مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و چهارم- پائیز۱۳۹۵

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی صفت های گیاه موتانت نعناع فلفلی با روش استفاده از جهش زائی موتاژن EMS

امیر رجبی[1*]، سعید قریب بلوک[1]، سید کمال کاظمی تبار[2]، جعفر مسعود سینکی[1]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان،ایران
۲. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

سابقه و هدف: موتاژن های شیمیایی با اثرهای موتاژنی، خزانه ژنی متنوعی را در منابع گیاهی ایجاد کرده و به عنوان یک ابزار تکمیلی در فرایند های به نژادی به کار گرفته می شوند. در این پژوهش به منظور ایجاد تغییر صفت های مورفولوژیک و تغییر در میزان مواد موثره در گیاه نعناع فلفلی از غلظت های مختلف ماده موتاژن اتیل متان سولفونات EMS در شرایط درون شیشه ای و مزرعه استفاده شد.

مواد و روش ها: پژوهش به صورت شرایط درون شیشه ای و مزرعه با تعداد ۴ تیمار و ۴ تکرار در قالب طرح به طور کامل تصادفی انجام شد. از تیمارهای مختلف EMS شامل ۰/۰٪ (به عنوان شاهد)، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۱٪ و ۰/۰۰۵٪ و مدت زمان‌های مختلف (۲۴ و ۴۸ ساعت) در شرایط درون شیشه ای و قسمت مزرعه ای استفاده شد. ارزیابی در داخل لوله آزمایش و مزرعه به طور هم زمان انجام گرفت. پس از انتقال و رشد و نمو نمونه‌ها در شرایط in vitro، تیمارها با ماده جهش‌زا اتیل متان سولفونات مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از مواد جهش‌زا در محیط کشت MS نقش به سزایی در تغییر فنوتیپی این گیاه دارویی دارد. غلظت ۰/۰۱٪ EMS بهترین نتیجه معنی‌دار را در سطح ۱٪ داشته و از کشت ریزنمونه های که شامل جوانه‌های جانبی و انتهایی بوده‌اند به دست آورده که بر روی خصوصیت هایی هم چون طول ساقه، تعداد برگ و تعداد جوانه جانبی اثر داشت. هم چنین نتیجه آنالیز اسانس تیمارها نیز نشان داد که ماده اتیل متان سولفونات روی مواد اجزاء اسانس تاثیری نداشته است.

نتیجه گیری: استفاده از موتاژن EMS در گیاه نعناع فلفلی هم در نمونه های کشت بافتی و هم در بوته های تیمار شده در مزرعه باعث تحریک و رشد سریع جوانه های جانبی گیاه شد که باعث افزایش سطح گیاه و در نتیجه افزایش عمل کرد گیاه شده بود. استفاده از غلظت های بیش تر از ۰/۰۵٪ EMS در زمان های ۲۴و ۴۸ ساعت باعث از بین رفتن نمونه های کشت بافتی و مزرعه‌ای شد.

کلمات کلیدی: موتاژن شیمیایی، نعناع فلفلی، اتیل متان سولفونات، شرایط درون شیشه ای، اسانس گیاه

مقدمه

اصلاح به کمک جهش در گیاهان زراعی ابزار موثری برای اصلاح کنندگان نبات به خصوص در محصول هایی که پایه ژنتیکی محدودی دارند، می باشد.

به طور کلی هدف از ایجاد جهش مصنوعی، تغییر یک یا چند ژن نزدیک به هم و شکستن هم بستگی و افزایش کراسینگ اور بین ژن های مطلوب و نامطلوب می باشد. (۱۶، ۴۱) جهش حداکثر تنوع قابل توارث برای عمل انتخاب را فراهم می کند و تنوع حاصل از جهش اگر موجب سازگاری شود، به حفظ بقای موجودات در محیط های متغیر کمک می کند. (۲۴) اصلاح به کمک جهش مقرون به صرفه بوده و زمان اصلاح یک رقم را بدون تغییر بقیه ترکیب ژنتیکی آن کاهش می دهد. (۳۰) استراتژی اصلی در اصلاح بر پایه جهش ایجاد سریع واریته های گیاهی سازگار با عمل کرد بالاتر و کیفیت بهتر می باشد. (۱۸،۲۷) نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha pipertia L.* از خانواده Lamiaceae از جمله گیاهان دارویی و معطری است که اسانس آن مصارف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی فراوانی دارد. این گونه، هیبریدی است که از تلاقی بین گونه های *Mentha spicata* و *Mentha aquatic* (۴) به دست آمده

نویسنده مسئول :
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه
پست الکترونیکی: Amir.rajabi1368@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۰۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

