إكثار نبات النعناع (*Mentha longifolia*) بتقانات زراعة الأنسجة وتقييم المردود الكمي من الزيت الطيار

د .ثريا أبوزيدان[1]*
(1) عضو هيئة بحثية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، ص.ب31902 .، سورية.
للمراسلة: د. ثريا أبو زيدان الايميل: zthuraia@gmail.com

الملخص :

تم في هذا البحث وضع تقنية للاكثار الخضري الدقيق لنوع النعناع *Mentha longifolia* والذي له خصائص طبية هامة حيث يستخدم كمضاد سرطان وكمضاد فطري وبكتيري ودرست تأثير الهرمونات في الاكثار و التجذير بهدف المحافظة على الصفات الوراثية بشكل مطابق للنبات الأم كما يهدف إلى الإكثار الخضري للسلالات والأصناف الناتجة عن برنامج التحسين الوراثي ,حيث زرعت الخزعات النباتية) بعد تعقيمها بالكلوروكس (2%) في الوسط Ms مضافا إليه 30غ/ل سكروز و 2مغ/ل من السيتوكينين بنزيل أمينو بيورين BAP بالإضافة إلى 0.2 مغ /ل من الاوكسين أندول بيوتريك أسيد IBA و أظهرت نتائج الزراعة الأولية أن نسبة التلوث منخفضة و نسبة العينات النامية كانت عالية في الزراعة الأولية و أن العينات أبدت استجابة جيدة للنمو ,أما في مرحلة الاكثار و الاستطالة تم الحصول على اعلى معدل للإكثار(2.6 نمو خضري) عند استخدام التركيز 3مغ/ل من BAP كما أعطى استطالة جيدة للنموات المتكونة و تفوق بذلك معنويا على الشاهد (1.83 نمو خضري)، أما بالنسبة لمرحلة التجذير تم الحصول على افضل متوسط لعدد الجذور 7.3 عند التركيز 2.5 مغ/ل من IBA وبفروق معنوية مقارنة مع الشاهد الذي حقق اقل قيمة لها (1.85)، بينما تم الحصول على افضل متوسط لاستطالة الجذور في الشاهد (1.81سم) وبفروق معنوية مع استخدام التركيز 2.5 مغ/ل IBA والذي حقق اقل قيمة لها (0.68 سم) وأيضا بلغت نسبة نجاح عملية التقسية 100% بعد شهر من نقل النباتات إلى الظروف الطبيعية.

تم تقطير الزيوت باستخدام جهاز التقطير بالبخار لاستخلاص الزيوت العطرية من أجزاء مختلفة من النبات و أظهرت نتائج هذه الدراسة أن أعلى مردود للزيت الطيار في نبات *Mentha longifolia* كان في الأزهار (1.35%) تلتها الأوراق(0.80%) ثم النبات الكامل (0.65%) .

الكلمات المفتاحية: نعناع– زراعة الانسجة–زيت طيار–بنزيل امينو بيورين–اندول بيوتريك أسيد.

In vitro Micropropagation of *Mentha longifolia* and the Quantitative Evaluation of essential oil yield.

Thuraya Abouzedan[(1)]
(1) National Commission for Biotechnology, P.O.Box. 31902 ,Syria.
corresponding author, email: zthuraia@gmail.com.

Abstract:

In this study, a protocol for micropropagation of *Mentha longifolia* was established. This species possesses important medicinal properties and is used as an anticancer, antifungal, and antibacterial agent. The effect of plant growth regulators on shoot multiplication and rooting was investigated with the aim of preserving genetic uniformity identical to the mother plant, as well as for the vegetative propagation of strains and cultivars resulting from breeding programs.

Explants, after surface sterilization with 2% Clorox, were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 30 g/L sucrose, 2 mg/L of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP), and 0.2 mg/L of the auxin indole-3-butyric acid (IBA). The initial culture results showed a low contamination rate and a high percentage of growing explants, with good growth response.

During the multiplication and elongation stage, the highest multiplication rate (2.6 shoots per explant) was obtained using 3 mg/L BAP, which also resulted in good shoot elongation and was significantly superior to the control (1.83 shoots). In the rooting stage, the best average number of roots (7.3) was achieved at a concentration of 2.5 mg/L IBA, with significant differences compared to the control, which recorded the lowest value (1.85). However, the greatest root length (1.81 cm) was observed in the control, with significant differences compared to 2.5 mg/L IBA, which resulted in the shortest roots (0.68 cm). The acclimatization success rate reached 100% one month after transferring the plants to natural conditions.

Essential oils were extracted by steam distillation from different plant parts. The results indicated that the highest essential oil yield in *Mentha longifolia* was obtained from flowers (1.35%), followed by leaves (0.80%), and then the whole plant (0.65%).

Keywords: Mint; tissue culture; essential oil; benzylaminopurine; indole-3-butyric acid..

أولا–المقدمة:

يُعد جنس النعناع (Mentha L.) من أهم الأجناس النباتية الطبية والعطرية التابعة للفصيلة الشفوية (Lamiaceae) [1] ويضم أكثر من 25 نوعًا منتشرة عالميًا وتتميز بخصائص دوائية وصناعية متعددة [2،3] ويعد النعناع (*Mentha longifolia* L.) من الأنواع واسعة الانتشار في منطقة حوض المتوسط والشرق الأوسط، حيث استُخدم منذ القدم في الطب الشعبي لعلاج نزلات البرد والسعال واضطرابات الجهاز الهضمي[4] تُعزى الأهمية الطبية لهذا النبات إلى غناه بالزيوت العطرية والمركبات الفعالة مثل الكارفون (Carvone) ، الإيزومينثون (Isomenthone)، والمنتول (Menthol) ، والتي أثبتت فعاليتها كمضادات ميكروبية وفطرية، إضافةً إلى دورها كمضادات أكسدة ومضادات أورام [5–6–7] و قد أوضحت دراسات حديثة أن زيت *Mentha longifolia* يتميز بتركيب كيميائي متنوع باختلاف الجزء النباتي المستخدم ومرحلة النمو، حيث سُجل أن مركب Carvone oxide شكّل النسبة الأعلى من الزيت في عينات سورية، تلاه الـ Isomenthone و Thymol [8] كما بيّنت بحوث أخرى أن مردود الزيت يتراوح بين 1.6%–0.7 تبعًا لمرحلة الحصاد وطريقة الاستخلاص[9–10].

