معنی داری بر تعداد و طول و قطر نو ساقه ندارد. بنابراین با توجه به هزینه‌های بالا در تهیه محیط‌های کشت بهتر است که از محیط کشت با غلظت‌های کمتر نمک‌ها استفاده نمود.



شکل (۴-۳) مقایسه میانگین اثر شدت نور در قطر ساقه*Mentha arvensis*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

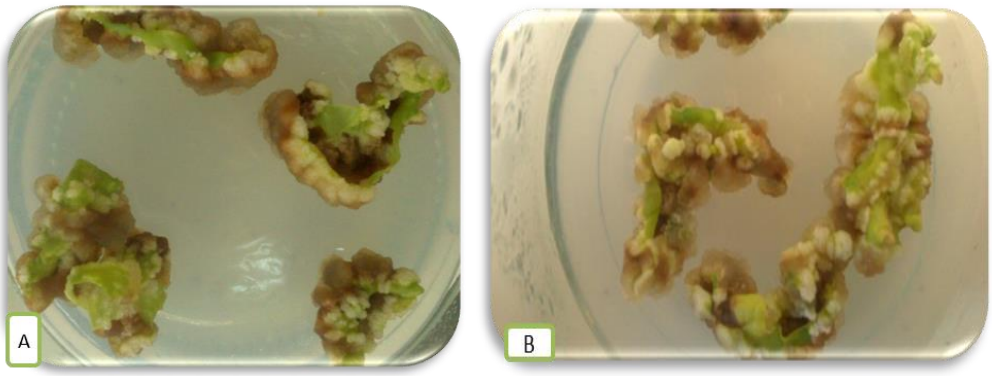
۲-۴-فاز اول کالزایی

بررسی ریز نمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالزایی نشان داد که اولین توده‌های کالوس دو هفته پس از کشت نمونه‌های برگی در محیط کالزایی ایجاد شدند و پس از گذشت۳۰ روز کالوس‌های بزرگ تشکیل شد. کالوس‌ها ترد، شکننده و آبکی و با دامنه رنگی از سفید ،کرم، سبز و قهوه‌ای رنگ مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش بیشترین درصد کالزایی (۱۰۰٪) در محیط 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با سایتوکنین‌ها صورت گرفت و اختلاف معنی داری بین تیمارهای 2,4-D با KIN و 2,4-D با BAP وجود نداشت این در حالی بود که درصد کالزایی در محیط کشت حاوی NAA به تنهایی و یا ترکیب با سایتوکنین‌ها متفاوت بود. درصد کالزایی در نمونه شاهد و سایتوکنین‌ها صفر بود. بیشترین میزان وزن تر در تیمار هورمونی 2,4-D به تنهایی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (۳/۵۶گرم) و بیشترین وزن خشک در محیط کالزایی، غلظت ۰/۵و۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۱/۸۸و۱/۷۴ گرم) مشاهده شد.



شکل(۴-۴)-کالوس‌های بهینه تشکیل شده از برگ در محیط MS حاوی (۵/ میلی‌گرم در لیتر ۲,۴-D) پس از گذشت ۳۰ روز.

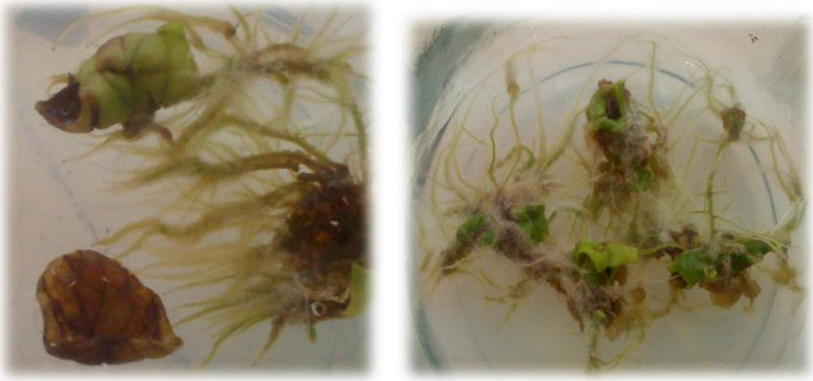
همچنین تاثیر 2,4-D+KIN درمقادیر به ترتیب۱و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در القای کالوس در گیاه نعناع مشاهده شد.



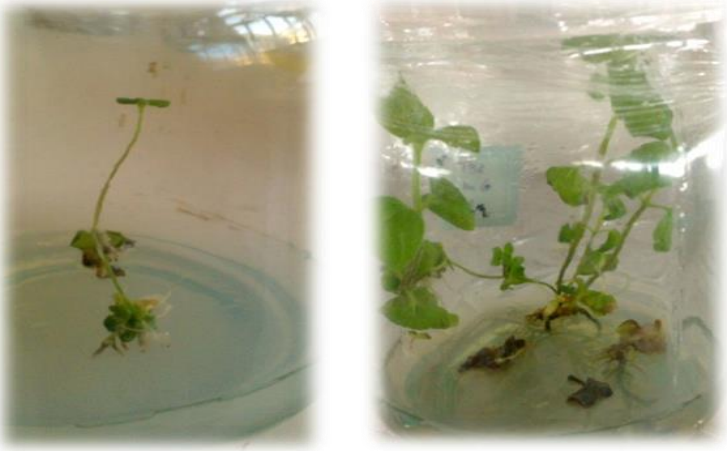
شکل (۴-۵) تصویرکالوس‌های بهینه تشکیل شده از ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی(A - 2,4-D ۰/۵mg/lوBAP۱mg/l و B - KIN ۱ mg/l -2,4-D ۰/۵ mg/l)

کالوس‌های تولید شده در محیط کشت حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با سایتوکنین‌ها در این مدت زمانی، کالوس اندک تولید و به شدت بازا شده و تولید ریشه‌های فراوان نمود. درترکیبات هورمونی NAA+BAP و NAA+KIN بازایی از کالوس‌ها مشاهده گردید (شکل۴-۶). طی گزارشی، استفاده از NAA و KIN در محیط‌های کشت MS باعث ایجاد نوساقه از کالوس‌ها در دو گیاه *M.arvensis* و *M.piperita* شده است (Jian *etal*,1999). همچنین استفاده از مقادیر ۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب از هورمون‌های NAA و BAP به مدت ۲۵ روز در محیط MS باعث توسعه شاخه از کالوس‌ها در گیاه *M.arvensis* می‌شود که با آزمایش انجام گرفته مطابقت داشت (Johnson *etal*,2011).

شکل(۴-۶) ریزنمونه باززا شده به صورت مستقیم (محیط MS حاویKIN ۱ ml)

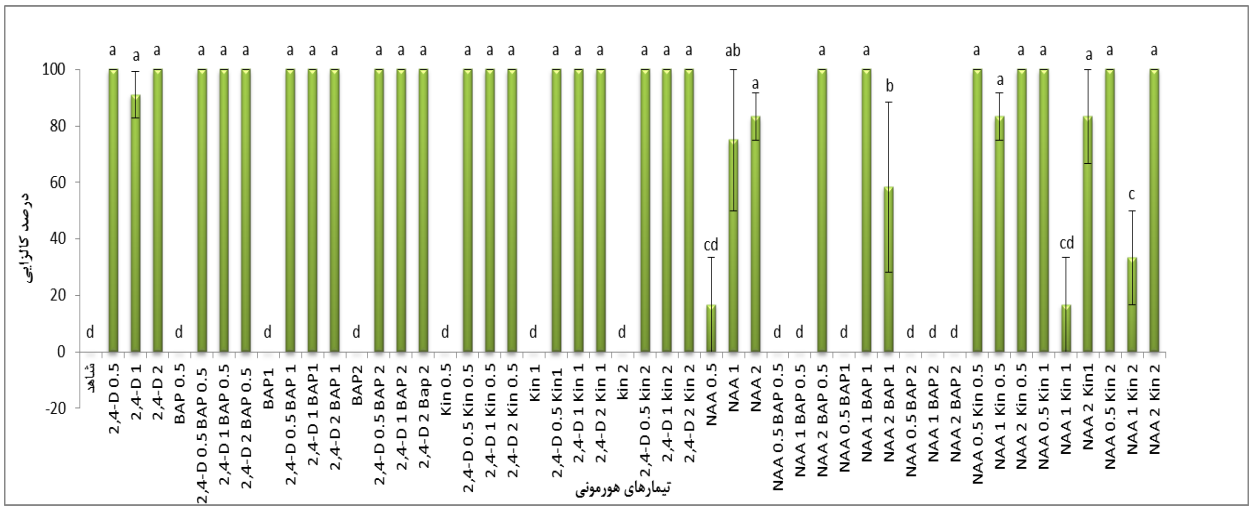


شکل(۴-۷) ریزنمونه باززا شده به صورت مستقیم(محیط MS حاوی NAA۱ ml)



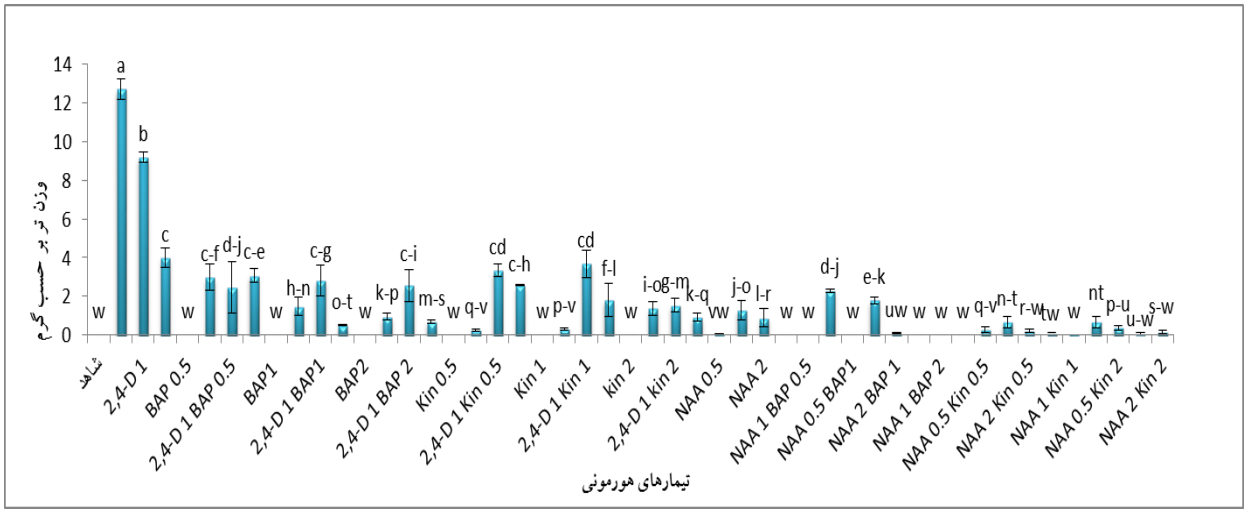
شکل(۴-۸) ریزنمونه باززا شده به صورت مستقیم (محیط MS حاویKIN ۱ ml و BAP ۰/۵ ml)

استفاده از غلظت‌های مختلف NAA به عنوان تنها منبع هورمونی بکار رفته جهت کالزایی نشان داد که میزان تولید کالوس در این تیمارها به طور معنی داری کمتر از میزان کالوس در محیط کشت‌های حاوی 2,4-D بود که این امر نشان دهنده حضور 2,4-D جهت کالزایی گیاه نعناع است.



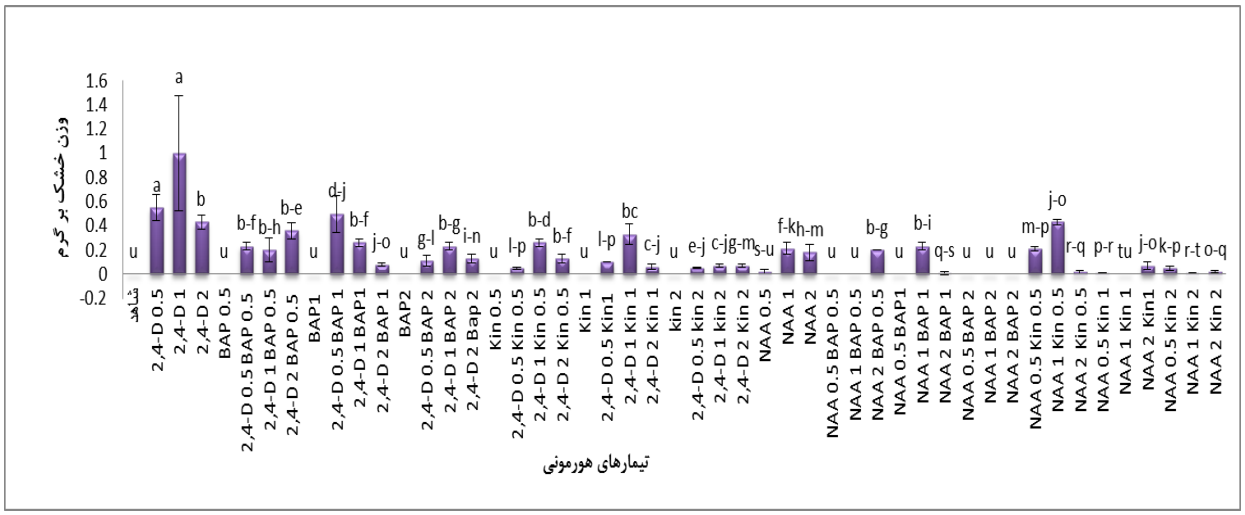
شکل (۴-۹) مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر درصد کالوس زایی گیاه *Mentha arvensis*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

بیشترین مقدار وزن تر کالوس (۱۲/۳ گرم) در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد



شکل(۴-۱۰) مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر وزن تر کالوس‌ها در گیاه *Mentha arvensis* . حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

همچنین، بیشترین مقدار وزن خشک بر روی محیط MS با ۰/۵ و۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D (۱/۸۸و۱/۷۴ گرم) به تنهایی مشاهده شد.



