مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۱، صفحه ۱۶۲-۱۵۲ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2023.358409.3157
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.1.11.6

بهینه‌سازی کشت بافت گیاه دارویی در معرض خطر انقراض *Centella asiatica* (L.) Urban

فرشته حیدرقلی‌نژاد[۱*]، یوسف حمیداوغلی[۲]، ولی‌الله قاسمی‌عمران[۳] و پوریا بی‌پروا[۴]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترای اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: f.heidargholinezhad2021@gmail.com

۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، ساری، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

چکیده

آب‌بشقابی (*Centella asiatica* (L.) Urban) گیاه دارویی از خانواده چتریان به‌عنوان گونه‌ای در معرض انقراض در ایران شناخته شده است. این گیاه دارای خواص درمانی متعدد از جمله بهبود حافظه، ضد سرطان و درمان بیماری‌های پوستی است و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد. کشت سلول و بافت گیاهی ابزاری مهم در مطالعات پایه و دارای کاربردهای تجاری است. با روش کشت بافت می‌توان در مورد اصلاح گیاهان دارویی و یا تغییر در میزان متابولیت‌های ثانویه اقدام نمود. با توجه به ارزش بالای آب‌بشقابی می‌توان از کشت درون‌شیشه‌ای برای تولید بیشتر این گیاه بهره برد. بهینه‌سازی فرآیند کشت بافت برای انجام تحقیقات کاربردی و مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی انواع متابولیت‌های ثانویه مفید است. تحقیق حاضر با هدف دستیابی به یک پروتوکل مناسب برای تکثیر درون‌شیشه‌ای و تعیین غلظت‌های مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد برای ریزازدیادی این گونه ارزشمند انجام شد. اثر متقابل BAP (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) بر شاخه‌زایی از ریزنمونه گره در محیط کشت MS بررسی شد. سپس، ریشه‌زایی ریزنمونه‌های تکثیریافته با استفاده از IBA و NAA ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که MS دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و MS دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌ترتیب مناسب‌ترین محیط‌های کشت جهت شاخه‌زایی و ریشه‌زایی بودند.

واژه‌های کلیدی: آب‌بشقابی (*Centella asiatica* (L.) Urban)، اکسین، کشت بافت، سیتوکینین، ریزازدیادی.

مقدمه

آب‌بشقابی با نام علمی *Centella asiatica* (L.) Urban ازجمله گیاهانی است که با توجه به وجود ترکیب‌های ارزشمند دارویی، پراکنش خاص و محدود بسیار حائز اهمیت است. با توجه به منابع موجود آب‌بشقابی تنها در استان گیلان رشد کرده و تاکنون برای آن پراکنشی فراتر از محدوده تالاب انزلی گزارش نشده است (Taghizadeh *et al.*, 2004؛ Jalili & Jamzad, 1999). ترکیب‌های گیاه شامل فلاونوئیدها (کوئرستین، کامپفرول)، گلیکوزیدهای مختلف، ترپنوئیدها (آسیاتیکوزید، سنتللوزید، مادکاسوزید، براهموزید،

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

براهمینوزید)، مادکاسسول، مادکاسسیک اسید، آسیاتیک اسید، سنتویک اسید، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، فیتواسترول و تانن است (Jalili & Jamzad, 1999؛ Gruenwald *et al.*, 2000). آسیاتیک اسید، مادکازیک اسید و سایر مشتقات گلیکوزیدهای تری‌ترپنی، آسیاتیکوزید و مادکاسوزید از ترکیب‌های اصلی آن است که دارای خواص دارویی هستند (Sweetman, 2002). از این گیاه برای درمان آسم، برونشیت، مشکلات کلیه، بیماری‌های پوستی و در بهبود حافظه، افزایش قدرت یادگیری، ضد سرطان و کاهنده فشارخون استفاده می‌شود (Rakotondralambo *et al.*, 2013؛ Gupta *et al.*, 2014؛ Prasad *et al.*, 2014).