كما تم ايجاد أن الليمونين و الكارفون هما المركبان الأساسيان في الزيت الأساسي للنعناع طويل الأوراق في النباتات الام، أما في النباتات المكاثرة بزراعة النسج مخبريا تم الحصول على كميات هائلة من البيبيريتونين (Piperitenone) و البيبيرتونين اوكسيد (75%) من الزيت الاساسي [11] ومع ذلك اظهرت النباتات المزروعة مخبريا نقصا في البوليجون و المنثوفوران و بالتالي الحفاظ على سمة مهمة و ذلك نظرا لسمية البوليجون و المنثوفوران المعروفة فان الكميات الهائلة منها قد تؤثر على سلامة استخدام زيت النعناع العطري و بالتالي يمكن اعتبار ان النباتات المكاثرة بالأنسجة النباتية للنعناع طويل الاوراق مصدرا امنا خال من المواد السامة في الاستخدامات الطبية و الغذائية.

أصبح الحفاظ على الموارد الوراثية للنباتات الطبية ضرورة إستراتيجية. نتيجة لتزايد الضغوط البيئية وتراجع التنوع الحيوي، وفي هذا المجال، تمثل تقنية زراعة الأنسجة النباتية إحدى أهم الأدوات الحيوية، إذ تتيح إنتاج نباتات مطابقة وراثيًا وخالية من الأمراض، وتوفر وسيلة لحفظ السلالات والأصناف عالية الجودة وإمداد برامج التحسين الوراثي بمواد نباتية ذات كفاءة عالية [12–13] كما تساهم هذه التقنية في تلبية الاحتياجات المتزايدة من النباتات الطبية دون التأثير على الموارد الطبيعية. وبالإضافة إلى دورها في الإكثار، يفتح التقدير الكمي للزيوت العطرية المستخلصة من أجزاء مختلفة من النبات المجال أمام تحديد الأعضاء النباتية الأكثر غنى بالمركبات الفعالة [14] وبالتالي توجيه استخدامها نحو التطبيقات الطبية والصيدلانية المثلى [15–16] ومن هنا يهدف هذا البحث إلى تطوير بروتوكول موثوق للإكثار الدقيق للنعناع طويل الأوراق باستخدام تقانة زراعة الأنسجة، وإلى تقدير المردود الكمي للزيوت العطرية في أجزائه المختلفة، بما يساهم في تعزيز القيمة المضافة لهذا النبات الطبي العريق.

ثانيا–مبررات البحث:

تنبع أهمية هذا البحث من الجمع بين تقانات الإكثار الدقيق بزراعة الأنسجة النباتية ودراسة المردود الكمي للزيوت العطرية في نبات النعناع طويل الأوراق (*Mentha longifolia*) ، وهو نبات طبي واسع الانتشار في سورية ويُعرف بخصائصه

الدوائية والغذائية والصناعية .إذ يُعد الحصول على بروتوكول إكثار خضري دقيق وسهل التطبيق خطوة أساسية للحفاظ على الموارد الوراثية للنبات، خاصةً في ظل التهديدات البيئية وتراجع التنوع الحيوي .كما أن نتائج التقدير الكمي للزيوت العطرية المستخلصة من أجزاء النبات المختلفة تتيح توجيه استخدام هذا النوع من النعناع نحو التطبيقات الطبية والصيدلانية الأكثر فاعلية . من هنا يسعى البحث في ربط التكنولوجيا الحيوية النباتية بالاستثمار الاقتصادي والتطبيقي، مما يعزز فرص إنتاج منتجات طبيعية آمنة وذات قيمة مضافة عالية.

ثالثا-أهداف البحث:

1. تطوير بروتوكول موثوق للإكثار الخضري الدقيق للنعناع طويل الأوراق باستخدام زراعة الأنسجة بهدف حفظ السلالات المحلية واستثمارها وراثيًا وطبيًا وصناعيًا.
2. دراسة تأثير تراكيز مختلفة من منظمات النمو BAP وIBA في مراحل الإكثار، الاستطالة، والتجذير، وتحديد التركيز الأمثل لكل مرحلة.
3. تقييم نجاح مرحلة التقسية وإمكانية نقل النباتات المكاثرة مخبريًا إلى الظروف الطبيعية بكفاءة عالية.
4. تقدير المردود الكمي للزيوت العطرية المستخلصة من الأزهار والأوراق والنبات الكامل، ومقارنة النتائج مع الدراسات السابقة لتحديد الجزء النباتي الأكثر غنى بالزيت.

رابعا- -مواد البحث وطرائقه:

-المادة النباتية:

تم جمع نبات *Mentha longifolia* من مناطق زراعية في بانياس خلال موسم الإزهار. وتم تحديد النوع بالعودة إلى الأخصائيين و المراجع المختصة [17-18-19].

مكان وموعد تنفيذ البحث:

تم تنفيذ هذا البحث في مخبر التنوع الحيوي و مخبر الصناعات الغذائية في الهيئة العامة للتقانات الحيوية خلال الاعوام من 2023-2024 للمخبرية وعام 2025 للحقلية كما تم أخذ الخزعات من نبات النعنع من حديقة الهيئة العامة للتقانة الحيوية وتم استخدام العينات للإكثار الخضري الدقيق والنقطير .

معاملات التجربة:

كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 12عينة نباتية جيدة النمو مأخوذة من العقل ,حيث سجلت معدل الإكثار و متوسط استطالة النموات ومتوسط عدد الأوراق بعد 30 يوم من الزراعة ,حيث ثم حساب متوسط تجربتين.

الصفات المدروسة ومعاملات التجربة :

تمت دراسة المردود الكمي للزيت العطري، وفي مرحلة الاكثار تم دراسة معدل الاكثار، متوسط استطالة النموات، متوسط عدد الاوراق بعد 30 يوم من الزراعة و كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 12عينة نباتية جيدة النمو مأخوذة من العقل حيث ثم حساب متوسط تجربتين. أما في مرحلة التجذير تم دراسة نسبة التجذير، متوسط استطالة الجذور، ومتوسط عددها بعد 30 يوم من الزراعة و كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 12 عينة نباتية حيث ثم حساب متوسط تجربتين.