است. (۱۱، ۱۲) ترکیب های موجود در این گیاه دارای خاصیت آنتی اکسیدانی، قارچ کشی و حشره کشی می باشند. (۴۴، ۳۵، ۱۹) خاصیت ضد میکروبی آن علیه Escherichia coli و Candida albicans و Staphylococcus aureus تأیید شده است. (۴۳، ۸) اثر عصاره این گیاه روی تشکیل مایه قارچ های اندوفیت برگی مورد بررسی قرار گرفته و تأثیر بازدارندگی آن به اثبات رسیده است. (۲۸) هم چنین ثابت شده که اسانس روغنی نعناع باعث از بین رفتن گونه ای از سالمونلا شده (۴۲) و روی *Candida albicans* دارای بازدارندگی می باشد. (۳۷) در کروماتوگرافی، وجود دی اتیل اتر و استیک اسید در عصاره گیاه به اثبات رسیده که میزان این ترکیب های به محیط رویش گیاه بستگی دارد.(۲۶) هم چنین وجود شش ماده شیمیایی ایزومنتول، پلی گون، نئومنتول، منتول، پیپریتون و نئو ایزومنتول در روغن گیاه مشخص شده است.(۳۸، ۴۰) منوترپن ها و سزکویی ترپن ها نیز در گیاه نعناع فلفلی سنتز می شود. (۲۹) ترکیب های منتول، اتیل استات و نئومنتول در اندام های مسن گیاه بیش تر وجود دارد در حالی که منتول و ایزومنتول در اندام های جوان یافت می شوند. هم چنین در مقایسه با برگ ها، گل ها حاوی مقادیر بیش تری از منتوفورین هستند. (۲۲) وجود فلاونوئید ها نیز در برگ گزارش شده است. (۱۷) فلاونوئید ها گروهی از متابولیت های ثانویه هستند که در بسیاری از فعالیت های بیولوژیکی گیاه شامل فعالیت های دفاعی گیاه دخالت دارند.(۹) شش فلاونوئید شامل اریوسیتین، ناریروتین، هیسپریدین، لوتیولین ۷- او - روتینوساید، ایزورویفولین، دیوسمین و هم چنین رزماریک اسید در جنس *M. pipertia* وجود دارد.(۴۳) وجود ترکیب منتوفرولاکتون نیز در اندام های هوایی نعناع فلفلی گزارش شده است.(۱۷) اسانس این گیاه حداقل ۵ درصد استر و حداقل ۵۰ درصد منتول به حالت استری یا آزاد،۵ -۳ درصد منتون و مقدار کمی سینئول و دیگر ترپن ها را دارا می باشد. (۲۳) تکنیک جهش برای بهبود تقریبی تمام صفت های مهم زراعی، از تحمل به تنش های زنده (مانند شوری، سرما، اسیدیته و....) تا مقاومت به بیماری، از کیفیت غذایی تا بازارپسندی و از ساختمان گیاه تا پتانسیل محصول به کار گرفته شده است. (۳۳)

تکنیک موتاسیون گاهی وقت ها تنها روشی است که برای بهبود صفت های هم پوشان، با هدف ثابت ماندن یکی از صفت ها، کاربرد دارد و گاهی تنها راه برای بهبود عمل کرد است و زمانی که بخواهند صفت های مطلوب خاصی را بدون تغییر سایر خصوصیت ها حفظ کنند، مانند واریته های سنتی برنج باسمتی در هند و پاکستان، از موتاسیون استفاده می شود. (۳۶) از روش جهش زایی با پرتو برای اصلاح رنگ گل در اطلسی استفاده کردند. (۱۵) بسیاری از واریته های موتانت مانند واریته برنج یا نفنگ زو در اوایل دهه ۱۹۸۰ و زفو ۸۰۲ در اوایل دهه ۱۹۹۰ در چین برای تولید برنج زودرس آزاد شدند.(۲۵) چندین ژن جهش یافته جدید به واریته های تجاری برنج انتقال یافتند که نمونه آن انتقال آلل های موتانت sd1 در ژاپن به واریته ریمی و در آمریکا به واریته کارلوس ۷۶ با هدف ایجاد واریته های پاکوتاه می باشد. (۳۱) در تحقیقی از دوتا موتاژن فیزیکی (اشعه) و شیمیایی (EMS) آزاد شد. برای اعمال تیمارهای موتاژنی در سه رقم برنج ایرانی به نام های طارم محلی، طارم دیلمانی و شفق استفاده کردند. ارتفاع بوته نسبت به شاهد کاهش زیادی نشان داد. میزان عقیمی خوشه در مقایسه با شاهد افزایش یافت. در نسل دوم تعداد پنجه و مقدار دانه در خوشه که از اجزای اصلی عمل کرد می باشند در اکثر موارد افزایش یافتند. میزان عمل کرد دانه به جز چند مورد استثناء در همه موارد افزایش بسیار زیادی نسبت به شاهد داشت. در نهایت سه لاین بسیار یکنواخت، پاکوتاه و زودرس در رقم طارم محلی تحت تیمارهای ۰/۱ درصد EMS و ۳۵۰ گری اشعه به دست آمد. (۲۴) این نتایج به روشنی نشان می دهد که تکنیک های جهش ابزاری مفید و بی نظیر برای اصلاح گیاهان هستند.

مهم ترین مواد جهش زای شیمیایی مورد استفاده شامل اتیل متان سولفونات (EMS)، اتیل اتان سولفونات (EES)، اتیل بوتان سولفونات (EBS)، متیل متان سولفونات (MMS)، متیل اتان سولفونات (MES)، دی اتیل سولفونات (DES)، گاز خردل، هیدرازین (HZ)، هیدروکسین آمین (HA) می باشند؛ البته در بین موتاژن های شیمیایی، استفاده از EMS رایجتر است. (۷) عوامل آلکیلی مثل اتیل متان سولفونات (EMS) و اتیل اتان سولفونات (EES) یک گروه متیل یا اتیل به کربن شماره ۷ باز گوانین در رشته DNA اضافه می کنند. اگر باز گوانینی که تحت تاثیر عوامل آلکیلی قرار گرفته از رشته DNA جدا نشود، در جفت شدن همانند آدنین عمل کرده و می تواند با تیمین یا سیتوزین جفت شود که این سبب می شود دی نوکلئوتید GC به AT تبدیل شود. (۳۹) در گیاهان EMS به طور معمول باعث جهش های نقطه ای شده اما از دست دادن یک قطعه کروموزومی و یا حذف آن نیز می تواند رخ دهد.(۲۰) EMS به عنوان عامل ایجاد جهش نقطه ای باعث پیدایش دامنه گسترده ای از آلل های جهش یافته، مانند از دست دادن کارکرد ژن، به دست آوردن کارکرد جدید، تغییر کارکرد ژن و تولید جهش یافته های جدید با خصوصیت های ویژه می شود. این درحالی است که جهش های حاصل از پرتوهای گاما، اغلب

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

باعث حذف و اضافه شدن یک رشته نوکلئوتیدی و بروز جهش یافته های با کارکرد از دست رفته ژن ها می شوند.(۳۲) برتری ویژه اصلاح موتاسیونی در گیاهان، امکان به دست آوردن تنوع ژنتیکی کافی و نیز بهبود گیاهان با تکثیر رویشی می باشد. به خصوص زمانی که هدف به نژادگر تغییر یک یا تعداد کمی خصوصیت از یک واریته تجاری الیت باشد.(۴۱) حال با توجه به این که ماده شیمیایی اتیل متیل سولفانات (EMS) از جمله مواد آلکیله کننده هست و سبب اضافه شده گروه‌های آلکیل به نوکلئوتیدهای مولکول DNA می گردد و سبب ایجاد جهش نقطه ای می شود، هدف ما بررسی تغییر در میزان مواد موثره گیاه در غلظت‌های مختلف ماده جهش‌زایEMS می‌باشد.

