

INVESTIGATIONS MORPHOGENETIQUES ET BIOCHIMIQUES EN CULTURES *IN VITRO* ET SUR DES REGENERANTS DE *MENTHA VIRIDIS* L.♦

Diana E. Maftel^{1*}, Gogu Ghiorghiță¹, Elvira Gille², Daniela Nicuță¹

¹*Université de Bacău, Département de Biologie, Rue Calea Mărășești 157,
Bacău, Roumanie*

²*Centre du Recherche « Stejarul », Alexandru cel Bun 6, Piatra Neamț,
Roumanie*

Corresponding author: diana.maftel@ub.ro

Received: 04/03/2006

Accepted after revision: 20/04/2006

Abstract: *In vitro* cultures were initiated using plants of *Mentha viridis* L. originating from Greece. The shoots tips were sterilised with chloramine-T (5% solution) for 25 minutes. The initiation medium was Murashige-Skoog (1962) (MS) enriched with various combinations of cytokinins and auxins. The main morphogenetic reaction of the inoculated explants (shoot tips and nodes) was neoplantlet regeneration.

Shoot and root formation was inhibited only on medium formula comprising 2,4-D, that provided a cream-green friable callus, deprived of organogenetic capacity. MS medium with benzylaminopurine (BAP) and giberellic acid (GA) stimulated multiple shooting and (seldom) root formation. *In vitro* regenerants were transferred to septic medium and subsequently to experimental fields during 2004 and 2005.

The regenerants (first and second year of vegetation) were submitted to biochemical tests in 2005. The best output for polyphenols and flavons was

♦ Paper presented at the 4th edition of “Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée – COFrRoCA 2006”, June 28 – July 02, Clermont-Ferrand, France

registered for the ethanolic extractions (both warm and cold, 70% ethanol). The quantities of this biologically active principles are similar to those of control plants. There are higher amounts of flavons and lower amounts of polyphenols compared to control. TLC qualitative analysis for triterpenes and phytosterols (in warm ethanolic extractions) evinced the presence of β -sitosterole and of ursolic acid.

The amount of volatile oils in control plants reaches 0.7% and was exceeded in case of vitroclones (3.33% for the first year regenerants and 4.00% in case of the second year regenerants). *In vitro* regenerants displayed a narrower range of volatile oil compounds. The amount of carvone was much higher (59.11 – 59.16%) compared to control (34.46%). The quantity of 2-cyclohexene-1-one is much lower in regenerants (0 – 1.65%) than in control plants (25.10%).

Keywords: *Mentha viridis* L., *in vitro*, flavons, polyphenols, volatile oils

INTRODUCTION

Mentha viridis L. est une espèce de valeur pour les propriétés de ses huiles volatiles: carminatives, antiseptiques, analgésiques, antiémétiques, antispastiques, antiprurigineuses, antithermiques, fortifiantes, diurétiques [1, 2]. Nous avons initié des cultures *in vitro* de *Mentha viridis* L. pour élaborer une technologie qui assure un rendement meilleur de multiplication végétative et, en même temps, un taux élevé en composés biologiquement actifs aux régénérants.

MATERIEL ET METHODES

Nous avons initié des cultures *in vitro* de *Mentha viridis* L. en utilisant comme matériel biologique des plantes en provenant de Chalkidiki (Grèce). Les bouts de rejets des plantes cultivées en laboratoire ont été prélevés et stérilisés avec chloramine-T (5%) pour 25 minutes. Nous avons inoculé les explantes dans plusieurs variantes nutritives de milieu essentiel MS (Murashige-Skoog, 1962) enrichi avec des régulateurs de croissance (des diverses mélanges et taux). La croissance et le développement des plantes en culture *in vitro* ont été réalisée en conditions de lumière et de température contrôlées.