شکل (۴-۱۱) مقایسه میانگین اثر هورمون‌های مختلف بر وزن خشک کالوس‌ها در گیاه *Menta arvensis L* . حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

۳-۴-بررسی محیط‌های کشت

پس از تعیین بهترین غلظت هورمونی به منظور کالزایی (۰/۵ میلیگرم در لیتر 2,4-D) جهت تعیین مناسبترین محیط کشت ریزنمونه‌های برگ و کالوس در محیط‌های N6، ER وWPM، MS، B5 حاوی ۰/۵ میلی 2,4-D کشت گردیدند.

اولین توده‌های کالوس دو هفته پس از کشت در نمونه‌های برگی در محیط کال زایی N6،ER وWPM مشاهده شد ولی در محیط کشت‌های MS و B5 رشد چندانی صورت نگرفت و ریز نمونه‌های برگی خشک شدند. پس از گذشت ۳۰ روز اندازه گیری وزن تر و خشک صورت گرفت. کالوس‌های رشد یافته از برگ در این محیط‌های کشت با اندازه کوچک به رنگ قهوه‌ای و اکثرا بازا شده بودند. در ریز نمونه‌های کالوس کشت شده در محیط MS، B5و N6، WPM وER بزرگ و به رنگ کرم تا قهوه‌ای تشکیل شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر نوع

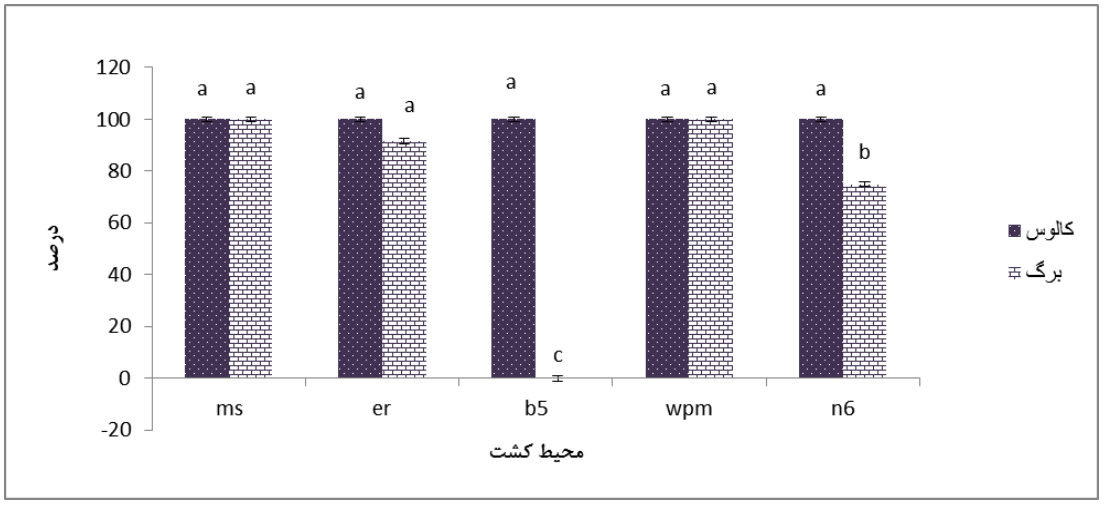
محیط کشت و ریزنمونه و اثر متقابل این دو بطور معنی داری در سطح ۰/۱ درصد بر درصد و وزن تر کالوس‌ها داشته ولی اثر محیط کشت بر وزن خشک کالوس‌ها معنی‌دار نبوده است

جدول(۴-۲) تجزیه واریانس اثرنوع محیط کشت وریز نمونه و اثر متقابل آن‌ها در وزن تر وخشک و درصد کالزایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد کالزایی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس
نوع محیط کشت (فاکتور A)	۴	۲۶۷۷/۰۸**	۱۸/۱۵۶**	۰/۰۲ns
ریزنمونه (فاکتور B)	۱	۵۳۳۳/۳۳**	۱۶۳/۴۵۵**	۰/۸۸۱**
اثر متقابل نوع محیط کشت× ریزنمونه (A×B)	۴	۲۶۷۷/۰۸**	۷۶/۸۵۲**	۰/۱۳۹**
خطا	۲۰	۸۳/۳۳	۰/۹۶۴	۰/۰۰۹
ضریب تغیرات		۱۰/۵۳٪	۲۰/۵۲٪	۳۴/۸۱٪

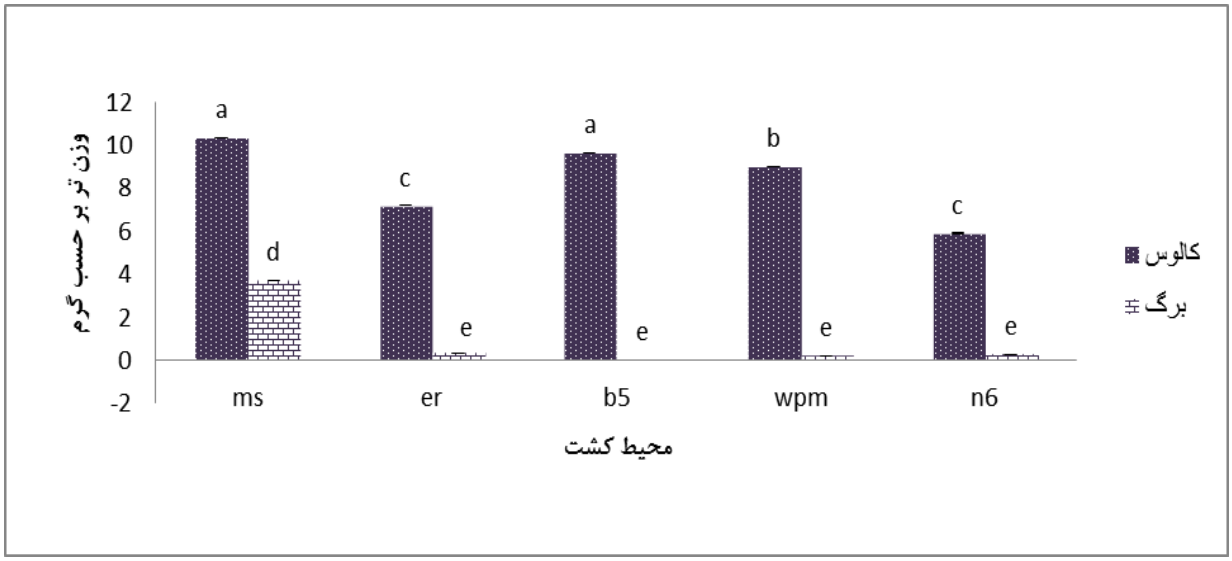
*اختلاف معنی دار در سطح یک درصد، ** اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد و ns بیانگرعدم اختلاف معنی دار است

نتایج حاصل از مقایسه میانگین بر درصد کالزایی نشان داد تفاوت معنی داری بین محیط کشت‌های MS، B5، WPM وER در ریزنمونه برگ و کالوس وجود نداشت ولی با محیط N6 و B5 در ریز نمونه برگی تفاوت معنی‌داری داشت.



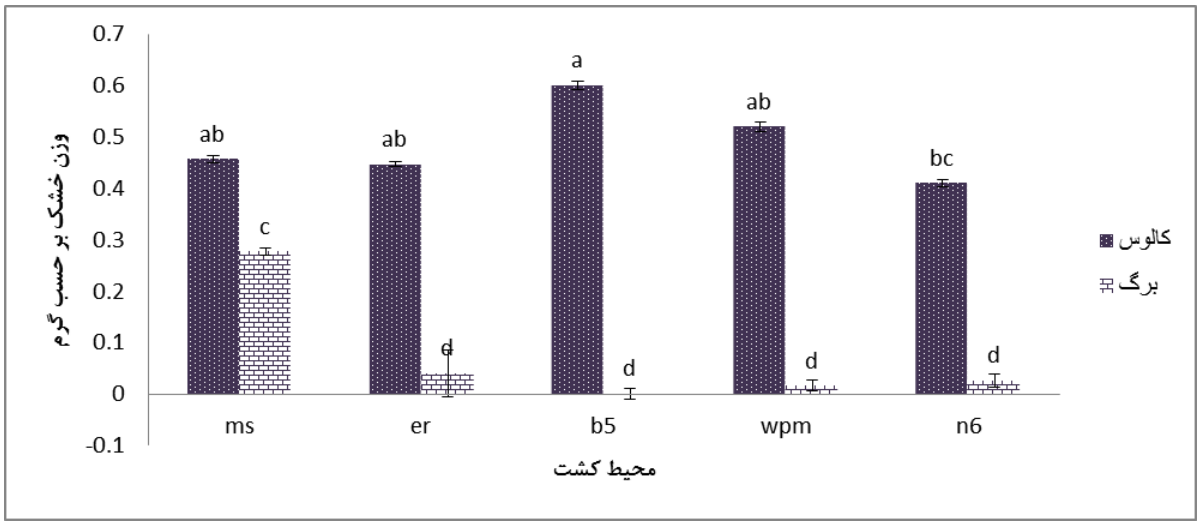
شکل(۴-۱۲) مقایسه میانگین درصد کالزایی در محیط‌کشت‌های تعیین شده. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq 0.05$.

در مقایسه میانگین بین وزن تر ریزنمونه کالوس در محیط کشت‌های تعیین شده تفاوت معنی داری بین محیط کشت MS و B5 وجود نداشت و بیشترین وزن تر (۱۰/۳۳ و۹/۶۳ گرم) در این محیط کشت‌ها کمترین میزان نیز در محیط‌های ER و N6 به میزان (۱/۷ و ۸/۵ گرم) مشاهده گردید. همچنین در ریز نمونه برگی بیشترین میزان کالزایی در محیط MS(۳/۷ گرم) مشاهده گردید و تفاوت معنی‌داری بین سایر محیط کشت‌ها مشاهده نشد.



شکل(۴-۱۳) مقایسه میانگین میزان وزن تر کالزایی در محیط‌کشت‌های تعیین شده. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

در مقایسه میانگین وزن خشک بین محیط کشت‌ها بیشترین میزان وزن خشک (۰/۶ گرم) در محیط B5 و کمترین میزان وزن خشک (۰/۴۱گرم) نیز در محیط N6 با ریزنمونه کالوس مشاهده شد



شکل (۴-۱۴) مقایسه میانگین میزان وزن خشک کالزایی در محیط‌کشت‌های تعیین شده. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

۴-۴ اندازه‌گیری میزان فنول تولید شده در محیط کشت و کالوس‌ها

بررسی ریز نمونه‌های برگی کشت شده در محیط کالزایی نشان داد که اولین نشانه های کالزایی دو هفته پس از کشت در ریزنمونه‌های برگی مشاهده گردید و پس از گذشت ۵-۴ هفته کالوس ها به بیشترین اندازه ممکن رسیدند. کالوس‌های تشکیل شده، ترد و یا آبکی و به رنگ قهوه‌ای روشن یا تیره مشاهده شد .

کالوس‌ها پس از گذشت ۱۴ روز از کشت در محیط‌های حاوی مواد آنتی اکسیدانی شروع به رشد کردند و پس از ۳۵ روز اندازه‌گیری فنول در محیط کشت‌ها و کالوس انجام گرفت. در میان محیط کشت‌ها، کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی زغال فعال رشد چندانی نکرده بود و رنگ کالوس‌های رشد یافته تیره بود. در حالی که در دیگر محیط کشت‌ها رشد کالوس‌ها قابل توجه و رنگ کالوس‌ها روشن‌تر شده بود.

اسیدگالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت. میزان تام فنولیک بر اساس میزان معادل میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش شد

شکل(۴-۱۶) A-کالوس رشد یافته در محیط کشت حاوی زرد چوبه B- کالوس رشد یافته در محیط کشت حاوی PVP و C- کالوس‌های رشد یافته در محیط حاوی زغال فعال

جدول(۴-۳) تجزیه واریانس اثر آنتی‌اکسیدان‌ها و نوع محیط کشت و اثرمتقابل آن‌ها بر میزان کنترل فنول کالوس‌ها در دو ریز نمونه برگ و کالوس

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میزان فنول کالوس	میزان فنول محیط کشت
نوع آنتی اکسیدان ها (فاکتورA)	۱۰	۸۰۸۴/۵۹۶**	۲۳۱/۳۰۹**
نوع محیط کشت (فاکتورB)	۱	۵۴۳۵/۶۵۲*	۱/۷۹۸ns
اثر متقابل نوع آنتی اکسیدان‌ها ومحیط کشت (A×B)	۱۰	۱۵۷۷/۳۰۱ns	۵۳/۸۸۹ns
خطا	۴۴	۱۲۷۶/۹۱۴	۲۱۷/۸۵۶
ضریب تغیرات		۲۲/۴۷٪	۲۶/۹۲٪

*اختلاف معنی دار در سطح یک درصد، ** اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد و ns بیانگرعدم اختلاف معنی دار است

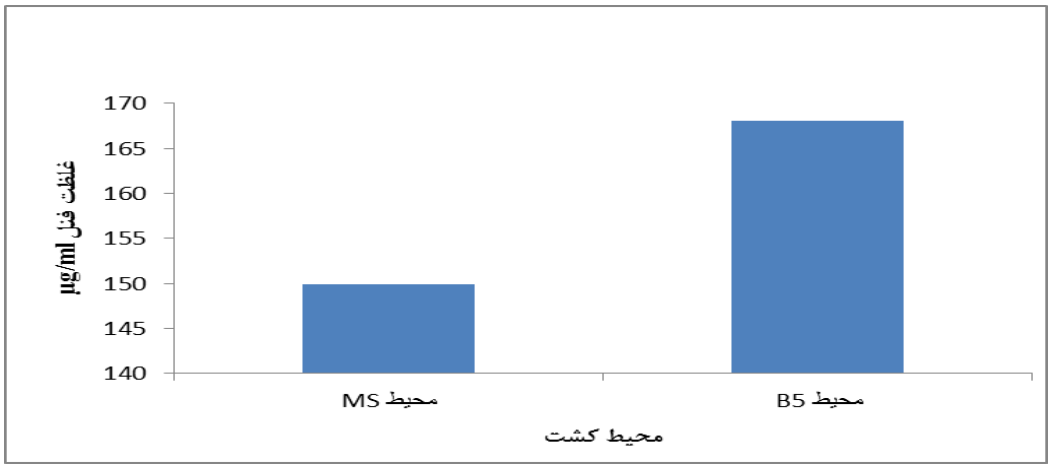
بر اساس نمودار مقایسه میانگین بیشترین میزان فنل در محیط کشت حاوی زردچوبه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان (۱۲۷ µg/mlit) و کمترین میزان فنل در محیط کشت حاوی زغال فعال در غلظت یک گرم به میزان (۲۷/۸ µg/mlit) مشاهده شد . کمترین میزان فنل کالوس‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی زرد چوبه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان (۷۲/۹ µg/mlit) و