مواد و روش ها

تهیه، ضدعفونی و کشت نمونه ها

این پژوهش در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. جهت انجام پژوهش گیاه نعناع فلفلی *Mentha piperita* در سال زراعی ۹۲-۹۱ از مزرعه گروه باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جمع آوری گردید و نمونه‌ای از گیاه سالم و عاری از آلودگی در پژوهشکده دانشگاه با نمونه هرباریومی مقایسه و تائید نام علمی شد. اندازه گیری صفات مورفولوژیک برای صفت هایی چون طول ساقه و ریشه و متوسط برگ با خط کش انجام شد و تعداد برگ، تعداد ریشه و تعداد جوانه نیز شمارش شد.

نمونه‌ها را پس از برداشت از مزرعه دانشگاه به آزمایشگاه انتقال داده، ۵ دقیقه با آب‌روان شستشو داده تا خاک و گرد و غبار آن از بین برود. در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در مایع ظرف شویی قرار داده شدند. سپس به مدت ۳ دقیقه با آب‌روان شستشو داده شده و ۲۰ دقیقه در آب مقطر غوطه‌ور گردید و به اتاقک کشت انتقال داده شد. مراحل ضد عفونی نمونه‌ها به شرح زیر بود.

۱- بنومیل یک درصد + سه قطره توئین در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر به مدت یک دقیقه

۲- شستشو با آب مقطر یک دقیقه

۳- غوطه‌ور کردن در هیپوکلرید سدیم (وایتکس) ۵٪ به مدت ۷ دقیقه

۴- شستشو با آب مقطر ۳۰ ثانیه

۵- غوطه‌ور کردن نمونه‌ها در الکل ۷۰٪ به مدت ۵ ثانیه

۶- شستشو با آب مقطر ۳ مرتبه و هر بار ۳ دقیقه

۷- ریختن نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی سترون و خشک کردن آن ها (۳)

ریزنمونه ها از جوانه های جانبی، جوانه های انتهائی، ساقه، برگ، دم برگ و ریشه‌ها انتخاب شد. با استفاده از اسکالپل و پنس ریزنمونه ها به قطعات ۰/۵ سانتی متری در آمده و هم داخل لوله های آزمایش ۱۰ و ۱۵ سانتی‌متری و هم در پتری دیش‌های سایز ۸ (درهر پتری ۵ نمونه) که حاوی محیط کشت پایه (MS) بود کشت شدند. درب ظروف کشت با پارافیلم مسدود شده و به انکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای ریز ازدیادی و تشکیل گیاه کامل انتقال داده شدند. این آزمایش هم به صورت مزرعه ای و هم به صورت آزمایشگاهی (کشت بافتی) مورد بررسی قرار گرفت. در قسمت آزمایشگاهی سرشاخه‌های رشد یافته در محیط MS بدون هورمون را با غلظت‌های ۰/۰٪ (به عنوان شاهد کشت بافتی)، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۱٪ و ۰/۰۰۵٪ EMS و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار داده شد. در قسمت مزرعه‌ای نیز از همین غلظت ها و زمان ها استفاده شد.

روش اعمال تیمارهای EMS در گیاه کشت بافتی

نمونه های کشت بافت سالم و عاری از آلودگی را جدا کرده و به همراه استوک های EMS به داخل اتاقک کشت انتقال داده تا در زیر هود عمل اعمال تیمارهای صورت پذیرد. ابتدا درب لوله ها را باز کرده و با پنس استریل شده چند برگ انتهائی (برگ‌های پایین) را فشار داده تا ایجاد خراش نماید و EMS از محل ایجاد این زخم‌ها وارد سیستم گیاه شود. سپس با سرنگ از استوک EMS ۰/۰۵٪ برداشته و داخل لوله آزمایش تا آنجائی که خراش در برگ ایجاد شده ریخته (۴ تکرار برای تیمار ۲۴ ساعت و ۴ تکرار برای تیمار۴۸ ساعت) و به سرعت درب آن ها را با پارافیلم بسته و مشخصات تیمارها بر روی لوله‌ها یادداشت شد. برای EMS با غلظت‌های۰/۰۱٪ و ۰/۰۰۵٪ نیز به صورت روش قبل عمل می شود. در نهایت لوله‌های آزمایش به انکوباتور انتقال داده شد.

روش اعمال تیمارهای EMS در مزرعه

ابتدا بوته‌هائی را که به صورت مجزا در حال رشد هستند را شناسائی کرده (۵ تا ۶ ساقه‌ای) سپس ساقه که مورد آزمایش قرار می‌گیرند را انتخاب کرده و برگ‌های قسمت فوقانی آن را چیده و فقط دو برگ انتهائی را نگاه داشته، میکروتیوپ را داخل زمین فرو کرده، ساقه را داخل آن قرار داده (۴ ساقه را در ۴ میکروتیوپ به صورت جداگانه قرار داده شد.) و با سرنگ تیمارهای مشخص شده EMS را داخل میکروتیوپ ریخته و کمی سر میکروتیوپ را خالی گذاشته تا بتوان با محیط کشت MS درب آن ها را بست. تیمارها به شرح زیر اعمال شد:

تیمار یک EMS۰/۰۱٪ به مدت ۴۸ ساعت، تیمار دو EMS۰/۰۱٪ به مدت ۲۴ ساعت، تیمار سه EMS ۰/۰۵٪ به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

مدت ۴۸ ساعت، تیمار چهار EMS ۰/۰۵٪ به مدت ۲۴ ساعت می‌باشد.