Quelques régénérants en étant dans leur première et respectivement dans leurs deuxièmes années de végétation ont été acclimatés aux conditions septiques et puis soumises aux analyses phytochimiques. Le matériel biologique séché naturellement a été utilisé pour les extractions avec des solvants de polarités différentes (40, 50 et 70%): des extraits éthanoliques au chaud et au froid (des teintures) pour 8 jours.

On a déterminé la quantité des polyphénols et des flavones des extraits éthanoliques obtenu par les plantes *in vitro* et aussi par les plantes témoins.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince a mis en évidence la présence des triterpènes et des phytostéroles tant dans les extraits éthanoliques au chaud qu'en ceux au froid.

Nous avons utilisé comme étalons pour les flavones: le quercetol, la rutoside, la luteoline et l'apigénine; pour les polyphénols: l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide férulique.

Nous avons effectué des analyses phytochimiques quantitatives et qualitatives des huiles volatiles pour le matériel végétal obtenu *in vitro*. Les huiles volatiles ont été obtenus par distillation - la méthode Neo Clevenger (Frio, 1999).

L'analyse qualitative des huiles volatiles a été réalisée par gas-chromatographie (GC-MS).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

La réaction morphogénétique principale des explantes (des noeuds et des bouts des rejets) a été la production des plantules. Nous avons utilisé le milieu nutritif Murashige-Skoog enrichi aux diverses cytokinines et auxines et des mélanges entre eux. Le milieu supplémenté avec benzyle-amine-purine (BAP) et acide gibbérellique (GA_3) a favorisé la formation des rejets multiples. La rhizogenèse adventive au niveau des noeuds supérieurs des tiges a été évincée sur beaucoup de variantes de milieu nutritif.

Les fragments des autre types d'explantes (entre-noeuds et des racines) ont généré un cal friable de couleur crème et de vitesse de prolifération moyenne, sans capacité organogénétique sur le milieu MS enrichi avec 2,4-D ou avec 2,4-D et BAP, (tableau 1, figures 1 - 4).



Figure 1. L'aspect des rejets sur le milieu de culture B_{05}



Figure 2. La réaction morphogénétique sur le milieu BA_1

Tableau 1. La réaction morphogénétique des explantes de *Mentha viridis* en culture *in vitro*

No.	Explante	Milieu nutritif	Réaction morphogénétique
1	Noeuds et bouts de rejets	A	Plantes (++) avec 1 rejet basal, des racines longues et minces (+++), des ramifications secondaires courtes, des feuilles ondulées
2	- " -	B	Plantes avec 1-3 rejets basaux, des racines fortes (+++) et parfois ramifiées; des racines adventives au niveau des noeuds supérieurs de la tige, sporadiquement (+)
3	- " -	BA	Plantes vigoureuses (+++), avec des feuilles plus épaisses et turgescents, entre-noeuds plus gros, des racines fasciculées et courtes (+++), des rejets multiples (+) et des racines adventives (+)
4	- " -	BB	Plantes (++) moins développées (++) , avec 1-4 rejets à la base, parfois des rejets multiples (+), des racines bien développées , longues et fasciculées (+++)
5	- " -	BG	Des rejets multiples (+++)
6	- " -	BN	Plantes vigoureuses (+++) avec 1-4 rejets à la base, des racines longues et fasciculées (+++)
7	- " -	D	Cal (++) friable, crème, autour du noeud; le développement des rejets complètement inhibé
8	- " -	IB	Plantes (+++) avec 1-4 rejets à la base, des racines longues et fasciculées (+++), des feuilles réduites et minces
9	- " -	KN	Plantes (+++) avec 1-4 rejets basaux (des différentes dimensions), des racines longues et plus épaisses (+++); des racines adventives sporadiquement (+)
10	- " -	MS	Vitroplantes (+++) avec 1-2 rejets basaux, des feuilles plus grandes, racines (++) moins nombreuses (++) et longues, avec des ramifications secondaires; des racines adventives au niveau des noeuds et des entre-noeuds sporadiquement
11	- " -	N	Vitroplantes (+++) avec 1-2 rejets basaux, des feuilles réduites, des racines nombreuses (+++), longues, fasciculées; parfois des racines adventives au niveau des noeuds supérieurs
12	Entre-noeuds	BD	Formation du cal (+), friable, crème, spécialement aux extrémités des fragments, qui a dégénéré en temps
13	- " -	D	Cal (++) , friable (mou), de couleur crème, prolifération meilleure que dans le milieu BD, sans capacité organogénétique
14	Racines	BD	Cal (+) de dimensions réduites, friable, crème; la prolifération moins intense qu'au cas du cal d'entre-noeuds
15	- " -	D	Cal (++) friable (mou), couleur crème