بیشترین میزان فنل در کالوس‌های حاوی زغال فعال در غلظت (۲گرم) به میزان (۱۷۵ µg/mlit) مشاهده شد. استفاده از زرد چوبه (*Cucurma longa*) در محیطی که فعالیت اکسیداسیونی زیاد صورت می‌گیرد، باعث کاهش فرایند تولید مواد فنلی می‌شود زردچوبه به عنوان طعم دهنده، اغلب به صورت پودر مورد استفاده قرار می‌گیرد کورکومین[1] موجود در زرد چوبه خاصیت آنتی اکسیدانی دارد (Araujo and leon,2001). تحقیقات نشان داده است که ترکیبات کورکومین، رادیکال‌های آزاد و انواع اکسیژن فعال (ROS) و محصولات آن‌ها که در القاء و ایجاد اکسیداسیون موثرند را به دام می‌اندازد (عشقی و همکاران، ۱۳۹۲). افزایش رشد کالوس گیاه نارون چینی در تیمار با زردچوبه در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده شده است در حالی که شدت رشد کالوس‌ها در محیط حاوی زغال فعال کاهش پیدا کرده است.

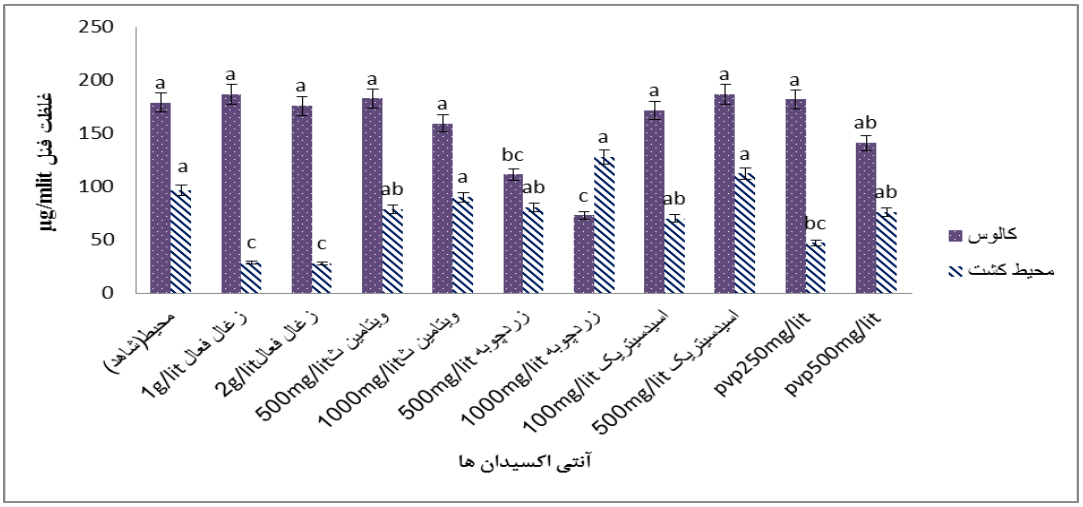
زغال فعال علاوه بر جذب مواد فنلی باعث جذب بعضی ترکیبات مانند تنظیم کننده‌های رشد نیز می‌گردد همچنین ویتامین‌های تیامین و اسیدنیکوتینیک را از محیط حذف می‌کند (وحدت پور و همکاران،۱۳۸۷). مقایسه میانگین نشان داد که میزان فنل در کالوس‌های کشت شده در محیط کشت B5 بیشتر(۱۶۵µ/mlit) از محیط کشت MS (۱۵۰µ/mlit) بود. میزان و نوع ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تاثیر عوامل بسیار متفاوت همانند شرایط ژنتیکی و محیطی (نور، دما و دستری به مواد غذایی) است.تفاوت بسیار بارزی بین محیط کشت B5 وMS از لحاظ نوع و غلظت عناصر و مقدار ویتامین‌ها وجود دارد که می‌تواند در تولید مواد فنولیکی موثر باشد برای مثال غلظت‌ها مختلف سولفات آمونیوم نقش موثری در افزایش زیست توده و غلظت ترکیبات فنلی دارد. به این ترتیب که در مسیر سنتز ترکیبات فنلی، اولین واکنش در مسیر فنیل پروپانوئید به وسیله فنیل آلانیل آمونیالیاز (Pal) کاتالیز می‌شود که L – فنیل آلانیل را به ترنس سینالیک اسید تبدیل می‌کند. مشخص شده است که سنتز Denova-pal به وسیله محرک‌های زیستی و غیر زیستی القا می‌شود. در نتیجه بیان و انباشت ژن‌های pal موجب سنتز ترکیبات فنولی در قسمت‌های مختلف سلول می‌شود. آمونیوم سولفات نقش بسیار موثری در تنظیم بیان ژن pal در بیوسنتز سلول‌های گیاهی دارد. همچنین تفاوت بارزی از لحاظ مقدار

[1] -Curcumine

بالای ویتامین‌ها در محیط B5 نسبت به MS وجود دارد که می‌تواند در تولید ترکیبات فنلی موثر باشد. تیامین نقش کلیدی به عنوان کوفاکتور در مسیرهای متابولیکی اصلی گیاه دارد. بنابراین ممکن است به طور مستقیم و با غیر مستقیم به تولید ترکیبات ثانویه کمک کند (عباسی و همکاران،۹۱).



شکل(۴-۱۷) مقایسه میانگین نوع محیط کشت در میزان فنول در کالوس . حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.



شکل (۴-۱۸)-نمودار مقایسه میانگین اثر آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در کنترل فنل در کالوس *Menthea arvensis*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

فنول‌ها ترکیبات ثانویه ارزشمندی هستند که تولید آنها طی سال‌های اخیر مورد توجه پژوهشگران بیوتکنولوژی قرار گرفته است. همچنین آزمایشات متعدد در دهه گذشته نشان می‌دهد که وجود این ترکیبات مانع فرایند

کالزایی و در نهایت مرگ ریزنمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای می گردد. نتایج این بررسی نشان داد که زردچوبه به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، نقش بسیار معنی داری در رهاسازی و جذب ترکیبات فنولی در محیط کشت دارد. همچنین این بررسی نشان داد که محیط B5 باعث افزایش معنی داری در میزان فنول می‌شود. مطالعات آینده در مورد نقش زردچوبه و همچنین ترکیبات محیط B5 همانند تیامین و آمونیوم سولفات در مسیر بیوسنتزی فنل‌ها می توانند راه گشای محققین جهت درک کاملتری از نحوه تاثیر این مواد باشد. از این پژوهش می‌توان جهت روشی ارزان و کارامد جهت تولید کالوس‌های عاری از فنل به منظور تولید حجم بالایی از کالوس و همچنین در تولید فنل از کالوس‌ها در مطالعات مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده کرد.

۴-۵- فاز سوسپانسیون

در ابتدا لازم به ذکر است بعد از پایان و بررسی آنالیزهای مرحله کالزایی و شرایط ظاهری کالوس‌ها، در فاز سوسپانسیون سلولی تیمارهای بهینه کالزایی شامل محیط MS وB5 حاوی۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و مقدار ۳۰ و۶۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. شروع رشد کالوس‌ها هفت روزبعد از کشت مشاهده شد. همچنین بعد از گذشت ٤ هفته به حالت اشباع در آمدند. ظاهر کالوس‌ها کاملا ترد و نرم مشاهده شدند.

شکل(۴-۱۹) محیط سوسپانسیون به همراه کالوسها (رسوب سلول‌ها کنار ارلن نشان دهنده اشباع شدن محیط از سلول‌ها می‌باشد.

٤-٥-١ اندازه‌گیری وزن خشک سلول درفاز سوسپانسون

در محیط کشت MS و B5 فاقد هورمون هیچ گونه رشد سلولی مشاهده نشد و کالوس‌ها بازا شدند. در حالی که در محیط کشت‌های حاوی هورمون 2,4-D در غلظت‌های تعیین شده رشد سلول‌ها مشاهده گردید

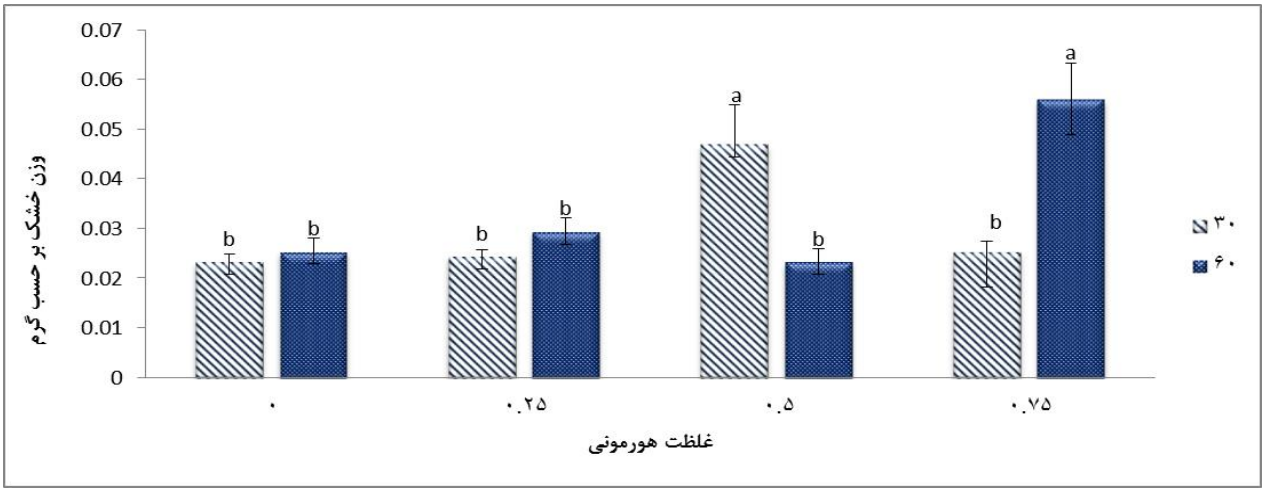
جدول (٤-٤)اثر میزان ساکاروز، نوع محیط کشت وهورمون واثر متقابل هریک بر میزان وزن خشک سلول گیاه *Mentha arvensis*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		وزن خشک(گرم)
زمان (A)	۳	۰/۰۰۱۱*
میزان ساکاروز (B)	۱	۰/۰۰۰۶ns
نوع محیط کشت (C) **(A×B)**	۱	۰/۰۰۸۲**
هورمون 2,4-D (D)	۳	۰/۰۰۲۷**
اثر متقابل زمان× میزان ساکاروز (A×B)	۳	۰/۰۰۴ns
اثر متقابل زمان × نوع محیط کشت(A×C)	۳	۰/۰۰۰۷ns
اثر متقابل زمان × هورمون 2,4-D (A×D)	۹	۰/۰۰۰۰۸ns
اثر متقابل میزان ساکاروز× نوع محیط کشت(B×C)	۱	۰/۰۰۰۰۰۲ns
اثر متقابل میزان ساکاروز× هورمون 2,4-D (B×D)	۳	۰/۰۰۶**
اثر متقابل نوع محیط کشت× هورمون 2,4-D (D×C)	۳	۰/۰۰۱**
اثر متقابل زمان ×نوع محیط کشت×میزان ساکاروز(A×B×C)	۳	۰/۰۰۰۱ns
اثر متقابل زمان× میزان ساکاروز× هورمون 2,4-D (A×B×D)	۹	۰/۰۰۰۲ns
اثر متقابل میزان ساکاروز× هورمون 2,4-D × نوع محیط(B×C×D)	۳	۰/۰۰۴**
اثر متقابل میزان ساکاروز× هورمون 2,4-D × نوع محیط کشت×زمان(A×B×C×D)	۱۸	۰/۰۰۰۲ns
خطا	۱۲۸	
ضریب تغییرات	۵۳/۹۲٪	

*اختلاف معنی دار در سطح یک درصد، ** اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد و ns بیانگرعدم اختلاف معنی دار است

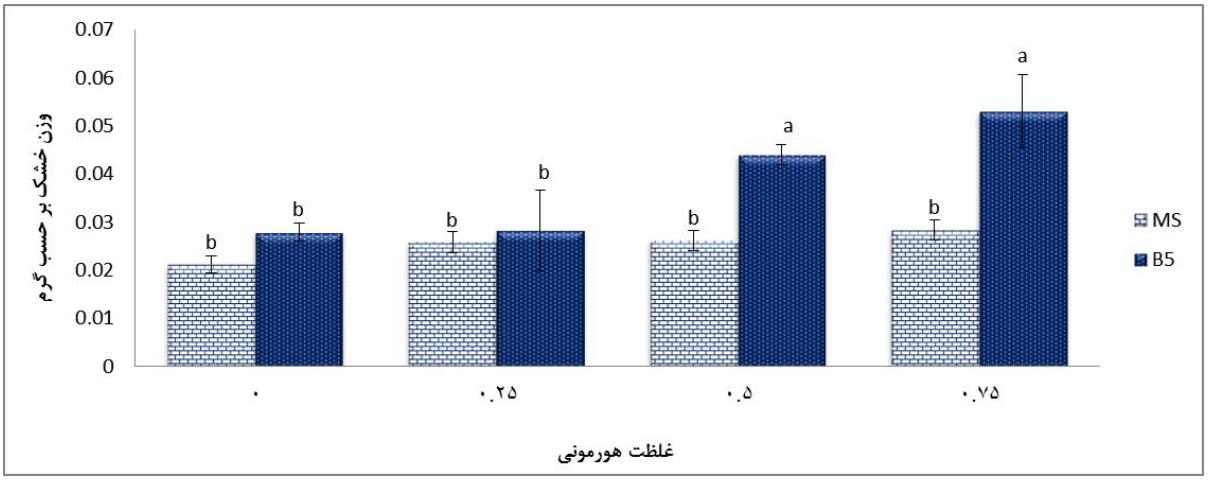
شکل(۴-۲۰) کالوس‌های بازا شده در محیط سوسپانسیون MS وB5 فاقد هورمون

در مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز و هورمون، افزایش معنی داری در وزن خشک در حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد ولی تفاوتی در غلظت ٦۰ میلی‌گرم ساکارز در لیتر ایجاد نشد. از طرف دیگر افزایش غلظت هورمون به ۰/۷۵ مبلی‌گرم در لیتر و ساکارز باعث تفاوت معنی داری در وزن خشک شد. به نظر می‌رسد اثر متقابل بین 2,4-D با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز با غلظت ٦۰ گرم در لیتر وجود دارد.