روش شستشوی تیمارها

پس از گذشت مدت زمان مورد نظر اقدام به شستشو و تمیز نمودن نمونه‌ها از EMS به صورت زیر شد. نمونه‌های کشت بافتی مورد تیمار را به اتاقک کشت انتقال داده و در زیر هود ابتدا درب آن ها را باز کرده و محلول EMS موجود در لوله آزمایش را خارج کرده و چندین مرتبه داخل لوله آزمایش آب مقطر سترون شده ریخته تا کاملا شستشو شود، در ادامه برای جبران کمبود مواد غذائی چند قطر از محیط کشت MS مایع را بر روی محیط کشت قبلی ریخته و به سرعت برای جلوگیری از آلودگی درب آن ها با پارافیلم بسته می شود. برای گیاهانی که در مزرعه نیز مورد تیمار قرار گرفته بودند نیز به صورت زیر عمل شد: ابتدا ساقه ها را از داخل میکروتیوپ در آورده و میکروتیوپ‌ها را داخل یک نایلون ریخته و از بین برده می شود، سپس با سرنگ با آب مقطر چندین مرتبه قسمت‌هایی از گیاه که در تماس با EMS بودند را شستشو داده تا به طور کامل تمیز شوند. دور بوته‌های هر تیمار را سنگ چین نموده تا از این به بعد گیاهانی که سبز می‌شوند یا از کنار ساقه‌های قبلی جوانه می‌زنند شناسائی و مورد بررسی قرار داده شود.

استخراج اسانس و شناسایی کمی و کیفی اجزای موجود در اسانس

استخراج اسانس گیاه مورد نظر توسط روش تقطیر با آب مقطر و با استفاده از دستگاه کلونجر انجام گرفت. نظر به این که پس از اعمال ماده جهش‌زا اتیل متیل سولفونات احتمال تغییر در میزان و اجزاء اسانس گیاه نعناع فلفلی وجود دارد، لذا شناسایی ترکیب ها نیز صورت گرفت. پس از آب گیری اسانس استحصال شده که توسط دستگاه روتاری صورت پذیرفت، جهت تجزیه کمی و کیفی اسانس مذکور توسط حلال اتانول ۱۰۰٪ به میزان ۲ سی‌سی به آن اضافه شد. نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردید. پس از تزریق، طیف های کروماتوگرام گازی و طیف‌های جرمی اجزای متشکله هر اسانس به دست آمد. در مرحله بعد با مقایسه طیف‌های جرمی ترکیبات مجهول و طیف های جرمی ترکیب ها استاندارد و هم چنین محاسبه ضرایب بازداری مواد متشکله موجود در هر اسانس، ضرایب بازداری کوواتس و درصد هر یک از اجزای تشکیل دهنده را نشان می دهد. کرماتوگرام گازی پیک‌ها را به ترتیب زمان بازداری نشان می دهد. هر چه سطح زیر پیک بیش تر باشد درصد آن جزء در اسانس بیش تر است. از آنجایی که ترکیب های موجود در اسانس‌ها به لحاظ ورن مولکولی و قطبیت به عنوان مواد فرار شناخته می‌شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیب های متشکله اسانس به دست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) انجام گردید. برای این منظور طیف‌های جرمی به دست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرمی استاندارد موجود در منابع (۶) مقایسه گردید. برای تائید شناسایی انجام شده توسط طیف های جرمی، از شاخص بازداری کواتس استفاده شد. (جدول۱) (۱۴)

دستگاه GC	مدل HP-6890 شرکت HEWLETT PACKAR آمریکا
نوع ستون	HP-5MS (5% Phenyl di methyl siloxan)
ابعاد ستون	طول ۳۰ متر، قطر۰,۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰,۳۲ میکرون
برنامه ریزی دمایی ستون	دمای اولیه ۶۰درجه سانتیگراد(۳ دقیقه)، گرادیان دمایی۵، دمای نهایی ۲۲۰درجه
محل تزریق	Split/split less
دمای محل تزریق	۲۵۰ درجه سانتیگراد
گاز حامل	هلیوم با شدت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه
دستگاه Mass	مدل HP-5973 شرکت HEWLETT PACKAR آمریکا
انرژی یونش(EI)	۷۰ الکترون ولت
دمای محفظه یونش	۲۳۰ درجه سانتیگراد
تجزیه‌گر جرمی	کوادروپل
دمای تجزیه‌گر جرمی	۱۵۰ درجه سانتیگراد

جدول .۱شرایط دستگاه GC-MS

آنالیزهای آماری

داده‌های آزمایشی مختلف پس از جمع‌آوری با استفاده از نرم افزارهای SPSS به وسیله آزمون دانکن آنالیز و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها

تاثیر EMS بر روی خصوصیت های مرفولوژیکی گیاه

ارزیابی دقیق تاثیر EMS بر گیاه و انتخاب مناسب ترین غلظت و زمان تیمار، نیازمند دامنه وسیعی از غلظت ها و زمان ها می‌باشد. به همین منظور در این پژوهش از غلظت‌های معتددی که در مواد و روش‌ها توضیح داده شد، استفاده گردید. در غلظت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

های بیش تر از ۰/۰۵٪ EMS نمونه های کشت بافتی از بین رفتند، از این رو کلیه داده های بیش از ۰/۰۵٪ حذف و داده های به دست آمده در تجزیه واریانس وارد نگردیدند. پس از اعمال EMS به صورتی که در فصل مواد و روش ها توضیح داده شده، خصوصیت های مورفولوژیکی هر ۸ روز یک بار به مدت ۴۰ روز مورد بررسی و اندازه گیری قرار گرفتند و به از این مدت آنالیز داده ها انجام پذیرفت.