كما تم دراسة نسبة نجاح عملية التقسية ومتوسط عدد واطوال الأفرع ومتوسط عدد الاوراق بعد 15 يوم وبعد شهرين وبعد 3 اشهر من عملية التقسية و كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 10 نباتات(اصص) حيث ثم حساب متوسط تجربتين.

استخلاص الزيت الطيار:

تم استخلاص الزيوت الطيارة من أوراق وأزهار والنبات الكامل لـ *Mentha longifolia* باستخدام جهاز التقطير المائي. أُخذت عينات وزنها 100 غ لكل عينة، وتم التقطير بواسطة جهاز كليفنجر (Clevenger) لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة 60°م لضمان استخراج كامل للزيوت العطرية. حُسبت النسبة المئوية للزيت العطري اعتمادًا على الوزن الجاف للمادة النباتية وفق المعادلة التالية:

نسبة الزيت العطري (%) = (وزن الزيت المستخلص / الوزن الجاف للعينة النباتية) × 100

بعد الاستخلاص، حُفظ الزيت العطري في عبوات زجاجية داكنة محكمة الإغلاق عند درجة حرارة 4°م إلى حين التحليل، وذلك للحفاظ على ثبات المركبات الطيارة ومنع تأكسدها.

أولاً، تم تحليل الزيت من النباتات الحقلية كشاهد، حيث أُخذت عينات الأوراق في شهر أيار، وأُخذت عينات الأزهار والنبات الكامل في شهر تموز في ذروة الإزهار لتحديد كمية الزيت العطري في النبات الطبيعي.

ثانياً، تم زراعة النباتات عبر تقنيات الأنسجة النباتية، وأُجريت عليها مرحلتان من الاستخلاص:

- **المرحلة الأولى** :النباتات المزروعة في طور التجذير داخل الأنابيب الزجاجية، وتم الاستخلاص بعد 30 يوماً من نقل النباتات إلى طور التجذير.
- **المرحلة الثانية** :بعد التقسية ونقل النباتات إلى الظروف الحقلية، أُخذت العينات بعد مرور موسم نمو كامل لمدة 3–4 أشهر، بحيث تم تقطير النبات في شهر تموز.

الأكثار الخضري الدقيق:

مرحلة الزراعية الأولية :

تهدف الزراعة الأولية للحصول على عينات خالية من التلوث ولها القدرة على النمو وفق الخطوات الاتية:

1- تحضير الأوساط المغذية :

أُستخدم الوسط الغذائي Murashige and Skoog (MS) مضافًا إليه 30 غ/ل سكروز و7 غ/ل أجار، وضُبط الرقم الهيدروجيني (pH) عند 5.8±0.1 قبل التعقيم بالأوتوكلاف عند 121°م لمدة 15 دقيقة. ويوضح الجدول (1) الأوساط المغذية المستخدمة في تجارب البحث المختلفة .

جدول (1): الأوساط المغذية المستخدمة في التجارب المنفذة .

مكونات الوسط المغذي	مرحلة الزراعة الأولية	مرحلة الاكثاروالاستطالة	مرحلة التجذير
المحلول المعدني	MS	MS	MS
السكروز	30غ/ل	30غ/ل	30غ/ل
ثيامين	1مل	1مل	1مل
الاغار	7غ/ل	7غ/ل	7غ/ل
اينوزيتول	100مغ/ل	100مغ/ل	100مغ/ل
شيلات الحديد	5مل	5مل	5مل
منظمات النمو			
BAP	2مغ/ل	(0-0.5-1-2-3 mg/L)	0 ملغ
IBA	0.2 مع/ل	0.1 مع /ل	(0-0.5-1-2-2.5mg/L)

2-تحضير العقل وتعقيمها :

تم استخدام عقل نباتية عقدية بطول 10سم اخذت من الجزء العلوي للنبات حاوية على براعم جانبية مأخوذة من نباتات أُم سليمة وخالية من الإصابات المرضية، لما تتمتع به من كفاءة عالية في الاستجابة النسيجية والإكثار الخضري. عُقِّمت الخزعات باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز 2% لمدة 10 دقائق، مع إضافة قطرة من المادة المرطبة Tween-20لتحسين كفاءة التعقيم، ثم غُسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم. بلغت نسبة التلوث في الزراعة الأولية أقل من 5%، وهي ضمن الحدود المقبولة في تجارب زراعة الأنسجة.

3-ظروف غرفة النمو

حُضِّنت العينات في غرفة نمو بدرجة حرارة 23±2°م، ورطوبة نسبية تراوحت بين 60-70%، مع نظام إضاءة 16 ساعة إضاءة / 8 ساعات ظلام باستخدام مصابيح فلورسنت بيضاء، وبشدة إضاءة تقدّر بنحو 2500 لوكس.

مرحلة الاكثار والاستطالة:

تمت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP (0-0.5-1-2-3) مغ/ل باستخدام المحلول المعدني الكامل ثم وضعت بغرفة النموعلى حرارة 22م و إضاءة 16ساعة يومياً.

مرحلة التجذير :

نقلت النموات الخضرية من وسط الإكثار إلى وسط التجذير باستخدام المحلول المعدني الكامل لموارشيج وسكوج (MS) حيث تمت دراسة تأثير تركيز الاوكسين المستخدم في وسط التجذير لنبات النعناع حيث تم استخدام هرمون اندول بيوتريك اسيد (IBA) كما هو موضح في الجدول (1) باستخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج (MS ().