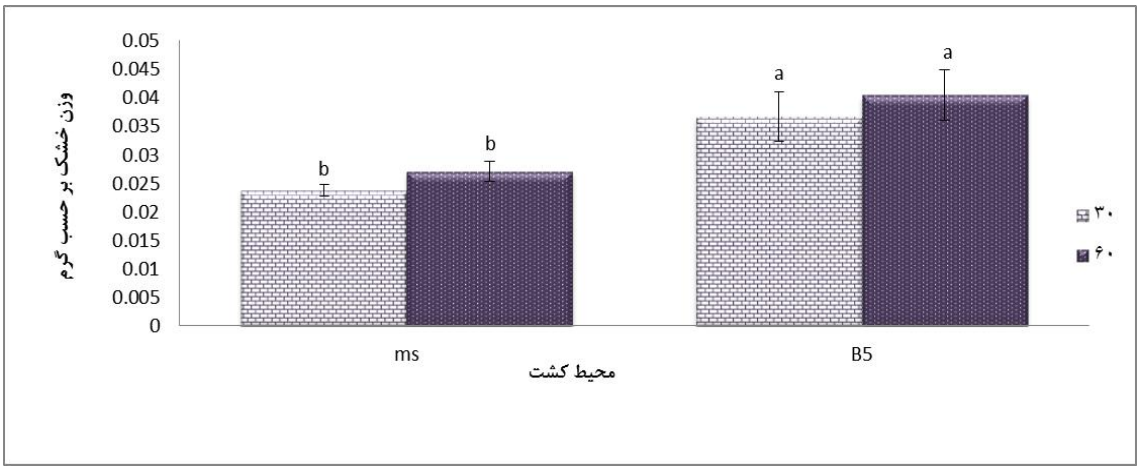
شکل(۴-۲۱) مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ساکاروز و هورمون 2,4-D در وزن خشک سلول در فاز سوسپانسیون. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

با تغییر غلظت هورمون 2,4-D از ۰و ۰/۲۵ به ۰/۵ و۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط B5 باعث افزایش وزن خشک سلول‌ها گردید. در حالی که در محیط MS تفاوت معنی داری مشاهده نشد.به نظر می‌رسد تغییرغلظت و نوع عناصر و یتامین‌ها در محیط B5 در افزایش وزن خشک سلول‌ها موثر باشد.



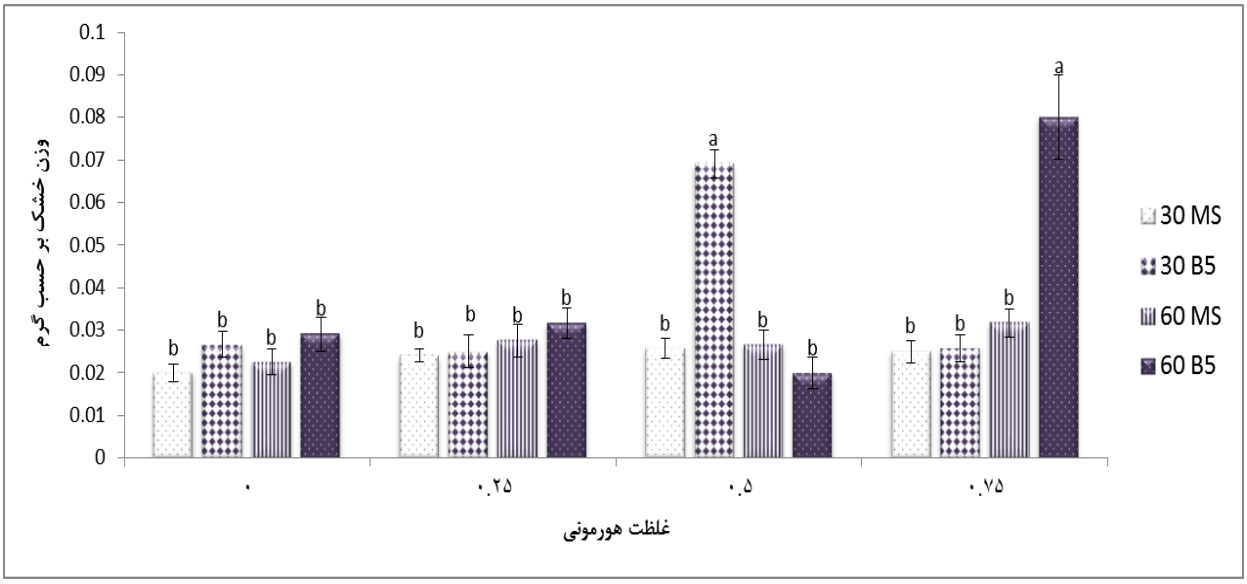
شکل(۴-۲۲) مقایسه میانگین اثر محیط‌کشت‌های MS و B5 در رشد سلول. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

مقایسه میانگین بین محیط کشت و غلظت ساکارز نشان داد تفاوت معنی داری بین غلظت ۳۰ و ۶۰ گرم ساکارز وجود ندارد در حالی که بین دو محیط B5 و MS تفاوت معنی داری وجود دارد به طوری که بیشترین وزن خشک سلول در محیط B5 حاوی ۳۰ و۶۰ گرم در لیتر ساکاروز مشاهده شد.



شکل(۴-۲۳) مقایسه میانگین محیط کشت و ساکارز بر وزن خشک. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

صرف نظر از غلظت ساکاروز، در محیط B5 و همچنین هورمون 2,4-D در غلظت ۰/۵ و ۰/۷۵ باعث افزایش وزن خشک گردید. وتفاوت بسیار معنی داری با محیط MS در همان شرایط داشت.

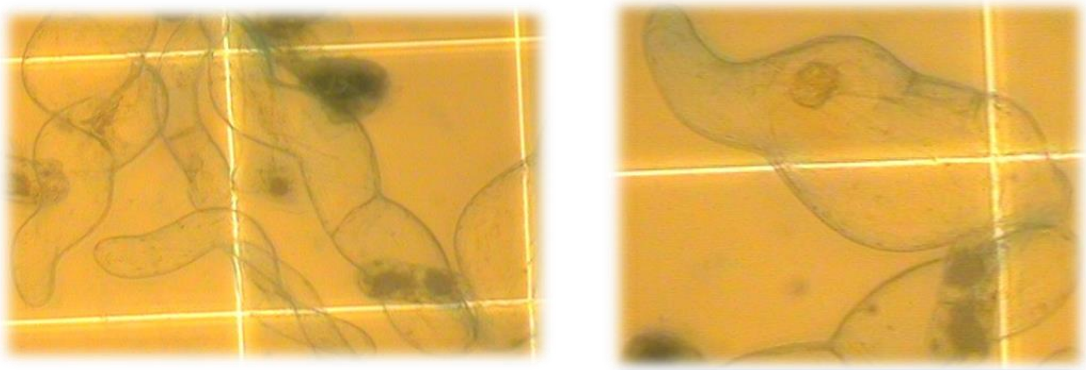


شکل (۴-۲۴) مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌کشت‌های MS وB5 وغلظت‌های مختلف ساکارز و هورمون 2,4-D در رشد سلول در فاز سوسپانسیون . حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح است$P\leq0.05$.

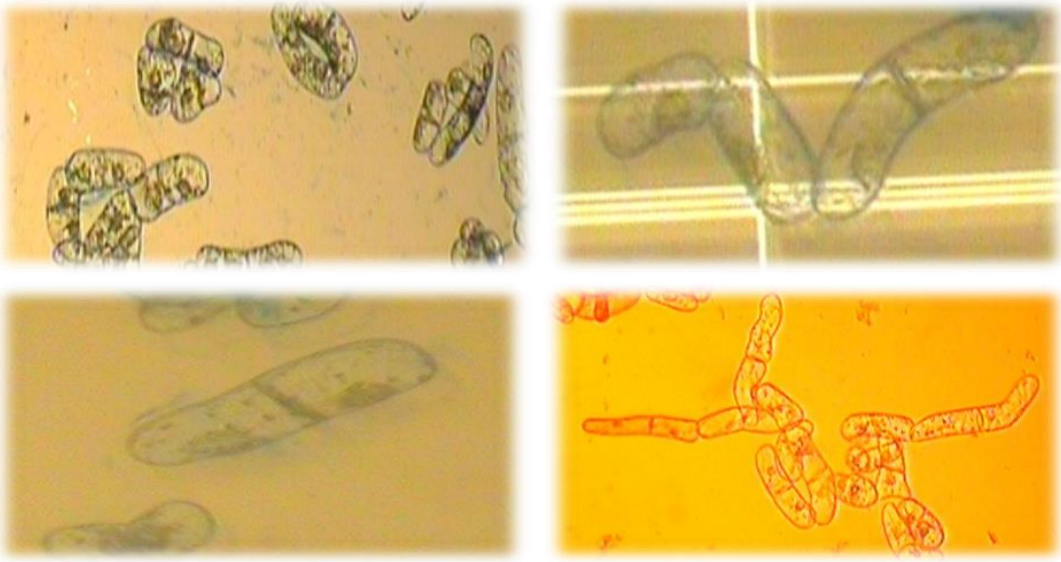
۴-۵-۲-شکل سلول‌ها

در محیط سوسپانسیون تنوع در شکل(سلول‌های کروی،استوانه‌ای و کشیده) و اندازه سلول‌ها مشاهده شد. همچنین تمایز و تقسیم سلولی قابل ملاحظه بودشکل (۲۱تا ۲۳).

شکل(۴-۲۵)- سلول‌های طویل شده حاصل از کشت سوسپانسیون



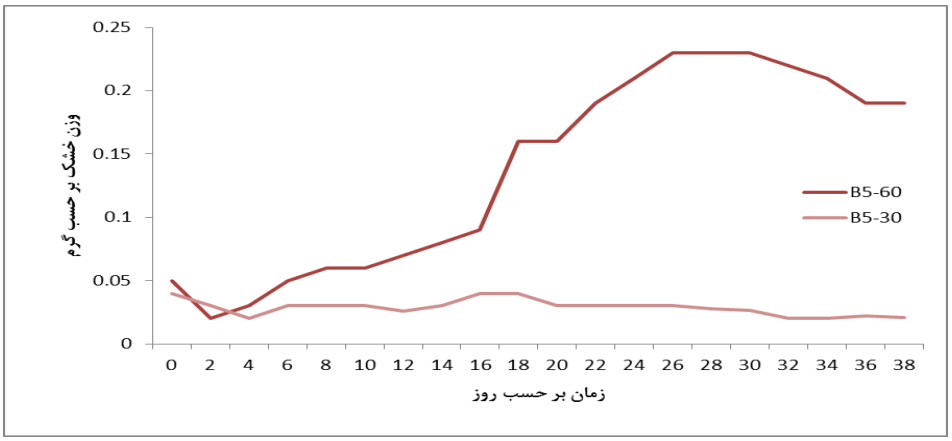
شکل (۴-۲۶)سلول‌های تمایز یافته در محیط سوسپانسیون



شکل (۴-۲۷) سلول‌های در حال تقسیم در محیط سوسپانسیون

٤-٥-٣ منحنی رشد سلول بر اساس وزن خشک

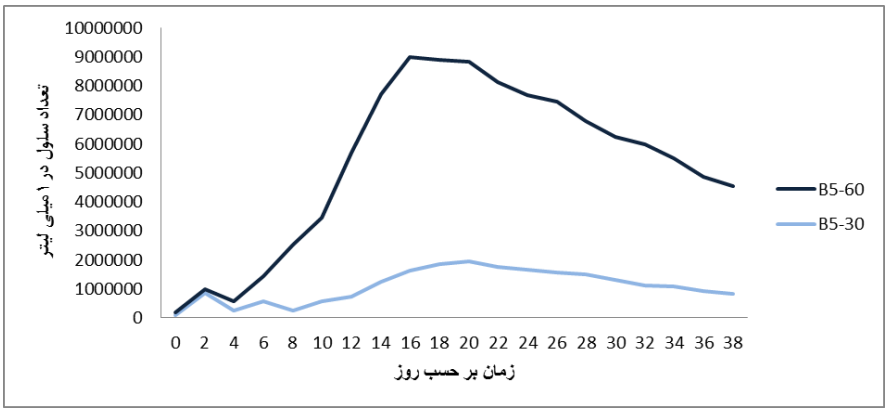
بعد از واکشت در محیط B5 حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، بیشترین شاخص رشد در روز شانزدهم (۰/۰٤ گرم وزن خشک) مشاهده شد. منحنی رشد از روز شروع اندازه گیری وزن خشک سلول‌ها تا روزچهارم مرحله خفتگی، روزپنجم تا نوزدهم مرحله تصاعدی ، و از روز بیستم تا روز سی دوم مرحله خطی و ازسی و دو به بعد مرحله سکون را نشان داد. همچنین در محیط B5 حاوی ٦۰ گرم در لیتر ساکارز، بیشترین شاخص رشد در روز شانزدهم (۰/۲۵ گرم وزن خشک) مشاهده شد.منحنی رشد از روز شروع اندازه گیری وزن خشک سلول‌ها تا روز سوم مرحله خفتگی، روزسوم تا شانزدهم مرحله تصاعدی، و از روز هفدهم تا روز سی و دوم خطی و از روز سی و دوم به بعد مرحله سکون را نشان داد شکل (٤-۲۸). طی تحقیقی تولید اسید رزمارینیک(Rosmarinik acid) را در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Lavandula vera* مورد بررسی قرار گرفت.تکنیک مطالعه روند رشدی کشت سوسپانسیون در گزارش مذکور مبتنی بر اندازه‌گیری تغییرات وزن خشک واحد مشخصی از حجم محیط کشت در یک دوره زمانی دو هفته‌ای بوده است. بر اساس نتیجه این گزارش حداکثر رشد کشت سوسپانسیون (بیشترین میزان تولید بیوماس) در روز هشتم (از ابتدای شروع کشت اتفاق افتاد و پس از ۳ الی ٤ روز فاز ثابت آغاز شد(Ilieva and pavlia, 1999).