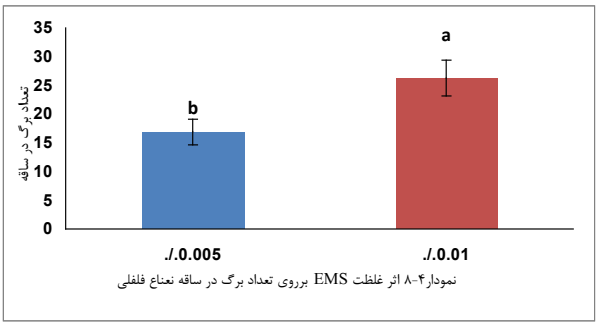
اثر دوز EMS و زمان برروی طول ساقه

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول۲) نشان داد که بین دوزهای ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ ٪ EMS تاثیر معنی‌داری بر روی طول ساقه در سطح احتمال ۱٪ وجود داشته است که دوز ۰/۰۱٪ دارای تاثیر بیش تری بوده و در این بررسی اثر متقابل دوز و زمان معنی‌دار نبوده است. اثر متقابل دوز و زمان برروی طول ریشه نشان داد که بین دوزهای اثر معنی‌دار وجود نداشته است. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین دوزهای ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ ٪ EMS تاثیر معنی‌داری بر روی تعداد برگ در سطح احتمال ۵٪ وجود داشته است که دوز ۰/۰۱٪ دارای تاثیر بیش تری بوده و در این بررسی اثر متقابل دوز و زمان معنی‌دار نشده است.

منبع تغییرات	میانگین مربعات (MS)							
	درجه آزادی	طول ساقه (Cm)	طول ریشه (Cm)	تعداد برگ	تعداد ریشه جانبی	تعداد جوانه	طول برگ	تعداد ریشه
دوز	۱	۸/۷۲**	۱/۹۲ns	۶/۹۶*	۱۲/۲۲**	۵/۴۴*	۰/۱۷ns	۲/۱۴ ns
زمان	۱	۰/۵۴ns	۱/۰۳ns	۰ns	۲/۱۸ns	۲/۷۸ns	۰/۵۸ns	۱/۴۳ ns
دوز * زمان	۱	۲/۳۷ns	۰/۲۸ns	۴/۳ns	۰/۰۶ns	۰/۱۱ns	۱/۸۱ns	۰/۰۲ ns
اشتباه آزمایش	۱۲	۱۲/۴۷۸	۱/۹۴۵۱	۵۰/۰۵۶	۱۹/۸۶	۲/۲۵	۰/۰۲۰	۶/۲۷

ns،* و ** به ترتیب غیر معنی دار ، معنی دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر متقابل دوز EMS و زمان برروی بررسی صفات گیاه



نمودار۴-۸ اثر غلظت EMS برروی تعداد برگ در ساقه نعناع فلفلی

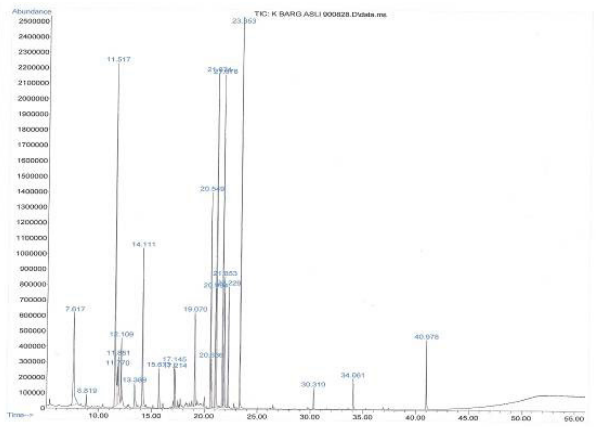
اثر دوز EMS و زمان برروی تعداد ریشه جانبی نشان داد که بین دوزهای ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ ٪ EMS تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشته است که دوز ۰/۰۱٪ دارای تاثیر بیش تری بوده و در این بررسی اثر متقابل دوز و زمان معنی‌دار نشده است. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین دوزهای ۰/۰۰۵ و ۰/۰۱ ٪ EMS تاثیر معنی‌داری بر روی تعداد جوانه در سطح احتمال ۵٪ وجود داشته است که دوز ۰/۰۱٪ دارای تاثیر بیش تری بوده و در این بررسی اثر متقابل دوز و زمان معنی‌دار نشده است. هم چنین نتایج نشان دادند که بین دوزهای و اثر متقابل دوز و زمان برروی طول برگ و تعداد ریشه اثر معنی‌دار وجود نداشته است.

طیف کروماتوگرام گازی گیاه

در این قسمت پیک‌های مربوط به کروماتوگرام گازی اسانس شاهد و نمونه های تحت تیمار گیاه نعناع فلفلی که به روش تقطیر با آب به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت.

ترکیب های تشکیل دهنده اسانس

میزان مواد موثره موجود در اسانس گیاه نعناع فلفلی در (جدول ۳) نشان داده شده است که به ترتیب Mint furanone، Menthone، Diethyl phthalate، Eucalypot و Pulegone بیش ترین مقدار اسانس را به خود اختصاص داده اند.



شکل۴. کروماتوگرام گازی اسانس نعناع فلفلی

ترکیبات	R.T	درصدترکیبات(area%)	درصدتخمینی
Eucalypot	۷،۶۱۶	۶،۱۸	۹۵
Terpineol cis-beta	۸،۸۱۸	۰،۴۱	۹۴
Menthone	۱۱،۵۱۸	۱۳،۶۵	۹۸
Menthofuran	۱۱،۷۷۰	۱،۹۷	۹۳
Cyclohexanone	۱۱،۸۵۰	۲،۳۷	۹۸
Menthol	۱۲،۱۰۸	۱،۸۷	۹۱
Buten	۱۳،۳۹۰	۱،۴۸	۶۲
Pulegone	۱۴،۱۱۱	۶،۰۲	۹۸
Menthyl acetat	۱۵،۶۷۳	۱،۸۵	۹۰
Trans-Caryophyllene	۱۹،۰۷۱	۳،۵۹	۹۹
Hydroxy 4,5 dimethylacetophe	۲۰،۹۹۴	۳،۶۷	۷۲
Mint furanone	۲۱،۰۷۴	۱۲،۹۴	۹۷
Diethyl phthalate	۲۳،۳۵۱	۱۱،۲۹	۹۲
Hexadecanoic acid	۳۰،۳۰۹	۰،۶۲	۹۶
Octadecanic acid	۳۴،۰۶۳	۰،۹۴	۹۸
Benzenedi carboxylic acid	۴۰،۹۸۱	۲،۲۷	۶۴