در شرایط طبیعی تولید گیاهان دارویی در تمام طول سال مقدور نیست و محدودیت‌هایی در تولید آن وجود دارد، استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای به عنوان ابزاری قوی برای مطالعات کاربردی و تجاری شناخته می‌شود (Akbas *et al.*, 2009). با روش کشت درون‌شیشه‌ای می‌توان در مورد اصلاح گیاهان دارویی یا تغییر در میزان متابولیت‌های ثانویه اقدام کرد (Nourafcan *et al.*, 2014). کشت سلول و بافت گیاه ابزاری مهم در مطالعات پایه و دارای کاربردهای تجاری است، زیرا به کمک آن می‌توان به سرعت تعداد زیادی از واریته‌های جدید گیاهی را در فضای آزمایشگاهی محدود و کنترل شده تولید نمود، یا برای تولید گیاهان مادری عاری از بیماری از آن بهره جست. ازدیاد در شرایط درون‌شیشه‌ای دارای قابلیت بالقوه در تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا است که این مهم، می‌تواند از طریق روش‌های مختلف ریزازدیادی بدست آید.

با توجه به ترکیب‌های با ارزش دارویی در گیاه آب‌بشقابی، بهینه‌سازی کشت درون‌شیشه‌ای، افزایش ترکیب‌های دارویی و اصلاح صفات آن باید مورد توجه قرار گیرد. ریزازدیادی در گونه‌های متنوعی از گیاهان دارویی ازجمله آب‌بشقابی نتایج مطلوبی داشته است (Sivakumar *et al.*, 2006؛ Tiwari *et al.*, 2000؛ Nath & Buragohain, 2005). با توجه به اینکه آب‌بشقابی جزء گیاهان در معرض انقراض در ایران طبقه‌بندی شده است، کشت درون‌شیشه‌ای آن به منظور حفظ این گونه ارزشمند امری ضروریست (Jalili & Jamzad, 1999). باززایی و ایجاد ساقه‌های جدید به‌طور معمول به تیمار همزمان اکسین و سیتوکینین نیاز دارد و این دو تنظیم‌کننده رشد از مهمترین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان هستند. توازن بین اکسین و سیتوکینین تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را موجب می‌شود. گرچه میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (Bhaskaran & Smith., 1990). اندام‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای علاوه بر استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به این تغییرات در طول کشت وابسته است (Akbas *et al.*, 2009). ریزنمونه گره به دلیل سادگی به عنوان یکی از روش‌های ترجیحی و بهترین ریزنمونه به منظور باززایی مستقیم برای تکثیر تجاری گیاهان شناخته شده است (Malcolm *et al.*, 2003).

در مطالعه‌ای برای پرآوری آب‌بشقابی، از ریزنمونه نوک رونده همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) استفاده شد و به‌طور میانگین ۱۰ شاخه از هر ریزنمونه تولید گردید. شاخه‌ها در محیط MS با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA ریشه‌دار شدند و گیاهان باززایی شده با موفقیت با محیط بیرون سازگار گردیدند (Das *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای در باززایی آب‌بشقابی، از کالوس همراه با BAP و KIN ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط MS بعد از گذشت ۶ هفته شاخه‌های متعددی تشکیل شد. برای ریشه‌زایی شاخه‌ها از محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده شد (Bangaru *et al.*, 2010). در بررسی باززایی آب‌بشقابی از کالوس، بالاترین تعداد شاخه در محیط MS همراه با ۵/۳۷ میکرومولار NAA و ۴/۴۲ میکرومولار BA با ۱۰ شاخه در هر کالوس بدست آمد. بالاترین تعداد ریشه نیز مربوط به محیط دارای ۵/۳۷ و ۱۰/۷۴ میکرومولار NAA با میانگین ۲۰ ریشه در هر ریزنمونه بود (Bibi *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای برای تکثیر

گیاه آب‌بشقابی از ریزنمونه گره همراه با غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده رشد BAP و KIN ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر استفاده گردید. بالاترین درصد القاء شاخه (۹۰٪) در محیط دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر KIN با میانگین ۱۶ شاخه بود. همچنین، محیط دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با NAA بالاترین القاء ریشه را طی ۴ هفته داشت و ۱۶ ریشه در هر شاخه تولید شد (Singh *et al.*, 2014).