شکل(٤-۲۸) منحنی شاخص رشد در محیط سوسپانسیون B5 حاوی ٦۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز

٤-٥-٤ تعداد سلول‌ها

تعداد سلول‌ها در هر ۲۵ میلی‌گرم در لیترمحیط حاوی ۳۰ گرم ساکارز، در روز اول شمارش، معادل ۸×۱۰^{٤} سلول، و بیشترین میزان سلول در روزنوزدهم، ۱۹۵×۱۰^{٤} سلول بعد از واکشت بود. همچنین در محیط کشت حاوی ٦۰ گرم در لیتر ساکارز، در هر ۲۵میلی‌گرم در لیتر، در روز اول معادل ۸×۱۰^{٤} سلول و بیشترین میزان سلول در روزشانزدهم ۷۳۵×۱۰^{٤} سلول بعد از واکشت بود (شکل٤-۲۹).



شکل (٤-۲۹) منحنی تعداد سلول در محیط سوسپانسیون B5 حاوی ٦۰ و ۳۰ گرم ساکارز

٤-٥-٥- استفاده از الیسیتورها در محیط سوسپانسیون

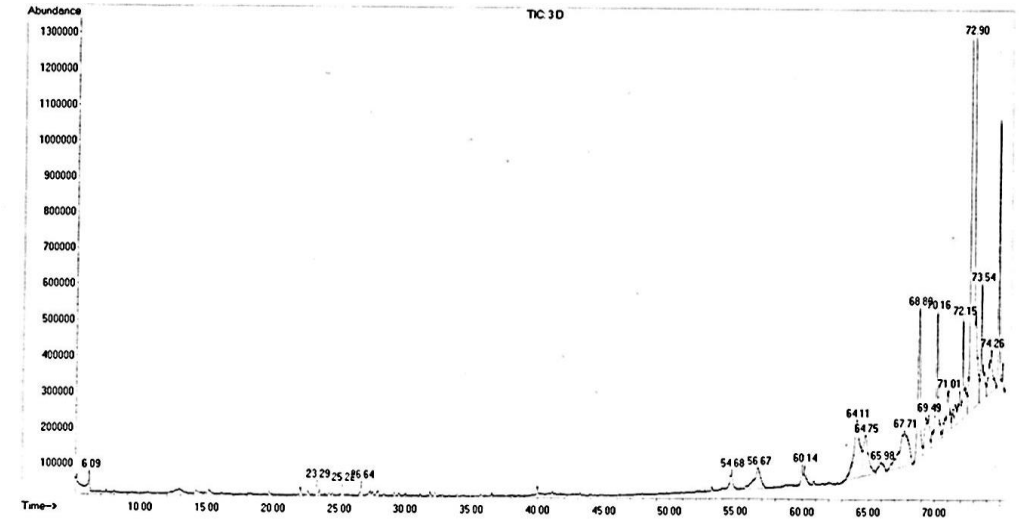
میزان ۵۰ میلی‌لیتر محیط سوسپانسیون، با الیسیتورهای متیل‌جاسمونات در غلظت‌های ۱و۲ میکرولیتر در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت و کیتوزان در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در دو بازه زمانی ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار شد، بررسی مقدار ترکیبات ثانویه تحت تاثیر الیسیتورها نشان داد که غلظت و زمان بکار برده شده، نقش موثری در تولید یا افزایش ترکیبات ثانویه نداشت و میزان ترکیبات نسبت به نمونه شاهد کاهش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل محدود بودن توانمندی سلول‌ها در پاسخ به عامل تنش‌زا و یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها توسط الیسیتورها ایجاد گردد (Nguyn Trung Than *et al*, 2008).

بررسی نمودار تیمار شاهد (حاوی ۶۰ گرم ساکارز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) نشان داد که تعدادی از متابولیت‌های ثانویه در سوسپانسیون کالوس گیاه *Mentha arvensis* L تولید شده است. طبق نتایج بدست آمده از آنالیز GC/Mass ترکیبات مهمی مثل منتول به میزان ۸/۹۶ درصد، لیمونن، ۸/۲۳ درصد، تیمول، ۳/۱۷درصد، منتون ۰/۳۹ درصد و کاروکل به میزان ۰/۴۵ درصد مشاهده شد. همچنین ترکیبات مهم دیگری مثل پی‌سیمین، دودکانول، تترا دکانل، ایژونول مشاهده گردید (جدول۴-۵). میزان ساکاروز از عوامل مهم در تولید مواد موثره است. در مطالعه انجام گرفته بر محیط سوسپانسیون سلولی گیاه *Mentha piperita* افزایش ساکاروز تا غلظت ۴۰ گرم در لیتر باعث تولید منتول به میزان ۱۱۲ میلی گرم در لیتر شده است (Chakraborty and. Chattopadhavy,2008). زمانی که غلظت ساکاروز در محیط بالا می‌رود فشار اسمزی داخل سلولی کم شده و برای اینکه سلول آب خود را از دست ندهد دست به تولید یک سری ترکیبات ثانویه می‌کند که همین موضوع باعث تولید متابولیت ثانویه می‌شود. تولید سلول‌هایی که دارای ماده موثره هستند، بسیار به غلظت 2,4-D موجود در محیط بستگی دارد. غلظت بالای۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D باعث کاهش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. به عبارت بهتر این که هر چه غلظت 2,4-D افزایش یابد، دیواره سلولی به سوی چوبی شدن پیش می‌رود یعنی غلظت بالای 2,4-D از طریق گروه آلدهیدها روی HC1 (پروتین هیستونی) DNA اثر گذاشته و دیواره سلولی را به سوی چوبی شدن پیش می‌برد (Nguyn Trung Than *et al*, 2008).

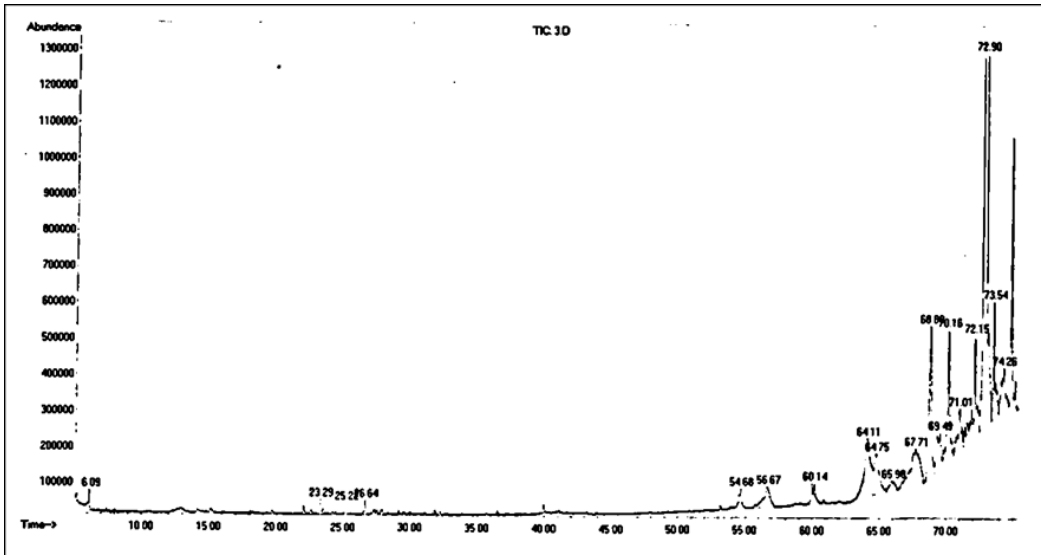
جدول(۴-۵)- ترکیبات بدست آمده از آنالیز GCMASS در تیمار ۶۰ گرم ساکاروز و 2,4-D ۰/۷۵ mg/lit در گیاه *Mentha arvensisL*

ترکیب	درصد	زمان
Nonane	۰,۲	۹,۹۰
α-pinene	۰,۳۳	۱۱,۶۷
Myrcene	۱,۷	۱۴,۶۰
ρ-Cymene	**۳,۲۱**	**۱۶,۶**
Limonene	**۸,۲۳**	**۱۶,۷۶**
ß-phellandrene	۰,۹۲	۱۶,۸۸
Ɣ-Terpinene	**۲,۰۲**	**۱۸,۲۹**
Terpinolene	۰,۳	۱۹,۶۸
n-Undecane	۰,۳۵	۲۰,۰۹
Menthone	۰,۳۹	۲۳,۵۱
Menthol	**۸,۹۶**	**۲۴,۶۰**
Dodecane	۰,۳۲	۲۵,۰۷
Decanal	۰,۱۴	۲۵,۵۷
2E-Decenal	۰,۶۸	۲۸,۹۳
Neo-Menthy acetate	۰,۴۹	۲۹,۷۲
E-Anethole	۰,۸۴	۲۹,۸۹
Tymol	**۳,۱۷**	**۳۰,۰۳**
Carvacol	۰,۴۵	۳۰,۴۱
Eugenol	۰,۳۱	۳۲,۸
Tetradecane	۱,۸	۳۴,۳۳
Dodecanol	**۳,۳**	**۳۷,۷۸**
Pentadecane	۰,۲۷	۳۸,۵۱
Hexadecane	۱,۸۹	۴۲,۴۷
Tetradecanol	**۲,۸۴**	**۴۵,۹۱**
Heptadecane	۰,۶۲	۴۶,۲۳
Octadecane	۱,۲۷	۴۹,۷۹
Isopropyl myristate	۱,۶۲	۵۰,۷۳
Cycliopentadecanolid	۰,۲۷	۵۱,۰۴
Hexadecanol	۰,۵۲	۵۲,۴۸
Nonadecane	**۲,۴۶**	**۵۳,۱۸**
Cyclohentadecanolide	۰,۵۷	۵۴,۴۷
Eicosane	۰,۹۱	۵۶,۴۳
Hexadecyl acetate	۰,۴۶	۵۷,۴۹
Heneicosane	۰,۷۴	۶۲,۵
Total Identified	**۵۲,۳۵**	

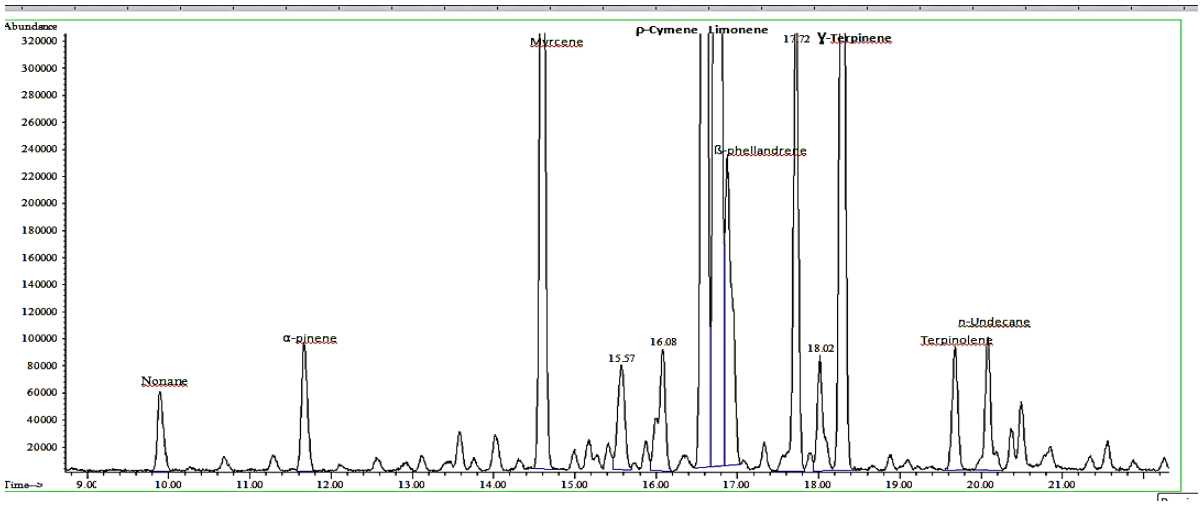
در بررسی کروماتوگراف تیمار متیل جاسمونات و کیتوزان نشان داد که در این تیمار هیچ متابولیتی تولید نشده است وتنها در انتها مقداری اسیدهای چرب تولید شده که بی ارزش است



شکل (۴-۳۰) گروماتوگراف تیمار متیل جاسمونات در غلظت ۰۰/۰۰۴۴ µM و زمان ۴۸ ساعت



شکل (۴-۳۱) گروماتوگراف تیمار کیتوزان در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و زمان ۷۲ ساعت