جدول۳. میزان مواد موثره موجود در اسانس نعناع فلفلی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش و پس از تجزیه و تحلیل داده ها، نتایج به دست آمده نشان داده‌اند که غلظت موتاژن EMS به خصوص در دوز ۰/۰۱٪ بیش ترین اثر را بر روی خصوصیت های اندازه گیری شده که دارای اثر معنی‌داری هستند داشته است. نتیجه تجزیه داده نشان داد که دوز ۰/۰۱٪ EMS دارای بیش ترین اثر بر روی طول ساقه گیاه نعناع فلفلی را داشته و تاثیر معنی‌داری در سطح ۱٪ از خود نشان داده است و از آن‌جایی که این گیاه علفی بوده و دارای ساقه رونده می‌باشد با افزایش طول ساقه، تعداد برگ نیز افزایش یافته و در سطح ۵٪ دارای اثر معنی داری شده است. اما اثر دوز، زمان و اثر متقابل دوز و زمان بر روی متوسط طول برگ دارای اثر معنی‌داری نبوده است. نتایج حاصله نشان داد که دوز، زمان و اثر متقابل آن دو بر روی طول ریشه و تعداد ریشه هیچ گونه اثر معنی‌داری را نداشته و موتاژن EMS نتوانسته است باعث ایجاد تغییرهایی در ناحیه ریشه گیاه شود. نکته قابل توجه در این تحقیق این بود که پس از تیمار نمونه های کشت بافتی با EMS در هر دو دوز مورد بررسی ریشه‌های جانبی (منظور ریشه هایی که از روی ساقه و یا از محل جوانه‌ها روی ساقه رشد کرده بودند است) که قبل از اعمال تیمار یا وجود نداشته یا بسیار کم بوده‌اند به سرعت تعداد این ریشه های جانبی افزایش پیدا نمود و باعث شد اثر دوزهای اعمال شده به خصوص۰/۰۱٪ دارای تاثیر معنی‌داری در سطح ۱٪ شود. یکی دیگر از یافته های این پژوهش اثر ماده موتاژن EMS برروی تحریک رشد جوانه‌های جانبی بود به طوری که هر دو دوز EMS دارای اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بود و در بین این دو غلظت، دوز ۰/۰۱٪ دارای اثر بیش تری بود و رشد سریع جوانه های جانبی مشاهده شد. در بررسی اثر القای موتاسیون توسط موتاژن شیمیایی EMS و روابط صفت هایی در اسپرس، تعداد ۴۰ ژنوتیپ موتانت نسل سوم به همراه ۳۹ ژنوتیپ غیر موتانت از نظر خصوصیت های مورفولوژیک و زراعی به مدت دو سال تحت شرایط مزرعه و مقایسه میانگین به تفکیک سال ها نشان داد که فامیل های موتانت در سال دوم پس از استقرارکامل از عمل کرد علوفه خشک و نسبت برگ به ساقه بیش تری نسبت به فامیل های غیر موتانت برخوردار بودند. (۲) در گزارشی، گیاهان تیمار شده با EMSوگیاهان بدون تیمار با EMS مورد بررسی با RAPD - PCR قرار گرفتند، با استفاده از پرایمر های استاندارد مشخص شد که تفاوت در باند های حاصل از DNA تکثیر شده محصول PCR گیاهان تیمار شده به مدت ۱۵ دقیقه با EMSنسبت به بقیه نمونه ها به وضوح دیده می شود. در بررسی های انجام شده در رابطه با سنجش کلروفیل a و b به این نتیجه دست یافتند که نتایج حاصل از اندازه گیری مقادیر کلروفیل تفاوت معنی داری در هیچ یک از نمونه ها نشان نداد.($P\geq$۰/۰۵). (۵) نتایج حاصل از این آزمایش، این پروژه را که مبنی بر بی اثر بودن موتانت ها نسبت به ماده جهش زا در رابطه با میزان جذب کلروفیل می باشد را تائید می کند. در پژوهشی که بر روی گیاه *Urgenia indica* (۱) ، انجام شد، نشان داد که میزان کلروفیل در گیاهان موتانت تغیر معنی داری ایجاد نشد. (۳۸) اثر EMS را روی جوانه‌زنی گندم مورد مطالعه قرار داد و اعلام نمود که با افزایش غلظت موتاژن، مقدار جوانه‌زنی کاهش می‌یابد که در این پروژه نیز به این نتیجه دست یافته شد که افزایش غلظت باعث از بین رفتن نمونه ها می شود. (۱۷) در گیاهانی که تحت تیمار EMS با غلطت ۱/۲، ۰/۸، ۰/۴ قرار گرفته بودند بیش ترین درصد نقص در بیوسنتز کلروفیل در گیاهانی که با دوز ۱/۲ درصد تیمار شده بودند ایجاد شد و به این نتیجه دست یافته شد که افزایش غلظت باعث از بین رفتن نمونه ها می شود. (۲۱) اثر غلظت های EMS را در تولید پایه های موتانت M.truncatula که در ژن های عامل گره‌زایی آن ها جهش رخ داده بود، مورد بررسی قرار داده‌اند و اعلام نموده اند که با افزایش غلظت میزان کشندگی نیز افزایش می‌یابد. (۱۰) در آزمایش های انجام شده بر روی برنج ذکر نموده اند که بین طول خوشه و میان گره‌ها هم بستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد که در این تحقیق به رابطه بین طول ساقه و تعداد جوانه پی برده که اثر مثبت و معنی‌داری بین آن دو وجود دارد. پاتیل و همکاران نیز که بر روی صفتهای کمی یک واریته از سویا تحقیق کردند و گیاه را تحت تیمار با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ حجمی EMS قرار داده بوده‌اند مشاهده نمودند که درصد جوانه‌زنی در همه تیمارها به استثناء تیمار ۰/۰۵ EMS به طورمعنی‌داری کاهش نشان داده است. (۱۳) نتایج مشابهی در سویا گزارش گردیده است. (۳۴) درصد بقا در آزمایشی که توسط آن ها صورت گرفت تحت تیمارهای موتاژنی به حداقل ممکن کاهش یافت که در مقادیر بالای موتاژن (۲۰ و ۲۵کلیوراد اشعه گاما و ۰/۱۵ درصد EMS) و تیمار ترکیبی این دو نوع موتاژن، کاهش آن معنی‌دار بوده است. تا به حال تحقیق های چندانی روی تاثیر موتاژن EMS بر گیاهان دارویی چه در حالت مزرعه‌ای و چه در حالت کشت بافتی یا انجام نشده است یا این که گزارشی در این زمینه ارائه نشده است و بیش تر تاثیر این موتاژن را بر روی بذرهای گیاهان مهمی مثل گندم و برنج انجام داده‌اند و با توجه به این که گیاه نعناع فلفلی از طریق بذر کشت و کار نمی شود تا به حال کاری در این زمینه برروی این گیاه صورت نپذیرفته است. در گزارشی در مورد القای موتاسیون