Ghadirisardrood و همکاران (۲۰۱۹) برای اولین بار ریزازدیادی این گیاه را از طریق ریزنمونه گره در ایران بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و 2ip همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تیمار برتر در شاخه‌زایی بوده است و بهترین نتایج در ریشه‌زایی در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست آمد. Habibisilabi و همکاران (۲۰۲۰) تولید شاخساره از کالوس‌های آب‌بشقابی را ارزیابی کردند. نتایج آنان نشان داد محیط کشت MS در ترکیب ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین تیمار بود. همچنین محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بالاترین میزان ریشه‌زایی را نشان داد. بهینه‌سازی فرایند تولید گیاه آب‌بشقابی با استفاده از روش‌های مختلف مانند باززایی مستقیم و غیرمستقیم می‌تواند برای انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی ازجمله دست‌ورزی‌های ژنتیکی مانند تراریختی، تغییر سطوح پلوئیدی و مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مهم در آب‌بشقابی مفید باشد.

با توجه به مواد مؤثره ارزشمند در آب‌بشقابی با روش کشت درون‌شیشه‌ای، می‌توان با رفع محدودیت‌های زمانی و مکانی، این مواد را در شرایط آزمایشگاهی تولید کرد و حتی میزان متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد. با توجه به پژوهش‌های محدودی که در ایران روی این گیاه دارویی ارزشمند و در معرض انقراض انجام شده است، هدف از انجام این پژوهش دستیابی به یک دستورالعمل مناسب برای تکثیر و ریشه‌زایی این گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

گیاه آب‌بشقابی از گلخانه آموزشی دانشگاه گیلان تهیه شد. از بافت گره به‌دلیل توانایی بالا در تکثیر برای ریزازدیادی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای استفاده شد. در ابتدا قطعات گره از گیاه گلدانی جمع‌آوری شد و به مدت نیم ساعت در زیر آب جاری قرار گرفت. سپس برای گندزدایی نهایی، نمونه‌ها در زیر دستگاه هودلامینار به اندازه ۱ سانتی‌متر جدا شدند و به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ قرار گرفتند. در نهایت ریزنمونه‌ها سه مرتبه با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار آبکشی شدند.

در این پژوهش از محیط کشت MS برای ریزازدیادی استفاده شد. با توجه به حجم مورد نیاز در هر مرحله آزمایش از نسبت‌های مناسب محلول‌های عناصر ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها برای تهیه محیط کشت استفاده شد. ساکارز در غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن و غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد نیز به محیط کشت اضافه شد و pH آن روی ۵/۸ تنظیم گردید. در صورت اسیدی بودن محیط از NaOH یک نرمال و در صورت بازی بودن از HCl ۰/۱ نرمال استفاده شد و در نهایت ۸ گرم آگار به آن اضافه شد. سپس برای استریل کردن محیط کشت، از دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱/۵ بار و مدت زمان ۲۵ دقیقه استفاده شد. ریزنمونه‌های دارای گره در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف BAP (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با IBA در غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زیر نور سفید فلورسنت با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۶ هفته نمونه‌ها ارزیابی و درصد شاخه‌زایی، میانگین تعداد شاخه‌های مستقیم و میانگین طول شاخه‌ها محاسبه شد.

در مرحله بعد برای انجام ریشه‌زایی، شاخه‌های باززایی شده به قطعات کوچک‌تر تقسیم و در محیط القای ریشه شامل محیط MS دارای غلظت‌های مختلف از دو تنظیم‌کننده رشد IBA و NAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) کشت شدند. پس از یک ماه درصد ریشه‌زایی، میانگین تعداد ریشه و میانگین طول ریشه ارزیابی شد. کلیه آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل چهار ریزنمونه بود. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثرهای متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد بر تکثیر از ریزنمونه گره در کشت درون‌شیشه‌ای نشان داد که BAP و IBA از کارآمدی و اثرگذاری مطلوبی بر شاخه‌زایی و صفات مطالعه شده در ریزنمونه گره برخوردارند (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) حکایت از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ میان غلظت‌های مختلف BAP و IBA و اثر آن بر ریزازدیادی آب‌بشقابی دارد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرمتقابل BAP و IBA بالاترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰٪) را در غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA نشان داد (شکل ۱– a). عامل اختلاف در درصد شاخه‌زایی، میانگین تعداد شاخه‌های مستقیم، میانگین طول شاخه‌ها، غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد بکار رفته بود. در صفات بررسی شده استفاده ترکیبی از BAP و IBA بهترین نتیجه را داشت. ترکیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با میانگین ۹/۸۱ شاخه و ۶/۱۵ سانتی‌متر طول، مناسب‌ترین محیط در تکثیر و شاخه‌زایی از ریزنمونه گره بود (شکل۱– b و C). در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد ریزنمونه‌ها واکنشی نداشته و تکثیر گیاه انجام نشد. در محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد BAP و دارای IBA ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر شاخه‌زایی انجام شد اما تعداد و طول شاخه‌ها نسبت به زمانی که از هر دو تنظیم‌کننده رشد استفاده شد کمتر بود. هر چند استفاده همزمان از BAP و IBA سبب افزایش درصد شاخه‌زایی، تعداد و طول شاخه‌ها گردید. بهترین محیط تکثیر، محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بود.