مرحلة التقسية :

تم غسل جذور العينات المجذرة بالماء المقطر المعقم بهدف التخلص من الاجار العالق بها ,ثم نقعت في الماء المقطر المعقم مضاف له مبيد فطري (Qualikems)بتركيز 5مغ / ل ,تم بعد ذلك نقلها الى اصص بلاستيكية قطرها 8 سم (10 اصص لكل معاملة) تحوي بيتموس معقم في الاوتوكلاف على حرارة 121 مْ لمدة 15 مْ (الى مستوى ثلثي الاصيص .حيث تم إحداث حفرة صغيرة في منتصف الاصيص و إنزال جذوره النباتات بداخلها ثم إحاطة هذه الجذور بالتورب (بيتموس+ برلايت بنسبة 1:10) وتغطيتها بالاكياس وتركت تحت ظروف غرفة النمو (حرارة 22ْ م وإضاءة 16 ساعة) مدة 10 أيام مع تقديم الخدمات اللازمة من ري وتسميد، حيث تم سقاية النباتات مرة أسبوعياً بوسط ¼ MS مع معاملتها بالمبيد الفطري بمعدل مرة كل أسبوعين تم تثقيب الأكياس بعد عشرة أيام من التقسية وبالتدريج حتى أزيلت الأكياس نهائيا بعد 20 يوم من التقسية.

خامسا- التحليل الإحصائي وتصميم التجربة:

تم التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS .خضعت البيانات للتحليل الإحصائي باستخدام تحليل التباين (ANOVA)، وتمت مقارنة المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى دلالة 5% للنجارب الحقلية و1% للتجارب المخبرية.

سادسا- النتائج و المناقشة RESULTS AND DISCUSSION:

1- تقييم المردود الكمي للزيوت العطرية:

أظهرت نتائج هذه الدراسة الموضحة في الجدول(2) أن أعلى مردود للزيت العطري في نبات Mentha longifolia كان فيالأزهار(1.35%) ، مع وجود فروق معنوية مع الاوراق و النبات الكامل، تلتها الأوراق (0.80%)، والتي هي أقل من الأزهار ولكنها أعلى معنويًا من النبات الكامل (0.65%) ونباتات الأنسجة في المرحلة الأولى(0.53%) ، حيث لا يوجد فرق معنوي بين هذين الأخيرين. بعد التقسية ونقل نباتات الأنسجة للحقل، ارتفع مردود الزيت إلى 1.20%، مع عدم وجود فروق معنوية عن الأزهارو الاوراق، لكنه أعلى من الأوراق والنبات الكامل والنباتات في المرحلة الأولى. تتوافق هذه

القيم مع ما ذُكر في دراسات سابقة إلى أن مردود الزيت في الأنواع البرية من *M. longifolia* تراوح بين 0.7–1.4% باختلاف طريقة الاستخلاص ومرحلة الحصاد [10] ، كما بيّنت دراسات أخرى أن عوائد الزيت تختلف باختلاف الجزء النباتي المستخدم، حيث تراوحت بين 0.68% و1.6%، وكانت الأوراق غالبًا أغنى من السيقان [9].

الجدول2 : مردود الزيت العطري (%) في نبات *Mentha longifolia* حسب الجزء النباتي وطريقة الزراعة

الجزء النباتي / طريقة الزراعة	(%) مردود الزيت العطري
الأزهار (نبات حقلي)	1.35^{a}
الأوراق (نبات حقلي)	0.80^{b}
النبات الكامل (نبات حقلي)	0.65^{c}
نباتات الأنسجة (مرحلة أولى)	0.53^{c}
نباتات الأنسجة (بعد التقسية)	1.20^{ab}
LDS 1%	0.15

وفي دراسة أجراها Kofidis وآخرين (2019) حول نباتات جنس Mentha ، أُكد أن عوامل بيئية مثل المناخ ونوع التربة، إضافةً إلى الأساس المعتمد في الحساب (وزن رطب مقابل جاف)، تُعد من أهم المحددات لكمية الزيت [15].

وبالمقارنة مع دراسات أخرى، فإن القيمة التي سُجِّلت للأزهار (1.35%) تقع ضمن النطاق الذي أبلغت عنه عدة بحوث والتي كانت تتراوح بين 0.7–1.5%) [10—16] في حين أن مردود الأوراق (0.80%) أقل من بعض النتائج المنشورة التي وصلت إلى نحو 1.6% ، أما مردود النبات الكامل (0.65%) فيتوافق مع تقارير سابقة وضعت متوسط العائد الكلي بين0.5 –1 % [15] ويمكن تفسير هذه الفروق بعدة عوامل، منها الطراز الكيميائي (chemotype) للنبات، مرحلة الجمع، طريقة الاستخلاص ، والاختلافات [10—15].

كما توضح النتائج التي توصلنا اليها نحن في تجربتنا أن كمية الزيت العطري المستخلصة في النباتات المكاثرة بزراعة الأنسجة أقل من مردود النباتات المزروعة حقليا في المراحل الأولى من النمو (0.53 %) الا أنه بعد التقسية ونقل النباتات الى الظروف الحقلية اقترب المردود الكلي للزيت العطري من القيم المسجلة للنباتات الحقلية (1.2 %).

في زراعة الأنسجة، يتم إكثار *Mentha longifolia* باستخدام أوساط مغذية مثل Murashige and Skoog (MS) مع إضافة هرمونات نمو مثل 6–benzyladenine (BA) أو indole–3–acetic acid (IAA). في هذه الظروف، يكون مردود الزيت العطري أقل من النباتات الحقلية، حيث يعود السبب في انخفاض المردود إلى ظروف

المخبر، مثل الإضاءة المحدودة، الرطوبة العالية، وانخفاض تبادل الغازات، مما يقلل من تراكم المركبات الثانوية مثل المنثول، المنثون، والبوليجون، وهي المكونات الرئيسية في زيوت النوع المدروس [20] وعلى سبيل المثال، أظهرت دراسة أن النباتات المكاثرة باستخدام BA بتركيز 1.0–0.5 أنتجت زيوتًا بنسب 0.6%–0.4% ، وهي أقل من النباتات البرية في الظروف الحقلية، أما بعد عملية التقسية (acclimatization) ونقل النباتات إلى الحقل، وبعد مرور موسم نمو كامل) خاصة في مرحلة الإزهار بين تموز وآب ، يزداد إنتاج الزيت العطري ليقترب من النطاق 1.4%–0.7% ، وهو مشابه للنباتات المزروعة حقليا [21] ويعزى هذا الارتفاع إلى تأثير العوامل البيئية الطبيعية مثل الضوء ، درجات الحرارة المتغيرة، وخصائص التربة، التي تحفز التمثيل الضوئي وتراكم المركبات الثانوية [22] ، وفي دراسة أُجريت في إيران أكدت أن النباتات المكاثرة بالأنسجة أعطت بعد عملية التقسية مردودًا يتراوح بين 1.2%–0.9% ، بينما وصل مردود الزيت في النباتات البرية إلى 1.3%–1.0% في الأوراق خلال الإزهار [21] .