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

در اسپرس نشان دادند که تیمارهای EMS تنوع قابل ملاحظه ای برای ارتفاع بوته، تعداد ساقه در بوته و تعداد شاخه فرعی (گل آذین) در توده های اسپرس مورد مطالعه ایجاد نمودند. نتایج نشان داد که در مجموع فامیل های موتانت دارای نسبت برگ به ساقه بیش تر و تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی کم تر بودند، در حالی که برای صفت هایی چون عمل کرد علوفه تر و خشک غیرموتانت ها بهتر عمل کردند. در مورد بقیه صفت ها نیز اختلاف معنی داری بین موتانت ها و غیرموتانت ها دیده نشد. (۳۵)

نتیجه گیری

غلظت موتاژن EMS به خصوص در دوز ۰/۰۱٪ بیش ترین اثر را بر روی خصوصیت های اندازه گیری شده داشته است. هم چنین دوز ۰/۰۱٪ EMS دارای بیش ترین اثر بر روی طول ساقه گیاه نعناع فلفلی را داشته و تاثیر معنی‌داری در سطح ۱٪ از خود نشان داده است. با افزایش طول ساقه، تعداد برگ نیز افزایش یافته و در سطح ۵٪ دارای اثر معنی داری شده است. اما اثر دوز، زمان و اثر متقابل دوز و زمان بر روی متوسط طول برگ دارای اثر معنی‌داری نبوده است. نتایج حاصله نشان داد که دوز، زمان و اثر متقابل آن دو بر روی طول ریشه و تعداد ریشه هیچ گونه اثر معنی‌داری را نداشته و موتاژن EMS نتوانسته است باعث ایجاد تغییرهایی در ناحیه ریشه گیاه شود. تیمار نمونه های کشت بافتی با EMS در هر دو دوز مورد بررسی ریشه های جانبی که قبل از اعمال تیمار یا وجود نداشته یا بسیار کم بوده‌اند به سرعت تعداد این ریشه‌های جانبی افزایش پیدا نمود و باعث شد اثر دوزهای اعمال شده به خصوص۰/۰۱٪ دارای تاثیر معنی‌داری در سطح ۱٪ شود. در این پژوهش سعی شد تا با کاربرد غلظت های مختلف ماده موتاژن EMS بهترین غلظت بر روی تغییر صفت های مورفولوژیک گیاه نعناع فلفلی در شرایط درون شیشه ای و قسمت مزرعه‌ای پیدا شود. لذا برای شناخت، بهره برداری و فرآوری این گیاه دارویی مهم و ایجاد اشتغال برای تحقیق های بیش تر پیشنهاد می شود که از سایر غلظت ها و زمان‌های متفاوت برای اعمال تیمار ماده موتاژن EMS و بررسی خصوصیت های مورد اندازه گیری استفاده شود و هم چنین تحقیق های دیگری جهت ستفاده از سایر مواد موتاسیون‌زا (شیمیایی و فیزیکی) برروی گیاه نعناع فلفلی و بررسی اثرهای آن ها انجام شود.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که ما را در انجام پژوهش فوق یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را می نمائیم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

منابع

۱- امیدبیگی ر. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی، چاپ اول، جلد چهارم، چاپ اول، فصل نهم، ۱۳۸۹؛ ۴۲۳ صفحه.

۲- بقایی. م، و همکاران. دو فصلنامه ی علمی- پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران جلد ۱۸، شماره ی ۲، صفحه ی۱۳۸۹، ۱۹۸- ۱۸۱.

۳- پورشفیعی انارکی ف. تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه Nepeta persica Bioss و مقایسه متابولیت های شده در تولید کالوس با گیاه کامل پایان نامه دکترای عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۷۹؛ ۴۲ صفحه.

۴- زرگری ع .. گیاهان دارویی، پنج جلد، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۸-۱۳۸۰، ۴۷۲۰ صفحه.

۵- سهی. ن، احسانپور.ع ا. گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان. هفدهمین کنفرانس زیست شناسی ایران. ۱۳۹۱.

مجیدی م.م. ارزانی ا. . ۱۳۸۴بررسی القاء موتاسیون با اتیل متان سولفونات(EMS) دراسپرس(Onobrychis viciifolia). مجله علوم و صنایع کشاورزی۱۹.: ۱۶۷-۱۷۹.

6- Adam SKL, Wendel JF. Novl patterns of gene expression in polyploidy. Trends in Genetics (2005). 21(10)و 539-543.

7- Ahmadikhah A. Advanced Genetics. Publication of Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources. Gorgan, Iran (2008) . pp239-265. (In Farsi).

8- Aridogan BC, Mumcu E, Ozbasar D, Demiric M, Kaya S and Baydar H. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch* P*harm. Res* (2002). 25 (6), 860 - 4.

9- Bahraminejad S, Asenntorfer RE, Riley IT, Zwer P, Schultz CJ and Schmidt O. Genetic variation of flavonoid defense compound concentration in oat (*Aven*a *sativ*a L.) entries and testing of their biological activity. Australasian Plant Breeding Conference, Christchurch, New Zealand (2008).18 – 21, pp: 1127 - 32.

10- David Raja H, Arockiasamy DI. In vitro propagation of Mentha viridis L. From nodal and shoot tip explants. Plant Tissue Culture and Biotechnology (2008).1,1-6.