شکل(۴-۳۲) گروماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکارز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر (نمونه شاهد)

در زمان ۹ دقیقه و ۹۰ صدم ثانیه خروجی ترکیب Nonane با سطح زیر نمودار۰/۲ ٪

در زمان ۱۱ دقیقه و ۶۷ صدم ثانیه خروجی ترکیب α-pinene با سطح زیر نمودار ۰/۳ ٪

در زمان ۱۴ دقیقه و ۶۰ صدم ثانیه خروجی ترکیب Myrcene با سطح زیر نمودار۱/۷ ٪

در زمان ۱۶ دقیقه و۶۰ صدم ثانیه خروجی ترکیبρ-Cymene با سطح زیر نمودار۳/۲۱ ٪

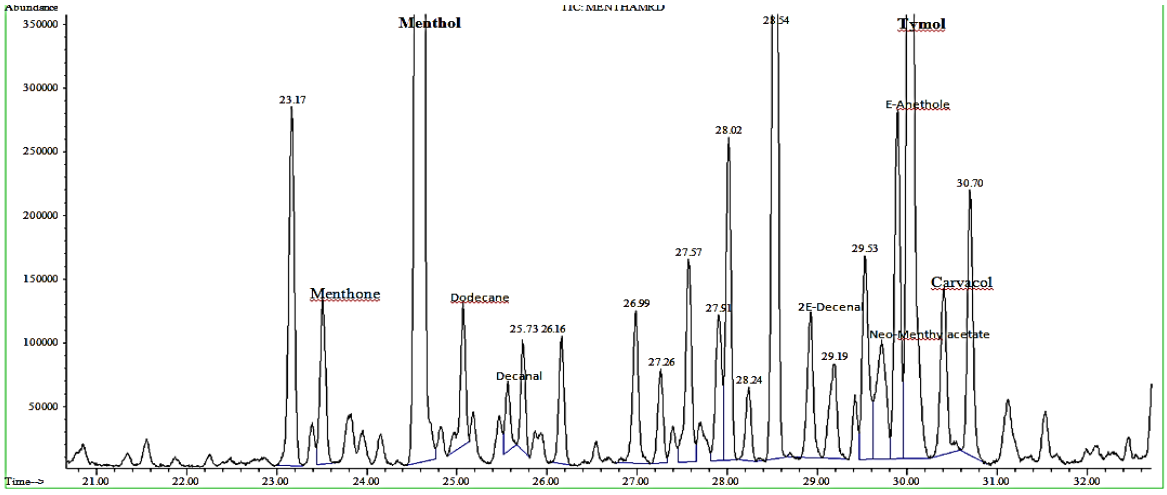
در زمان ۱۴ دقیقه و ۶۰ صدم ثانیه خروجی ترکیب Limonene با سطح زیر نمودار۱/۷ ٪

در زمان ۱۶ دقیقه و ۸۸ صدم ثانیه خروجی ترکیب ß-phellandrene با سطح زیر نمودار۰/۹ ٪

در زمان ۱۸ دقیقه و ۲۹صدم ثانیه خروجی ترکیب γ-Terpinene با سطح زیر ۰/۳ ٪

در زمان ۱۹ دقیقه و ۶۸ صدم ثانیه خروجی ترکیب Terpinolene با سطح زیر نمودار۲/۰۲ ٪

در زمان ۲۰ دقیقه و ۰/۰۹ صدم ثانیه خروجی ترکیب n-Undecane با سطح زیر نمودار۲/۰۲ ٪



شکل(۴-۳۳) گروماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکارز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر (نمونه شاهد)

در زمان ۲۳ دقیقه و ۵۱ صدم ثانیه خروجی ترکیب Menthone با سطح زیر نمودار۰/۳۹٪

در زمان ۲۴ دقیقه و ۶۰ صدم ثانیه خروجی ترکیب **Menthol** با سطح زیر نمودار ۸/۹۶ ٪

در زمان ۲۵ دقیقه و ۰/۰۷ صدم ثانیه خروجی ترکیب Dodecane با سطح زیر نمودار۰/۳۲ ٪

در زمان ۲۵ دقیقه و۵۷ صدم ثانیه خروجی ترکیبDecanal با سطح زیر نمودار۰/۱۴ ٪

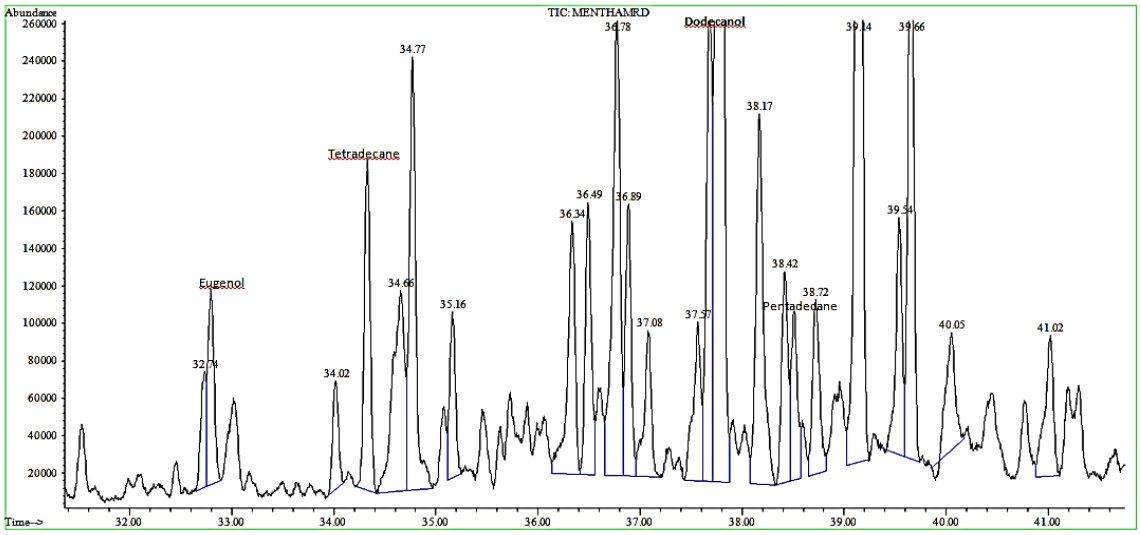
در زمان ۲۸ دقیقه و ۹۳ صدم ثانیه خروجی ترکیب 2E-Decenal با سطح زیر نمودار۰/۶۸ ٪

در زمان ۲۹ دقیقه و ۷۲ صدم ثانیه خروجی ترکیب Neo-Menthy acetate با سطح زیر نمودار۰/۴۹ ٪

در زمان ۲۹ دقیقه و ۸۹صدم ثانیه خروجی ترکیب E-Anethole با سطح زیر ۰/۸۴ ٪

در زمان ۳۰ دقیقه و ۰/۰۳ صدم ثانیه خروجی ترکیب **Tymol** با سطح زیر نمودار۳/۱۷ ٪

در زمان ۳۰ دقیقه و ۴۱ صدم ثانیه خروجی ترکیب Carvacol با سطح زیر نمودار۰/۴۵٪



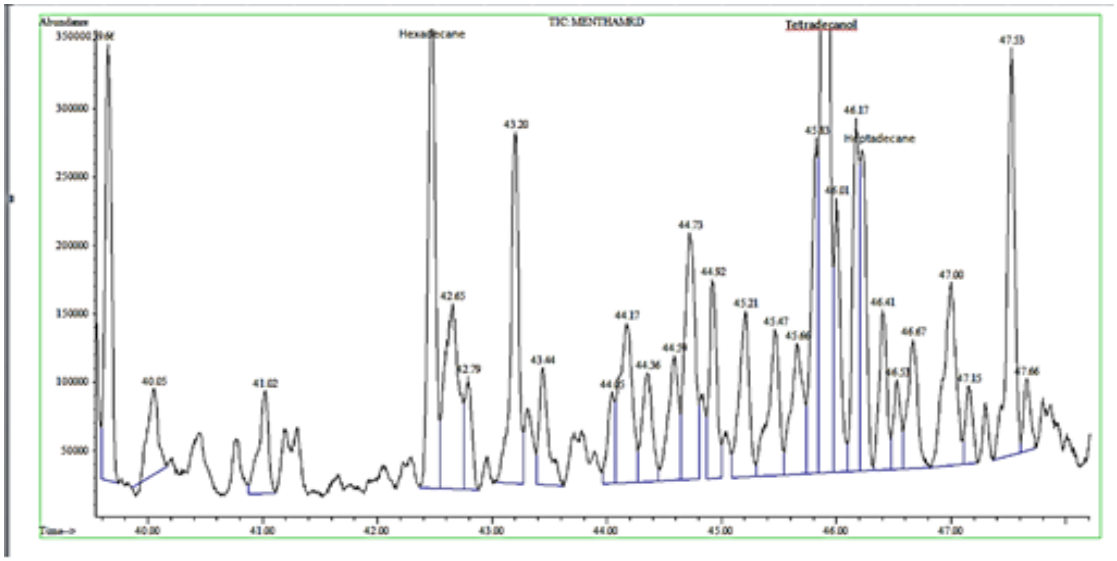
شکل(۴-۳۴) گروماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکارز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر(نمونه شاهد)

در زمان ۳۲ دقیقه و ۸۰ صدم ثانیه خروجی ترکیب Eugenol با سطح زیر نمودار ۳۱/. ٪

در زمان ۳۴ دقیقه و ۳۳ صدم ثانیه خروجی ترکیب Tetradecane با سطح زیر نمودار ۱/۸ ٪

در زمان ۳۷ دقیقه و۷۸ صدم ثانیه خروجی ترکیب Dodecanol l با سطح زیر نمودار ۳/۳ ٪

در زمان ۳۸ دقیقه و ۵۱ صدم ثانیه خروجی ترکیب Pentadecane با سطح زیر نمودار ۰/۲۷ ٪



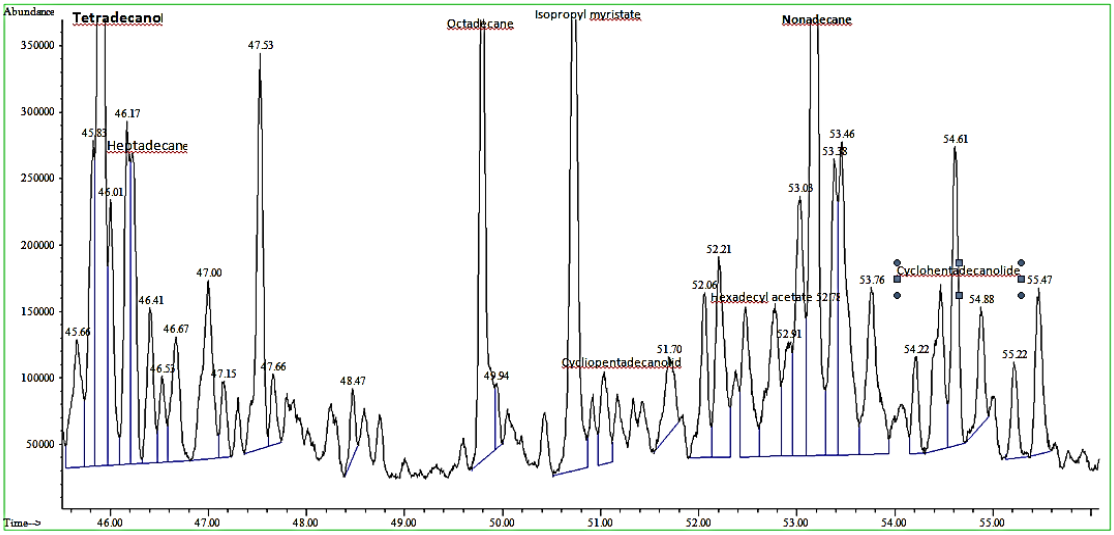
شکل(۴-۳۵) گروماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر(نمونه شاهد)

در زمان ۴۲ دقیقه و ۴۷ صدم ثانیه خروجی ترکیب Hexadecane با سطح زیر نمودار۱/۸۹ ٪

در زمان ۴۵دقیقه و ۹۱صدم ثانیه خروجی ترکیب Tetradecanol e با سطح زیر ۲/۸۴ ٪

در زمان ۴۶ دقیقه و ۲۳ صدم ثانیه خروجی ترکیب Heptadecane با سطح زیر نمودار۰/۶ ٪

در زمان ۴۹ دقیقه و ۷۹ صدم ثانیه خروجی ترکیب Octadecane با سطح زیر نمودار۱/۲۷٪



شکل(۴-۳۶) گروماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر(نمونه شاهد)

در زمان ۴۹ دقیقه و ۷۹ صدم ثانیه خروجی ترکیب Octadecane با سطح زیر نمودار۱/۲۷٪

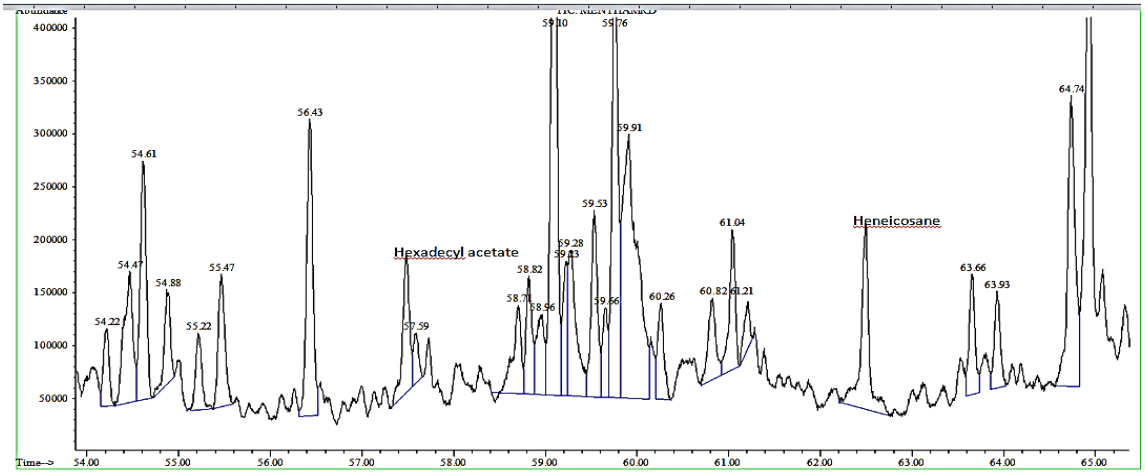
در زمان ۵۰ دقیقه و ۷۳ صدم ثانیه خروجی ترکیب Isopropyl myristate با سطح زیر نمودار۱/۶۲ ٪