2- الإكثار الخضري الدقيق:

2-1 مرحلة الإكثار:

توضح النتائج في الجدول (3) ارتفاع في معدل الإكثار بزيادة تركيز السيتوكينين من 0.5 الى 3 مغ/ل من BAP كما يلاحظ من الجدول (2) أن استخدام السيتوكينين في وسط الإكثار أدى لزيادة معدل الإكثار بالمقارنة مع الشاهد دون سيتوكينين ،وهذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل [11] حيث تم الاستنتاج إن الأوساط التي تحتوي على تركيز عالي من هرمون BAP تظهر نتائج افضل كما وضح الباحثون ان هذا الهرمون هو الأفضل من بين السيتوكينينات لاعطاء أفضل النتائج [6].

حقق استخدام التركيز 3مغ/ل من BAP أعلى معدل إكثار (2.6) وبفروق معنوية مع الشاهد وباقي التراكيز الأخرى، وهذا يوافق ما تم الحصول عليه من قبل [11] الذي اشار إلى أن الوسط الذي يحوي 3 مغ/ل BAP +0.4 مغ/ل NAA+ 0.4 مغ/ل IAA قد حقق أفضل النتائج.

الجدول 3: تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP في معدل اكثار ومتوسط استطالة الافرع وعدد الأوراق للنعناع طويل الأوراق.

تراكيز الهرمونBAP	معدل الإكثار(نمو خضري)	متوسط استطالة النموات (سم)	متوسط عدد الأوراق
0	1.83 b	3.29^{bc}	8.54 d
0.5	2 b	3.64^{ab}	9.28 c
1	1.5 cd	3.06^{c}	6.83f
2	1.3 d	2.28^{cd}	19.65 a

3	2.6 a	1.63^{e}	10.94 b
LSD% 1	0.2012	0.5454	0.4587

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات المدروس

أما بالنسبة لمتوسط استطالة النموات تبين النتائج أن المعاملة بتركيز 0,5 مغ/ل حققت أفضل متوسط لطول النموات والتي بلغت (3.6 سم) دون وجود فروق معنوية مع الشاهد مما يدل أن التراكيز المنخفضة للسيتوكينين تشجع على الاستطالة أكثر من التراكيز العالية التي قد تعزز التفرع على حساب النمو الطولي [23–24–25] أما متوسط عدد الأوراق فقد كان الأعلى عند تركيز 2.0 مغ/ل (19.65 ورقة) و بفروق معنوية واضحة مع باقي التراكيز المستخدمة، ما يشير إلى أن هذا التركيز يوازن بين التفرع والاستطالة ويحفز تكوين أوراق. كما تشير النتائج أنه عند التركيز 1.0 مغ/ل BAP انخفض معدل الإكثار (1.5) ومتوسط عدد الأوراق(6.83) ، ويُعزى ذلك إلى اختلال التوازن بين منظمات النمو عند هذا التركيز .و هذه النتائج تتفق مع ما ذكره [23] في إكثار النعناع.

يرتبط تأثير BAP في تعزيز معدل الإكثار بقدرته على كسر السيادة القمية وتحفيز نمو البراعم الجانبية، وهو ما أشار إليه [25] ، BAP يعد من أكثر السيتوكينينات كفاءة في تنشيط التفرعات الجانبية .كما تعد الأوكسينات والسيتوكينينات من منظمات النمو الأكثر أهمية في زراعة الأنسجة النباتية، بشكل عام يحد السيتوكينين من السيادة القمية ويشجع نمو البراعم الجانبية مما يؤدي إلى زيادة التفرعات الجانبية المتكونة وذلك نتيجة وجود شق الأدنين الذي له دور هام في تحفيز نمو النبات وزيادة معدل الإكثار[26].

تركيز 0.5 مغ /لتر

تركيز 1مغ /ل

تركيز 2مغ /لتر

تركيز 3مغ/لتر

الشكل (1) معدل اكثار النبات باستخدام تراكيز مختلفة من الـ BAP

2-2 مرحلة التجذير :

أوضحت النتائجفي الجدول(4) أن جميع التراكيز حققت نسبة تجذير 100% ، لكن متوسط عدد الجذور اختلف معنوياً. حيث حقق التركيز 2.5 مغ/ل IBA أفضل معاملة بمتوسط (7.33) جذر/نبات مع وجود فروق معنوية مع باقي المعاملات الأخرى و بالمقابل كانت متوسط استطالة الجذور هي الأعلى في الشاهد (بمتوسط 1.81 سم) وبفروق معنوية مع بقي المعاملات الاخرى، بينما سجلت أقل استطالة (0.68 سم) عند التركيز 2.5 مغ/ل IBA وهذا يبين أن زيادة تركيز IBA يحفز تكوين عدد أكبر من الجذور لكنه يثبط استطالتها [12] كما وضحت النتائج ان اقل معاملة من حيث متوسط عددالجذور كانت في الشاهد (1.85جذر) بينما اقل معاملة من حيث متوسط الطول(0.68 سم) كانت عند2.5 مغ/ل من الهرمون وهذه النتائج تتوافق مع ما بينه [24] على نبات النعنع نوع *Mentha piperita* .