11- Ezzat SM. In vitro inhibition of *Candid*a a*lbicans* growth by plant extracts and essential oils. World Journal Microbiology and Biotechnol (2001). 757 - 9.

12- Foster S. Peppermint: *Mentha piperit*a. American Botanical Council-Botanical Series (1996). 36, 3 - 8.

13- Fujii T. Effect of EMS on germination of einkorn wheat. Infor mutation service (1968).67,30-33.

14- Ganzera M, Zhao J, Khan IA. *Hypericum perforatum* chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high-performance liquid chromatography method. Journal of Pharmaceutical Sciences. (2002). 91, 623–630.

15- Hase Y, Akita Y, Kitamura S, Narumi I, Tanaka A. Development of an efficient mutagenesis technique using ion beams: Toward more controlled mutation breeding. Plant Biotechnology (2012). 29, 193-200.

16- Hase Y, Okamura M, Takeshita D, Narumi I, Tanaka A. Efficient induction of flower-color mutants by ion beam irradiation in petunia seedlings treated with high sucrose concentration. Plant Biotechnology (2010). 27, 99-103.

17- Hoffmann BG and Lunder LT. Flavonoids from *Mentha pipertia* leaves. P*lant*a *Med* (1984).50 (4), 361.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

18- Ilirjana S, Ariana Y, Andon D. Induced mutations for improving production on bread and durum wheat. AIP Conference Proceedings (2007). 899, 747.

19- Iserin P. Encyclopedies des plants medicinal: identification, preparation, soins. Larousse/ VUEF (2001). 334 pp.

20- Jabeen N, Mirza B. Ethyl methane sulfonate (EMS) enhaces genetic variability in *Capsicum annum.* Asian Journal of Plant Sciences (2002). 1, 425-428.

21- Jia Y, Xie J, Rutger JN. Development and characterization of katy deletion mutatnt populations for functional genomice of host-parasite interaction and rice improvement (2006). 1(1), 43-47.

22- Jens R. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase micro extraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. J. Agric. Food Chem (1999). 47 (9), 3782 - 6.

23- Karamlou N. Study and standardization of essential oil of *Mentha piperita* cultivated in the different parts of Iran. Thesis, University of Tehran, Medical Science (1999). 38, 1–9.

24- Khademian R, Babaeian Jelodar N, Kianoosh Gh. Study of gamma radiation mutagenesis effects on some Iranian rice cultivars. Researches on Agricultural Sciences and Natural Resources of Khazar (2004). 2, 16-26. (In Farsi).

25- Liu BM, Wu YJ, JP Tong, Wu JD. A novel semidwarf mutant mutagenized with ion beam irradiation controlled by a dominant gene, SD-d(t). Rice Genetic Newsletter (2010). 25, 20-22.

26- Marzuk Z, Marzuk B, ehraief I and Boukef K. Analysis of Tunisian *Mentha pulegium* L. oils from Monastir. *SIPAM* (2006). 14, 682 – 725.

27- Mba C. Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. Agronomy (2013). 3, 200-231.

28- Mucciarelli M, Scannerini S, Bertea C and Maffei M. In vitro and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by non-mycorrhizal fungal colonization. New Phytologist (2003). 158 (3), 579 – 91.

29- McCaskill D and Croteau R. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. Planta (1995). 1432 - 2048.

30- Micke A. Mutation and in vitro mutation breeding. Bahar Samiullah Khan A, Kalani Publishers, Ludhiana,India(1999). pp 1-19.

31- Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd*-1: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. DNA Research (2002). 9,11-17.

32- Naderi Shahab MA, Mehrpor SH, Jebelly M, Jafari AA. Mutagenesis effects of EMS and UV-C irradiation doses on *Medicago sativa* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research (2007). 15, 183-195. (In Farsi).

33- Okamura M, Umemoto N, Onishi N. Breeding glittering carnations by an efficient mutagenesis system. Plant Biotechnology (2012). 29, 209-214.

34- Patil VP, Raut VM, Halvankar GB. Induced variation in soy bean variety Kalitur Bioigyanama (1985). 11,249-255.

35- Pavela R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]

*Fitoterapi*a (2005) . 76 (7 - 8), 691 - 6.

36- Patnaik A, Chaudhary D, Rao GJN. Genetic improvement of long grain aromatic rices through mutation approach. Plant Mutation (2006). 1, 7-10.

37- Peirce A. The American Pharmaceutical Association practical guide to natural medicines. New York: William Morrow and Company, Inc. 1999.). 313, 241–242.

38- Phulari, S. Polyploidy breeding in Urgenia indica - to study the effect of colchicines treatment on morphological character of Urgenia indica. Botany (2011). 1, 207- 210.

39- Rakshit S, Kanzaki H, Matsumura H, Rakshit A, Fujibe T, Okuyama Y, Yoshida K, Oli M, Shenton M, Utsushi H, Mitsuoka C, Abe A, Kiuchi Y, Terauchi R Use of TILLING for reverse and forward genetics of rice. In: Meksem K, Kahl G (eds). The Handbook of Plant Mutation Screening. Wiley-VCH. Germany (2010). pp 187-197.

40- Saremi H. Fusarium biology, ecology and taxonomy. Jahade Daneshghahi Press, Mashhad (2005). 15: 40 - 47.

41- Shu QY, Lagoda PJL. Mutation techniques for gene discovery and crop improvement. Molecular Plant Breeding (2007) 2, 193-195.

42- Tassou CC, Drosinos EH and Nychas GJE. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperit*a) on *Salmonell*a *enteritidis* and *Listeri*a *monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. Journal of Applied Microbiol (1995). 78 (6), 593 – 600.

43- Toshio I, Sugimoto Y, Masuda H and KameiC. Anti-allergic effect of flavonoid glycosides obtained from *Mentha pipertia* L. Biological and Pharmaceutical Bulletin *(*2002). 25 (2), 256.

44- Yadegariani D, Shakiba AM, Taghizadeh M,Rezaei MB, Gachkar L and Rassoli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperit*a L. and *Myrtuscommunis* L. essential oils. Phytochem (2006). 67, 1249 - 55.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.12.1]