در زمان ۵۱دقیقه و ۰/۴صدم ثانیه خروجی ترکیب Cycliopentadecanolid با سطح زیر ۰/۲۷ ٪

در زمان ۵۲ دقیقه و ۴۸ صدم ثانیه خروجی ترکیب Hexadecanol با سطح زیر نمودار۰/۵۲ ٪

در زمان ۵۳ دقیقه و ۱۸ صدم ثانیه خروجی ترکیب Nonadecane با سطح زیر نمودار۲/۴۶ ٪

در زمان ۵۴ دقیقه و ۴۷ صدم ثانیه خروجی ترکیب Cyclohentadecanolide با سطح زیر نمودار۰/۵۷ ٪



شکل(۴-۳۷) گروماتوگراف محیط سوسپانسیون B5 حاوی ۶۰ گرم ساکاروز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر (نمونه شاهد)

در زمان ۵۶ دقیقه و ۴۳ صدم ثانیه خروجی ترکیب Eicosane با سطح زیر نمودار۰/۹۱ ٪

در زمان ۵۷ دقیقه و ۴۹صدم ثانیه خروجی ترکیب Hexadecyl acetate با سطح زیر ۰/۴۶ ٪

در زمان ۶۲ دقیقه و ۵۰ صدم ثانیه خروجی ترکیب Heptadecane با سطح زیر نمودار۰/۷۴ ٪

۴-۵-۶-نتیجه گیری کلی

نتایج آزمایش نشان داد که محیط کشت 1/2MS همراه با ۲ گرم در لیتر زغال فعال بیشترین تاثیر بر تعداد و قطر ساقه‌ها (۱۲/۶، ۰/۰۳۵ میلی‌متر) داشت. بیشترین مقدار وزن تر و خشک کالوس (۱۲/۳ و ۱/۸۸ گرم) در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. در مقایسه بین محیط کشت‌های مختلف بیشترین وزن خشک (۰/۶ گرم) در محیط کشت B5 مشاهده گردید. بیشترین میزان فنل در محیط‌کشت (۱۲۷µg/ml) و کمترین میزان فنل در کالوس‌ها (۷۲/۹µg /ml) در محیط حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر زردچوبه مشاهده شد. در فاز سوسپانسیون بیشترین وزن خشک سلول در محیط B5 حاوی ۳۰ و۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. همچنین هورمون 2,4-D در غلظت ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر باعث افزایش وزن خشک گردید. بیشترین رشد سلول در روز شانزدهم شاخص رشد (۰/۲۵ گرم وزن خشک) و بیشترین تعداد

سلول نیز در همان روز (۷۳۵۰۰۰۰) در محیط B5 حاوی ۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. . نتایج بدست آمده از آنالیز GC/Mass ترکیبات مهمی مثل منتول به میزان ۸/۹۶ درصد، لیمونن، ۸/۲۳درصد، تیمول، ۳/۱۷ درصد، منتون ۰/۳۹درصد و کارواکرول به میزان ۰/۴۵ درصد مشاهده شد. همچنین ترکیبات مهم دیگری مثل پی‌سیمین، دودکانول، تترا دکانل، ایژونول مشاهده گردید.

با توجه به اینکه بخش اعظم بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید و عرضه متابولیت‌های ثانوی مشتق از این گیاهان مربوط می‌شود، لذا متابولیت‌های ثانوی گیاهی از ارزش اقتصادی و همچنین ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند و سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولا پیچیده و پرهزینه می‌باشد. بنابراین تولید متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست فناوری از جمله کشت سلولی گیاه، راه جایگزین سودمندی است. با توجه به این که نعناع یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاه دارویی مطرح جهان می‌باشد، این پژوهش می‌تواند با فراهم آوردن شرایط افزایش متابولیت ثانویه در محیط سوسپانسیون سلولی میزان مواد موثره، بویژه منتول را افزایش دهد.

۴-۵-۷-پیشنهادات

۱- بررسی نقش الیسیتورهای فیزیکی چون دما، نور و میزان CO_2 و الیسیتورهای غیر زیستی مانند اشعه ماورا بنفش، نمک فلزات سنگین.

۲- بررسی نقش بعضی از ترکیبات شیمیایی با مکانیسم‌های عمل متفاوت و همچنین بررسی نقش الیسیتورهای زیستی مانند قارچ و عصاره مخمر به نظر ضروری می‌رسد.

۳- استفاده از کشت سلولی نعناع فلفلی با استفاده از بیوراکتورها به منظور تولید منتول بررسی شود.

٤- استفاده از ریزنمونه‌های نمو یافته چون جنین‌های سوماتیکی، ریشه‌های مویین و یا گیاهان باززا شده از کالوس می‌تواند راهکاری برای افزایش میزان تولید منتول در گیاه نعناع فلفلی باشد.

منابع

۱-اثنی عشری م، زکایی خسرو شاهی م، (۱۳۸۸)" **اصول کشت بافت گیاهی**"، انتشارات دانشگاه ابو علی سینا، چاپ سوم، ص ۹۳.

۲-اسمعیل زاده ص. و شریفی م، (۱۳۹۲)" افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی با استفاده از الیسیتورهای زیستی"، **مجله سلول و بافت**، جلد۴، شماره۲: ص ۸۶-۹۰.

۳-احمدی ج. حمدی ر. گروسی ق. و حسینی ر، (۱۳۹۱)". بهینه‌سازی کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی .پروانش (*catharanthus roseus*)"**مجله بیوتکنولوژی کشاورزی**، دوره ۴، شماره ۱: ص ۴۲-۶۰.

۴-اصغری غ . قنادی س. و همتیان ع، (۱۳۸۵) " تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط دو گیاه اسپند و عطر سنگ"، **مجله پزشکی هرمزگان**، دوره ۱۰، شماره ۲: ص۱۳۷-۱۴۳.

۵-امیدبیگی ر. (۱۳۷۹) "**رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی**"، انتشارات طراحان نشر، ص۴۲۴.

۶- امیدی م، و سید طباطبایی ب، (۱۳۸۸) "**کشت بافت و سلول گیاهی**"، انتشارات دانشگاه تهران،ص۱۷۵-۱۷۹.

۷- ایرانبخش ع، (۱۳۸۳) "بهینه‌سازی رشد و تولید آلکالوئیدهای تروپانی درکشت سوسپانسیون سلولی گیاه تاتوره (*Daturastra monium L*)" **مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی**، دوره ۱۶، شماره ۴ :ص۶۴.

۸-اطرشی م. مرادی ک. و خیام نکوئی م، (۱۳۸۹) "ریزازدیادی گیاه فلفل دلمه‌ای در شرایط کشت درون شیشه‌ای"**مجله زیست شناسی ایران**، دوره ۲، شماره ۱: ص۱-۱۲.

۹-جعفرنیا س. خسروشاهی س. و قاسم م، (۱۳۸۶) "**راهنمای جامع و مصور خواص و درمان گیاهان دارویی مشهد**"انتشارات سخن گستر، چاپ دوم، ص ۶۲-۶۴.

۱۰-زارع کاریزی ا، (۱۳۸۷) پایان نامه ارشد: "**اثر سطوح مختلف هورمونی بر آزمایشات درون شیشه‌ای آنغوزه، دانشگاه زابل**".

۱۱- زارعی م. گروسی غ. نظامی ا. حسینی ر. و احمدی ج، (۱۳۹۲) "تاثیر محیط کشت ،منبع کربن وطیف نور در نوساقه‌زایی و شیوه تیمار اکسین در ریشه‌زایی پایه رویشی Gisela 6" **،مجله بیوتکنولوژی کشاورزی**،دوره ۲، شماره۴: ص ۶۷-۷۰.

۱۲- زرگری ع ، (۱۳۷۶) **"گیاهان دارویی"** جلد ششم ، انتشارات دانشگاه تهران ، ص ۵-۱۴.

۱۳- سیفی ح، (۱۳۸۵) پایان نامه کارشناسی ارشد: **"مطالعه اثرسطوح هورمونی محیط کشت‌و ریزنمونه درکالزایی، باززایی و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه*Teuorium polium*"**، بیوتکنولوژی کشاورزی. دانشگاه تهران.

۱۴- شریعتی فر ن. کامکار ا. شمس اردکانی م. میثاقی ع. جمشیدی ا. جاهد خانیکی غ، (۱۳۹۱) "بررسی کمی وکیفی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه علف هیضه" **فصل‌نامه دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد**، دوره۱۷. شماره ۴: ص ۵۳-۵۹.

۱۵-شمس‌اردکانی م. حاجی آخوندی ع. جمشیدی م. و محمد رفیعی‌پ، (۱۳۸۴) "تولید و نگهداری کشت سلولی‌گیاه *Achillea millefolium* و مقایسه متابولیت های تولید شده در کالوس با گیاه کامل" **فصل نامه گیاهان دارویی**، دوره ۵، شماره ۱۷:ص۵۲ .

۱۶-عباسی ا. مفید م. و اطرشی م، (۱۳۹۱) "بررسی تاثیر نوع محیط کشت پایه بر تولید داروی ضد سرطان تاکسول در کشت سوسپانسیون سرخدار(Taxus bacata) ".**مجله زیست شناسی گیاهی**. دوره۹ شماره۱۲:ص ۸۳ -۸۸.

۱۷-عشقی ع. حدادخداپرست م. حسینی ف. و بلوریان ش، (۱۳۹۲) "مقایسه کارایی آنتی اکسیدانی کورکومین زردچوبه با آنتی اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی در سیستم مدل غذایی (روغن سویا) "، **مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی**.دوره ۵، شماره ۱: ص ۹۳-۹۷.

۱۸- فارسی م . و ذوالعلی ج، (۱۳۹۰) **"اصول بیوتکنولوژی گیاهی"**، ویرایش دوم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۱۰۴-۱۰۵.

۱۹- معاونی پ. (۱۳۸۸) "**گیاهان دارویی** ، "انتشارات دانشگاه آزاد اسلام واحد شهر قدس . چاپ اول، ص ۶۸

۲۰- وحدت پور ف. مشایخی ک. و پیری زیرکوهی م، (۱۳۸۷) "بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی زرد چوبه در مقایسه با زغال فعال و اسید آسکوربیک در محیط کشت کالوس گیاه نارون چینی (*Ulmus parvifolia*) "،**مجله پژوهش‌های تولیدات گیاهی**، دوره ۱۶، شماره ۲: ص ۵۶-۶۱.

21-Adams RP.(2011)." **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry".**Allured Publishing Corporation Carol Stream, IL.pp 123.

22- Araujo C. and Leon L. "(2001)" Biological activities of *Curcuma longa* L". **Rio de Janeiro**, Vol 96, 5, 723-728 .

23-Brick Ell.C. (1996) "**The Royal Horthicultural Society A-Z.Encyclopedia of Garden Plants**" Editor in chief. Vol.69, 8, 668-669.

24- Chakraborty A. and Chattopadhavy SH . (2008) "Stimulation of menthol production in Menthapiperita cell culture". **J. In vitro dev biol- plant** , vol. 44, 6, 518-524.

25- Goyal s.and Ramawat K.G. (2008) "Increased isoflavonoids accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberose* by elicitor," **I j BT**,Vol.7, 6, 378-382.

26-Husseain A. Anwar F. Nigam P. Ashraf M. and Gilan A. (2010) " seasonal variation in content chemical composition and anatomicrobal and cytotoxic activites essential oil from for Menthea species". **J sci food Agre**, 90,11, 1827-36.

27- Ilieva M. and pavlia A. (1999) "Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture: nitrogen effect", J Microbiology and Biotechnology, Volume 15, 6, 711-714.

28-Jian-Gang Y. Syunsuke M. and Takeo U. (1999) "Responses of Menthea suspension-cultured cells to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and accumulation of esterifled phenolic acid in their cell walls. **J Biosci. Biotechnol. Biochem**, 63, 9, 1522-1527.

29- JohnsonM. Wesely E.G. Kavith M.S. and UmaV. *(2011)* "Secondary products from plants culture".**J of Tropical *Medicine***,36,8, 196-200.

30- Koerper H. and Kollas A.L, (1999) "The silphium motif adorning Libyan coinage: marketing a medicinal plant", **Economic botany**, 53; 2, 133-143.

31-Krzyzanowska J. Czubacka A. Pecio L. Przybus M. Doroszewska T. Stochmal A. and Oleszek W. (2011) "The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in menthea piperita cell suspension cultures", **plant cell tiss organ cult**. Vol 13, 34, 14-24.

32- Linden JC (2006) "Secondary products from plants culture",**Biotech ,** Vol 17, 43, 1-9.

33- Richard A. Daisuke T. Kayo I. Motoyoshi S. Toshinobu A. and Koichiro S. (1988) "Production of emetic alkaloid by in vitro culture of *cephaelis ipecacuanha*". **J Tropical *Medicine***.vol 12, 17, 196-203.

34- Rodney B.Crotea . Davis l. Rnger M. and Wildung N (2005) **Menthol biosynthesis and molecular genetics",** Institute of Biological Chemistry,Washington state University.pp 273.

35- Ramachandra Rao S. and Ravishankar GA. (2002) "Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites"**, Biotechnol. Adv**. Vol 20, 31, 101-153.