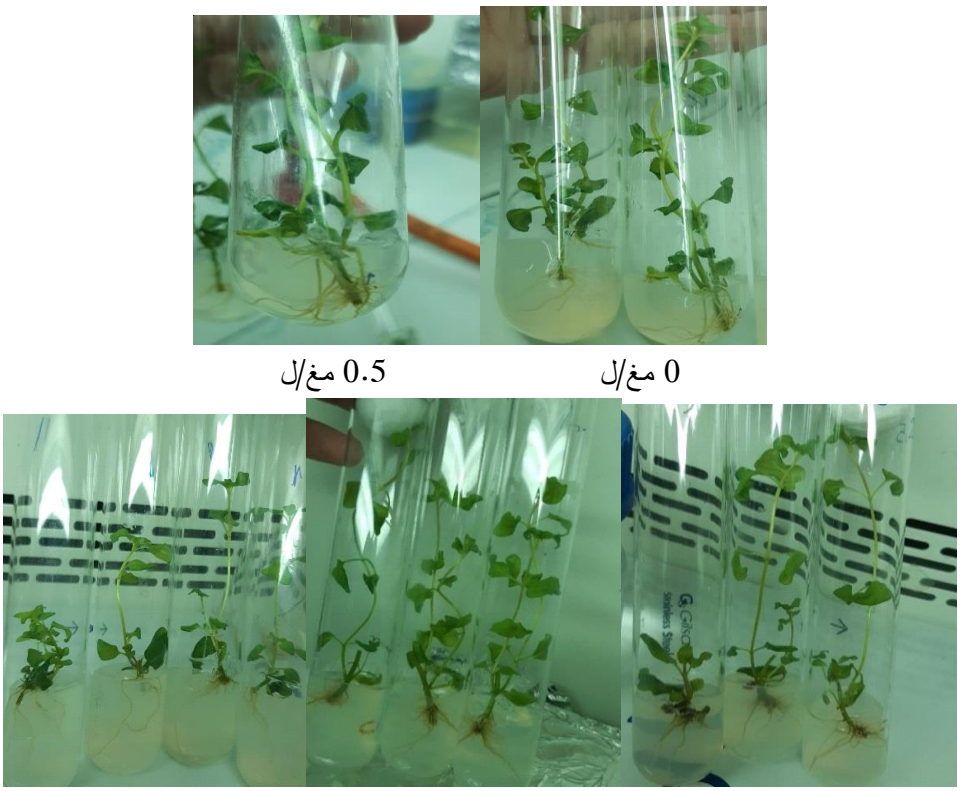
الجدول (4): تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الأوكسين في متوسط طول الجذور وعددها لنبات النعناع:

تركيز الاوكسنIBA مغ/ل	متوسط استطالة الجذور(سم)	متوسط عدد الجذور
0	1.81 a	1.85 e
0.5	1.12d	2.73d
1	1.31b	4.09c
2	1.28c	6.37b
2.5	0.68 e	7.33a
LSD1%	0.009	0.04

الاحرف المتشابهة ضمن العامود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات المدروسة.

توضح نتائج الابحاث ان هرمون IBA أفضل من NNA و IAA حيث حقق أفضل نسبة تجذير 100% ويفضل في هذه المرحلة الزراعة في وسط خالي من السيتوكينين لتثبيط تكوين أفرع جديدة والحد من نمو البراعم الجانبية

لتشجيع تكوين جذور جديدة، لأن استخدام التراكيز العالية من السيتوكينين يؤدي إلى إعاقة أو تأخير تشكل الجذور ونموها كما يعد مثبط للدفع الجذري (ولهذا السبب لا يضاف السيتوكينين عادة إلى وسط التجذير.



الشكل (2) معدل تجذير النبات باستخدام تراكيز مختلفة من الـ IBA.

2-3-التقسية:

أولا :دراسة تأثير الأوكسين في نسبة نجاح عملية التقسية ومتوسط عدد واطوال الأفرع بعد 15 يوم و بعد شهرين من عملية التقسية:

تشير نتائج الجدول (5) إلى أن جميع المعاملات بالأوكسين (IBA) حققت نسبة نجاح تقسية بلغت 100%، ما يدل على كفاءة البروتوكول المتبع في إعداد النباتات للنقل إلى الظروف الخارجية .ومع ذلك، فإن الأداء الفيزيولوجي من حيث عدد الأفرع وطولها وعدد الأوراق اختلف تبعاً لتركيز الأوكسين المستخدم في مرحلة التجذير.

حقق التركيز 2.0مغ/ل من IBA أفضل النتائج من حيث عدد الأفرع، طولها، وعدد الأوراق وذلك بعد 15 يوم وبعد شهرين من عملية التقسية، مما يشير إلى أن هذا التركيز يحفّز النشاط الخضري للنبات بشكل متوازن دون التسبب في نمو غير طبيعي .تعزز هذه النتائج ما ورد في بحث [12] حيث أشار الباحثون إلى أن التركيز المثالي للأوكسين يعزز من مقاومة النباتات للإجهادات مثل الجفاف والتغيرات البيئية المفاجئة، مما يساهم في نجاح عملية التقسية بشكل أفضل.

أما التراكيز الأعلى (2.5 مغ/ل) فقد حافظت على نسب نجاح عالية، لكنها أظهرت انخفاضًا طفيفًا في الأداء الخضري بالمقارنة مع تركيز 2.0 مغ/ل .ويعزى ذلك إلى أن التركيزات العالية من الأوكسينات قد تؤدي إلى اختلال التوازن الفسيولوجي داخل النبات، مسببة إما تشوهات أو نمواً غير متوازن [25].

تركيز الاوكسين	متوسط عدد الفروع بعد15 يوم	متوسط أطوال الأفرع بعد15 يوم	نسبة النمو%	متوسط عدد الافروع بعد شهرين	متوسط أطول الافروع بعد شهرين	متوسط عدد الأوراق بعد شهرين
0%	1.57 b	12.14 d	100 a	1.71 c	14.44 e	16.52 c
0.5%	1.25c	13c	100 b	1.65 c	16 d	14 d
1%	1e	7.37e	100 c	2.46 b	16.97 c	18.37 b
2%	2.11a	17.37a	100 a	3.24 a	19.40 a	22.71 a
2.5%	1.14 d	15.17 b	100 a	1.56 d	17.82 b	12.40 e
LSD 5%	0.008	0.009	0.008	0.05	0.04	0.006

الجدول 5: دراسة تأثير تركيز الأوكسين في نسبة نجاح عملية التقسية ومتوسط عدد واطوال الأفرع بعد 15 يوم وبعد شهرين عملية التقسية.