L'intensité de réaction : + réaction faible; ++ bonne réaction; +++ très bonne réaction

Les régénérants obtenus *in vitro* ont été passés au milieu septique et acclimatés facilement.

Nous avons effectué des analyses biochimiques sur les régénérants en étant dans leur première et les deuxièmes années de végétation en 2005. Nous avons constaté que le meilleur rendement d'extraction des flavones et des polyphénols a été obtenu en

utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol (70%), tant au chaud qu'au froid pour les plantes *in vitro* et aussi pour les plantes témoins, (tableau 2).

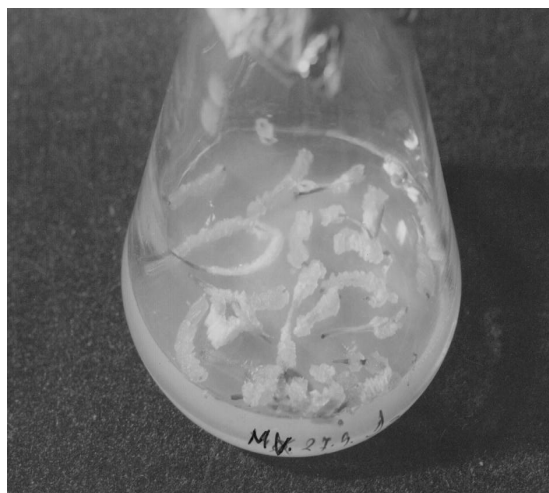


Figure 3. Cal friable d'entre-nœuds (le milieu D₂)

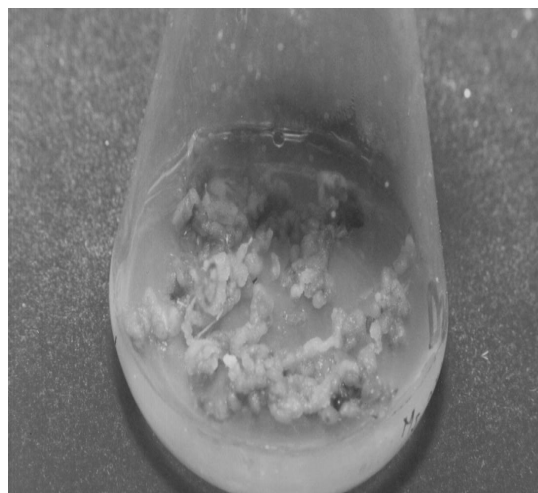


Figure 4. Formation du cal friable crème provenant des racines (milieu D₂)

Tableau 2. Contenu en polyphénols et flavones des extraits de *Mentha viridis* L.

No.	Echantillon	Concentration éthanolique	Flavones (rutoside g % s.s.*)	Polyphénols (acide caféique g % s.s.*)
Contenu en polyphénols et flavones des extraits au chaud de <i>Mentha viridis</i> L.				
1	<i>Mentha viridis</i> L.	40%	1,685	0,885
2	(plantes témoins)	50%	1,942	1,225
3		70%	2,599	1,874
4	<i>Mentha viridis</i> L.	40%	1,887	1,300
5	(cultures <i>in vitro</i>)	50%	2,261	1,452
6		70%	2,621	1,648
Contenu en polyphénols et flavones des extraits au froid (teintures) de <i>Mentha viridis</i> L.				
7	<i>Mentha viridis</i> L.	40%	2,007	1,116
8	(plantes témoins)	50%	2,039	1,351
9		70%	2,385	2,149
10	<i>Mentha viridis</i> L.	40%	2,090	1,218
11	(cultures <i>in vitro</i>)	50%	2,730	1,510
12		70%	3,058	1,561