36- Samarth R.m. and Samarth. M. (2009)" Protection against Radiation-induced Testicular Damage in swiss albino mMice by menthe piperita(Linn.)" **J BCPT**, vol 104, 45, 329–334.

37- Savita V. And Mohan R. (2002) "Rosmarinic Acid Synthesis in Shoot Cultures Of *Mentha arvensis*"**, I j BT**,vol 12, 43, 381-385.

38-Saric-Kundalic B.Fialiva S. Dobes.C. Olzant S,Tekelova D. Gransal D. Reznicek G. and Suakel J. (2009) "Multivariate numerical Taxonomy of menthe species, Hybrids, Varieties and Cultivars",**Scientia Pharmaceitica**, vol 6, 77, 851-876.

39- Turner G. Gershenzon J. Nielson EE. Froehlich JE. and Croteau M. (1999) "Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil-gland secretory cells". **Plant Physiol,** vol 12, 120, 879–886.

40- Van L.B. (2009). "**Plant Biotechnology**". University of Science Vietnam Open Course Ware.pp 2.

41-Vasconsuelo A. Boland R. (2007) "Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants". **Plant Sci**. Vol 21,43 172, 861-875.

42- Mulabagal V. and Tsay H. (2004) "Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites", **J of Applied Science and Engineering**.vol 2, 1, 29-48.

43- Nguyen T. Thanh , Ha. Tuan A, and Paek Kee,Y. (2008) " Effects of macro elements on biomass and ginsenosideproduction in cell suspension culture of Ngoc Linh ginseng *Panax vietnamensis*" Ha et Grushv.) VNU **J of Science**. Vol 11, 24, 248-252.

44- Zhao J. Zhu W. and Hu Q. (2001) "Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture", **Enzyme and Microbial Technology** vol 9, 28, 666–672.

پیوست

جدول۳-۱- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه MS.بر حسب میلی‌گرم در لیتر

مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت MS	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول MS	ماده
۵۰			عناصر پر مصرف
	۱۶۵۰۰	۱۶۵۰	NH_4NO_3
	۱۹۰۰۰	۱۹۰۰	KNO_3
	۳۳۲۰/۰۲	۳۳۲/۰۲	$CaCL_2$
	۱۸۰۰/۵۴	۱۸۰/۵۴	$MgSO_4$
	۱۷۰۰	۱۷۰	KH_2PO4
۱۰			عناصرکم مصرف (شماره ۱)
	۸/۳	۰/۸۳	KI
	۶۲	۶/۲	H_3BO_3
	۱۶۹	۱۶/۹	$MnSO_4.H_2O$
	۸۶	۸/۶	$ZnSO_4.7H_2O$
	۲/۵	۰/۲۵	$Na_2MoO_2.2H_2O$
۱			عناصر کم مصرف (شماره ۲)
	۲/۵	۰/۰۲۵	$CuSO_4.5H_2O$
۱۰	۲/۵	۰/۰۲۵	$CoCL_2.6H_2O$
مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشتMS	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلولMS	ماده
			عناصر کم مصرف (شماره۲)
	۲۷۸/۵		$FeSO_4.7H_2O$
	۳۷۲/۵		Na_2EDTA
۱۰			ویتامین ها
	۱۰۰۰	۱۰۰	Myo-Inositol
	۵	۰/۵	Nicotinic Acid
	۵	۰/۵	Pyridoxine-HCL
	۱	۰/۱	Thiamine-HCL
	۲۰	۲	Glycine

جدول۳-۲- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه Gamborg (B5) بر حسب میلی‌گرم در لیتر

مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت MS	غلظت ماده درمحلول ذخیره	ماده
۵۰		عناصر پر مصرف
	۲۵۰۰/۰۰	KNO_3
	۱۳۴/۰۰	$(NH_4)2SO_4$
	۱۵۰/۰۰	$CaCl_2.2H_2O$
	۱۲۲/۰۹	MgSO4.7H2O
	۱۳۰/۴۲	NaH2PO4
	۱۰/۰۰	MnSO4.H2O
۱۰		عناصر کم مصرف
	۳/۰۰	H3BO3
	۰/۷۵	KI
	۰/۲۵	Na2MoO4.2H2O
	۲/۰۰	$ZnSO_4.7H_2O$
	۰/۰۲۵	CuSO4.5H2O
مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت MS	غلظت ماده درمحلول ذخیره	ماده
	۰/۰۲۵	CoCl2.6H2O
۱۰		آهن
	۲۷/۸۰	$FeSO_4.7H_2O$
	۳۷/۳۰	Na_2EDTA
۱۰		ویتامین ها
	۱۰۰/۰۰	myo - Inositol
	۱۰/۰۰	Thiamine-HCL
	۱/۰۰	Pyridoxine-HCL
	۱/۰۰	Nicotinic Acid

جدول۳-۳- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه N6 (chau)بر حسب میلی‌گرم در لیتر

مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت N6	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول N6	ماده
۵۰			عناصر پر مصرف
	۴۶۳۰	۴۶۳	$(NH_4)_2SO_4$
	۲۸۳۰۰	۲۸۳۰	KNO_3
	۱۲۵۳/۳	۱۲۵/۳۳	$CaCL_2$
	۹۰۲/۷	۹۰/۲۷	$MgSO_4$
	۴۰۰۰	۴۰۰	KH_2PO_4
۱۰			عناصرکم مصرف
	۸/۳	۰/۸۳	KI
	۱۶	۱/۶	H_3BO_3
	۳۳/۳	۳/۳۳	$MnSO_4.H_2O$
	۸۶	۸/۶	$ZnSO_4.7H_2O$

مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت N6	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول N6	ماده
	۱۵	۱/۵۰	FeNaEDTA
۱۰			ویتامین ها
	۵	۰/۵	Nicotinic Acid
	۵	۰/۵	Pyridoxine-HCL
	۱۰	۱	Thiamine-HCL
	۲۰	۲	Glycine

جدول۳-۴- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه Eriksson(ER) بر حسب میلی‌گرم در لیتر

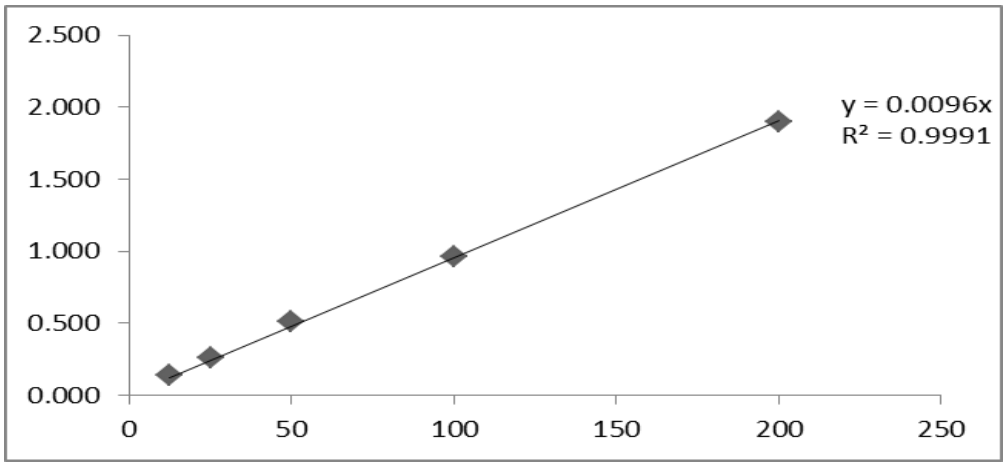
مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت ER	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول ER	ماده
۵۰			عناصر پر مصرف
	۱۲۰۰۰	۱۲۰۰	NH_4NO_3
	۱۹۰۰۰	۱۹۰۰	KNO_3
	۳۳۲۰/۰۲	۳۳۲/۰۲	$CaCL_2$
	۱۸۰۰/۵۴	۱۸۰/۵۴	$MgSO_4$
	۳۴۰۰	۳۴۰	KH_2PO4
۱۰			عناصرکم مصرف (شماره ۱)
	۶/۳	۰/۶۳	H_3BO_3
	۱/۶۹	۱/۶۹	$MnSO_4.H_2O$
	۹۱/۵	۹/۱۵	$ZnSO_4.7H_2O$
	۰/۲۵	۰/۰۲۵	$Na_2MoO_2.2H_2O$
۱			عناصر کم مصرف (شماره ۲)

جدول۳-۴- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه Eriksson(ER) بر حسب میلی‌گرم در لیتر

مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت ER	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول ER	ماده
	۰/۰۲۵	۰/۰۰۲۵	$CuSO_4.5H_2O$
	۰/۰۲۵	۰/۰۰۲۵	$CoCL_2.6H_2O$
۱۰			آهن
	۳۶۷	۳۶/۷	Fe NaEDTA
۱۰			ویتامین ها
	۵	۰/۵	Nicotinic Acid
	۵	۰/۵	Pyridoxine-HCL
	۵	۰/۵	Thiamine-HCL
	۲۰	۲	Glycine

جدول۳-۵- ترکیبات و عناصر محیط کشت پایه woody plant medium (WPM) بر حسب میلی‌گرم در لیتر

مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت WPM	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول WPM	ماده
۵۰			عناصر پر مصرف
	۴۰۰۰	۴۰۰	NH_4NO_3
	۹۹۰۰	۹۹۰	K_2SO_4
	۷۲۵	۷۲/۵	$CaCL_2$
	۱۸۰۵/۴	۱۸۰/۵۴	$MgSO_4$
	۱۷۰۰	۱۷۰	KH_2PO4
	۴۷۱۲/۶	۴۷۱/۲۶	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$
۱۰			عناصرکم مصرف (شماره ۱)
	۶۲	۶/۲	H_3BO_3
	۲۲۳	۲۲/۳	$MnSO_4.H_2O$
مقدار محلول ذخیره در یک لیترمحیط کشت WPM	غلظت ماده درمحلول ذخیره	غلظت ماده درمحلول WPM	ماده
	۸۶	۸/۶	$ZnSO_4.7H_2O$
	۲/۵	۰/۲۵	$Na_2MoO_2.2H_2O$
۱			عناصر کم مصرف (شماره ۲)
	۲/۵	۰/۲۵	$CuSO_4.5H_2O$
۱۰			آهن
	۳۶۷	۳۶/۷	Fe NaEDTA
۱۰			ویتامین ها
	۵	۰/۵	Nicotinic Acid
	۵	۰/۵	Pyridoxine-HCL
	۱۰	۱	Thiamine-HCL
	۱۰۰۰	۱۰۰	myo - Inositol



نمودار منحنی استاندارد اسید گالیک

Abstract

Menth arvensis L. is one of the most important medicinal plants from Lamiaceae family. Aerial parts of the plant contain a various number of aromatic compounds that used in food, cosmetic and pharmaceutical industries. Largescale production of Mentol has been essential target in recent years because of high commercial value of this plant. This study was carried out in two different phase. . In first phase, lateral meristem explants were disinfected and cultured on ½ MS (Murashig & skoog, 1962).Then, sterilized explants were cultured on MS, 1/2MS and ¼ MS supplemented with 0 or 2 mg/l activated charcoal and transferred to growth room with light intensity of 2500-4500 Lux for optimization of micropropagation.Leaves explants were cultured on MS media supplemented with 0, 0.5, 1 and 2 mg/l of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or Naphthalene acetic acid (NAA) alone or in combination with 6-Benzylaminopurine (BAP) or Kinetin (KIN) in concentration of 0, 0.5, 1 mg/l for callus induction.To determine the best medium for the cell suspension phase, leaves and callus explants were cultured on N6, ER,WPM, MS and B5 media supplemented with 0.5 mg/l of 2,4-D.After optimization of appropriate callus culture medium, calli were cultured on MS or B5 media complemented with 0.5 mg/l of 2,4-D with various concenteration of activated charcoal, citric acid, ascorbic acid, turmeric powder and polyvinylpyrrolidone (PVP) for assess of biosynthesis change of phenolic compounds.In the second phase, calli were transferred to suspension MS and B5 media Supplemented with 2,4-D in concentration of 0, 0.25, 0.5 and 0.75 mg/l and 30 or 60 gr/l sucrose. After accessing to appropriate volume of callus biomass, the growth index was surveyed based on dry weight and number of cell. After cell proliferation and reaching to the suitable growth phase, cell suspension were elicited with methyl jasmonate in concentration 1 and 2 µl for 48 and 72 h and 5 and 10 mg/l of chitosan for 72 and 96 h.The result indicated that ½ MS media complemented with 2 gr activated charcoal have the greatest impact (12.6 and 0.035 mm) on number and diameter of stem The highest amounts of fresh and dry weight of callus (12.3 and 1.88 gr) were observed on MS media supplemented with 0.5 mg/l of 2,4-D.

In comparison between different media, the maximum dry weight (0.6 gr) was indicated on B5 medium. The greatest amount of phenol (127 ml/gµ) in media and also lowest quantity (72.9ml/gµ) of phenol in callus was observed in media with 1000 mg/l of turmeric powder.In suspension phase, maximum amount of dry weight was observed on B5 media with 30 and 60 gr/l of sucrose. A s well as, the dry weight significantly increased on 0.5 and 0.75 mg/l of 2,4-D. Moreover, both of maximum cell growth index (0.25 gr) and highest number of cell were indicated in B5 medium with 60 gr/l sucrose in sixteen days of growth. As well as, some important compounds such as p-cimine, dodecanol, tetra decanol, eugonol, were illustrated. The result of this study could applied as beneficial alternative for production of secondery metabolites by biotechnological approch such as cell culture.

Key word: *Mentha arvensis*, Calus, cell suspanstion, mentol

Shahrood university of technology
Faculty Of Agriculture
Department Of Hurticulture

The effect of various hormonal and elicitor treatments on suspension culture of *Mentha arvensis*

Sara ghezelbash

Supervisors

Dr. Hojatolah bodaghi
Dr. Ardeshir qadeir

Advisor:
Dr. Ziba Ghasimi Hagh –Amir reza zare

February, 2016