تركيز الاوكسين	متوسط عدد الافروع	متوسط أطول الافرع	متوسط عدد الأوراق
0%	2.82 b	11.33 c	20.11 d
1%	2 c	9.25 d	23.50 b
2%	3.96 a	13.01 b	22.22 c
2.5%	2 c	18 a	34.97 a
LSD 1%	0.05	0.006	0.05

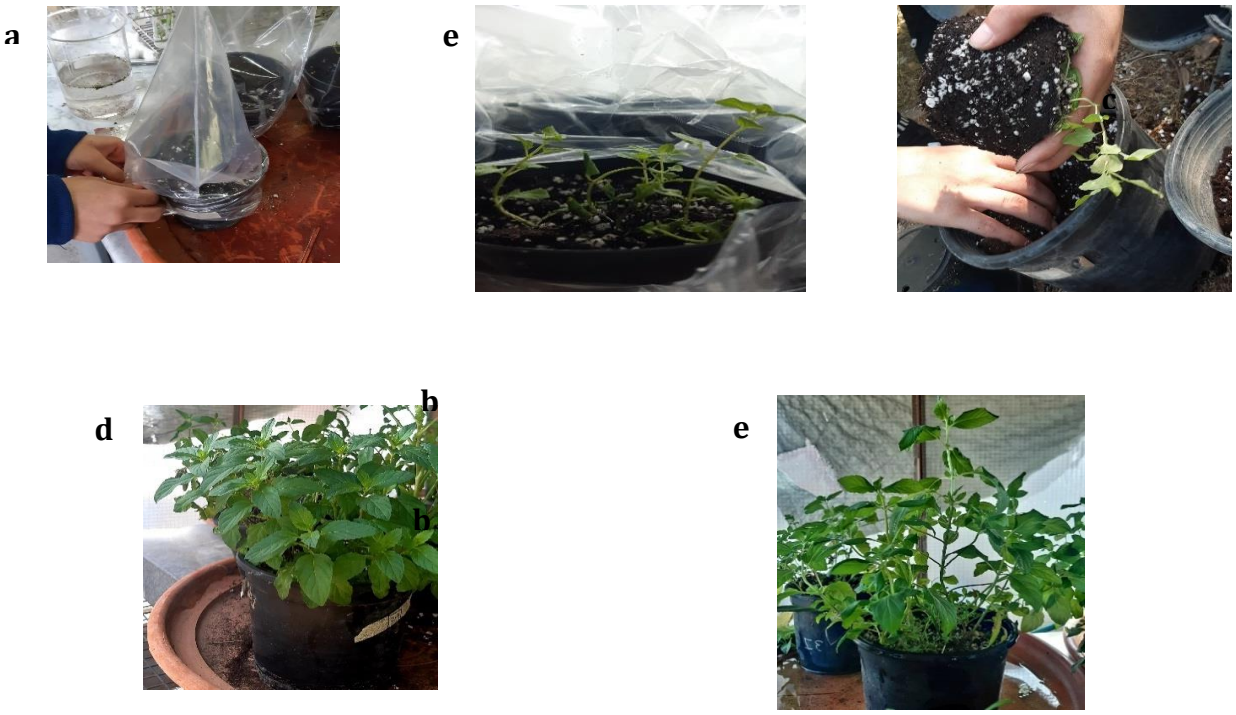
الجدول 6: دراسة تأثير تركيز الأوكسين في مؤشرات عملية التقسية بعد 3 أشهر من عملية التقس

علاوة على ذلك، فإن كفاءة التجذير في المراحل السابقة لعبت دورًا مباشرًا في نجاح التقسية، حيث أن التركيز المثالي للأوكسين في مرحلة التجذير أدى إلى تحسين تكوين الجذور، مما ساعد في تعزيز امتصاص الماء والعناصر الغذائية في مرحلة ما بعد الزراعة، كما أكد ذلك [27] .

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات المدروس

توضح النتائج في الجدول (6) أن أعلى قيمة لمتوسط عدد الافرع (3.96) تم الحصول عليها عند استخدام التركيز 2 مغ/ل IBA مع وجود فروق معنوية مع باقي التراكيز الاخرى بينما تحققت أعلى قيمة لمتوسط أطوال وعدد الأوراق (18 و 34.97 على التوالي) عند استخدام التركيز 2.5 مغ /ل ومع وجود فروق معنوية أيضا مع باقي التراكيز المدروسة وهذا يدل على أن استخدام تراكيز عالية من الاوكسينات تعزز تكوين الجذور مما يساعد النبات على التكيف بشكل أفضل مع بيئة النمو الجديدة [25] .

الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات المدروس



الشكل 3: مراحل عملية التقسية

(a: النباتات المنقولة لمرحلة التقسية وتغطيتها بالأكياس البلاستيكية B: بعد 15 يوم من عملية التقسية، C: تدوير النباتات الى اصص اكبر، d: بعد شهرين من عملية التقسية، e: بعد 3 أشهر من عملية التقسية)

سابعا–الاستنتاجات:

1. نجاح بروتوكول الإكثار الدقيق :أثبتت النتائج أن الوسط الغذائي MS المزود بـ 3 مغ/ل BAP هو الأنسب لتحفيز نمو البراعم الجانبية وزيادة معدل الإكثار في النعناع طويل الأوراق (*Mentha longifolia*)
2. كفاءة مرحلة التجذير : أظهر استخدام وسط MS الصلب مع تركيز 2.5 مغ/ل من IBA أفضل استجابة لتكوين الجذور من حيث العدد، على الرغم من قصر طول الجذور نسبيًا.
3. نجاح التقسية ونقل النباتات :بلغت نسبة نجاح التقسية 100% في جميع المعاملات، مما يؤكد أن النظام الجذري المتكون مخبريًا قادر على دعم النبات في الظروف الطبيعية.
4. رغم أن مردود الزيت العطري في النباتات المكاثرة مخبريًا كان أقل قليلًا من النباتات الحقلية في المراحل الأولى، إلا أن الفارق تقلّص بعد التقسية وموسم نمو كامل ليقترب من مستويات النباتات البرية.(0.7–1.4%)

ثامنا–التوصيات:

1. **الإكثار الخضري الدقيق** :يوصى بتطبيق بروتوكول زراعة الأنسجة لنبات *Mentha longifolia*باستخدام وسط MSمع 3 mg/L BAP و0.2mg/L IBA ، متبوعًا بالتجذير على 2.5 mg/L IBA لمدة 30 يومًا، ثم التقسية في الحقل لمدة موسم نمو كامل (~3–4 أشهر). يضمن هذا البروتوكول إنتاج نباتات مطابقة وراثيًا وغنية بالزيت الطيار، مع مردود يصل إلى ~1.2%.
2. **الاستخدام الأمثل للزيت العطري** :يُفضل حصاد الأوراق في أيار، والأزهار والنبات الكامل في تموز للوصول إلى أعلى مردود من الزيت مع الحفاظ على المركبات الفعالة.
3. **التطبيقات الصناعية والطبية** :يمكن استغلال النباتات المكاثرة لإنتاج مواد أولية طبيعية آمنة تدخل في الصناعات الدوائية والغذائية والتجميلية، بما يضمن الاستفادة الاقتصادية والتقنية.
4. **البحث المستقبلي** :يُوصى بإجراء تحاليل GC–MS للمركبات العطرية بعد التقسية لمتابعة غنى الزيت وخلوه من المركبات السامة، وتطبيق البروتوكول على أصناف وسلالات مختلفة للتحقق من ثبات النتائج.
5. **حفظ الموارد الوراثية** :يمثل البروتوكول وسيلة فعالة لحفظ السلالات المحلية وضمان إمداد مستدام للمواد النباتية دون التأثير على التنوع الحيوي الطبيعي.

المراجع

[1] خلوف، عزة. (2021). مقرر النباتات الطبية والعطرية (الجزء النظري). **كلية الهندسة الزراعية، جامعة حمص**.

[2] Post, G.E. (1933). Flora of Syria, Palestine and Sinai (2nd ed.). **American Press**, Beirut.

[3] Mouterde, P. (1983). Nouvelle flore du Liban et de la Syrie, Tome 3**. Dar El-Machreq, Beyrouth.**

[4] Sabagh AE, Mbarki S, Hossain A, Iqbal MA, Islam MS, Raza A, et al. Potential role of plant growth regulators in administering crucial processes against abiotic stresses. **Front Agron**. 2021;3:648694.

[5] Mimica-Dukic, N., Bozin, M., Sokovic, M., Mihajlovic, B., & Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three Mentha species essential oils**. Planta Medica**, 69(5), 413–419.

[6] Niksic, H. (2012). Antioxidant activity of essential oil and methanol extract from Mentha longifolia. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, 77(2), 101–106.

[7] Patti F, Palmioli A, Vitalini S, Bertazza L, Redaelli M, Zorzan M, *et al*. Anticancer Effects of Wild Mountain *Mentha longifolia* Extract in Adrenocortical Tumor Cell Models. **Front Pharmacol.** 2020;10:1647.

[8] Haddad, D., Babojian, G., & Saker, H. (2021). Study of morphological characteristics of Mentha longifolia L. and identification of essential oil components. **Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies**, 43(4), 205–221.

[9] Singh, S., Bisht, M., Kashyap, P., Chauhan, A., Tandon, S., Padlia, R., & Verma, R. (2020). Essential oil composition of wild mint (Mentha longifolia L.) harvested at different stages of plant growth. **Journal of Medicinal and Aromatic Plants Sciences**, 42, 1–8.

[10] Yeşil, M. & Özcan, M.M. (2021). Effects of harvest stage and diurnal variability on yield and essential oil content in **Mentha* × *piperita* L.**Plant, Soil and Environment**, 67(7):417–423.

[11] Bertoli A, Leonardi M, Krzyzanowska J, Oleszek W, Pistelli L. Mentha longifolia in vitro cultures as safe source of flavouring ingredients. **Acta Biochim Pol**. 2011;58(4):581-7. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22175048.

[12] Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., & Geneve, R.L. (2002). **Plant Propagation: Principles and Practices (7th ed.).** Prentice Hall, New Jersey.

[13] George, E.F., Hall, M.A., & de Klerk, G.J. (2008). **Plant Propagation by Tissue Culture** (3rd ed.). Springer.

[14] خلوف، عزة، حياص، بشار، وزكي نقولا، ميشيل. (2023). النباتات الطبية والعطرية (الجزء النظري). **كلية الهندسة الزراعية، جامعة حمص**.

[15] Kofidis, G., Bosabalidis, A.M., & Kokkini, S. (2019). Plants of genus Mentha: from farm to food factory. **Plants**, 8(11), 430.

[16] Singh, P., & Pandey, A.K. (2018). Carvone: a bioactive monoterpene with antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Biological Active Products from Nature**, 8(1), 1–11.

[17] Davis, P.H. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. **Edinburgh University Press.**

[18] Jafri, S.M.H., & El-Gadi, A. (1985). Flora of Libya. **Al-Faateh University, Tripoli**.

[19] Boulos, L. (2002). Flora of Egypt (Vol. 3). Al-Hadara Publishing.

[20] Soilhi, Z., Rhimi, A., Heuskin, S., Mekki, M., & Fauconnier, M.-L. (2019). Essential oil chemical diversity of Tunisian Mentha spp. collection**. Industrial Crops and Products**, 131, 330–340.

[21] Saeidi, Z., Ghorbani, A., & Tavakoli, S. (2016). Effect of environmental factors on essential oil content and composition of Mentha longifolia. **Natural Product Research**, 30(5), 561–565.

[22] Karray-Bouraoui, N., Rabhi, M., Neffati, M., & Abdelly, C. (2009). Essential oil composition of Mentha longifolia L. from different geographical regions**. Journal of Essential Oil Research,** 21(3), 193–197.

[23] Khan, S., Shende, S., & Bonde, D. (2021). In vitro micropropagation of mint (Mentha spp.). **World Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Sciences**, 10(2), 1688–1692.

[24] Sunandakumari, C., Kottackal, M., & Sini, S. (2003). Rapid axillary bud proliferation and ex vitro rooting of Mentha piperita. **Indian Journal of Biotechnology**, 3, 108–112.

[25] Taiz, L., & Zeiger, E. (2010**). Plant Physiology** (5th ed.). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

[26]المعري، خليل. 2018. زراعة الأنسجة النباتية وتقاناتها. **منشورات جامعة دمشق، سوريا**

[27] -Anand, S.P. and Jeyachandran, R. (2004). *In vitro* multiple shoot regeneration from nodal explants of *Zehneria scabra*. **Plant Tissue Culture**, 14(2): 101–106.