S.S. = substance sèche

Le taux des polyphénols et des flavones en teintures a été 2 fois plus élevé par rapport au matériel biologique soumis à l'extraction au chaud (tableau 2). Pour les deux types des extraits, les valeurs les plus élevées tant pour les flavones que pour les polyphénols ont été enregistré aux plantes régénérées *in vitro*.

Les chromatographies sur couches minces (CCM) pour les triterpènes et pour les phytostérols on mis en évidence la présence du β -sitostérol et d'acide ursolique seulement dans les extraits éthanoliques au chaud (70%).

La quantité d'huile volatile pour les plantes témoins est de 0,7% mL et elle s'avère au cas des vitroclones : 3,33% mL pour les régénérants *in vitro* de la première année et 4,00% mL pour les régénérants de la deuxième année.

Concernant la composition en fractions volatiles, nous avons identifié (seulement aux régénérants de la première année) le menthol (2,56%), la menthone (2,62%) et l'isomenthone (7,19). Par contre, ces composés ont été absents dans les régénérants de la deuxième année et dans les plantes témoins.

Nous avons identifié des autres types des fractions volatiliques comme suit : la carvone, l'acétate de dihydrocarville, le β -pinène, le β -bourbonène etc.

Les régénérants *in vitro* présentent un spectre plus étroit pour les composés d'huile volatile [3, 4]. De plus, ils possèdent une quantité plus élevée de carvone (59,11 – 59,16%) par rapport aux plantes témoins (34,46%). Par contre, le taux de la 2-cyclohexène-1-one est beaucoup plus bas (0 – 1,65 %) par comparaison aux plantes témoins (25,10%).

CONCLUSIONS

1. La réaction morphogénétique principale des explantes de *Mentha viridis* L. a été la production des rejets sur la plus part des milieux nutritifs utilisés.
2. La caulogenèse et la rhizogenèse ont été inhibées seulement dans le milieu qui contient 2,4-D. En échange, sur le même milieu, une cal friable (mou) de couleur crème verte, sans capacité organogénétique, a été produit.
3. Nous avons effectué des analyses biochimiques sur les régénérants en étant dans la première et respectivement dans la deuxième année de végétation en 2005.
4. Nous avons constaté que le meilleur rendement d'extraction des flavones et des polyphénols a été obtenu en utilisant comme solvant d'extraction l'éthanol (la concentration 70%), tant au chaud qu'au froid.
5. Le taux des composés biologiquement actifs est proche de cet observé aux plantes témoins. Les vitroclones ont un contenu plus élevé en flavones et moins élevé en polyphénols.
5. La quantité d'huile volatile est nettement supérieure aux régénérants *in vitro* par rapport aux plantes témoins.
6. Les régénérants *in vitro* présentent un spectre plus étroit pour les composés d'huile volatile.

REFERENCES

1. Ciulei, I., Grigorescu, E., Stănescu, U.: *Plante medicinale. Fitochimie si fitoterapie*, Ed. Medicala, București, **1993**, vol. 2, 122-123;
2. Istudor, V.: *Farmacognozie, fitochimie, fitoterapie*, Ed. Medicala, București, **2001**, vol. 2, 108;
3. Paun, E., Mihalea, A., Dumitrescu, A., Verzea, M., Cosocariu, O.: *Tratat de plante medicinale si aromatice cultivate*, Ed. Acad. RSR, București, **1988**, 85;
4. Stănescu, U., Miron A., Hăncianu, M., Aprotosoia, C.: *Bazele farmaceutice, farmacologice si clinice ale fitoterapiei*, **2002**, vol.1, 15.