جدول ۱– تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گره در گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica*)

Table 1. ANOVA of plant growth regulators effects on *in vitro* proliferation of nodal explants in *Centella asiatica*

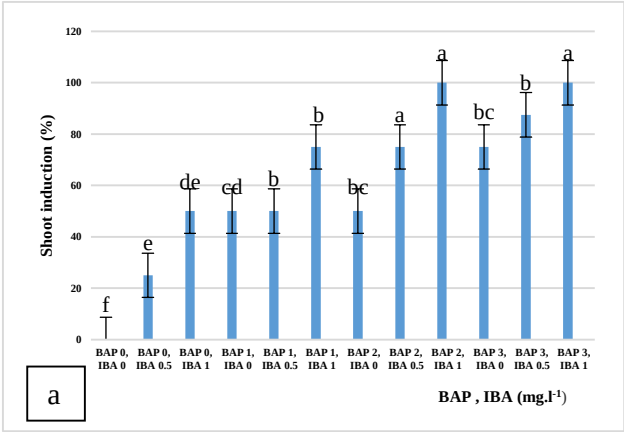
S.O.V.	d.f.	Mean square		
		Shoot induction	Number of shoots	Shoot length
BAP (A)	3	9114.58**	81.52**	29.79**
NAA (B)	2	4335.937**	28.68**	10.01**
A×B	6	377.604**	3.449**	1.98**
Experimental error	36	104.166	0.179	0.058
C.V. (%)		15.78	9.26	5.84

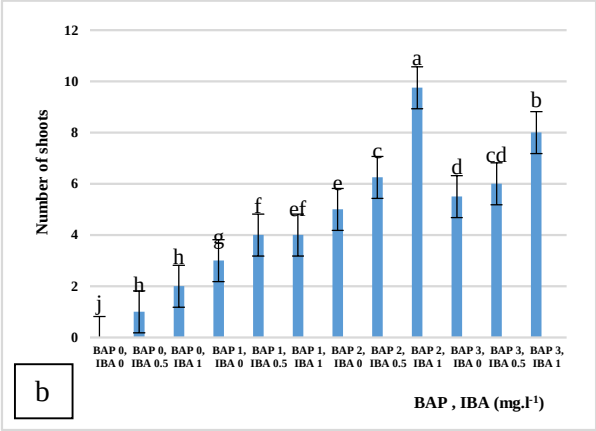
**: significant at 1% probability level.

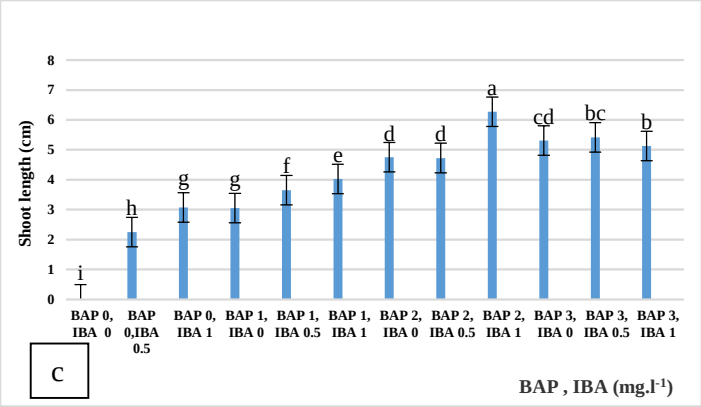
ریشه‌زایی

در این پژوهش اثر دو نوع تنظیم‌کننده رشد از گروه اکسین IBA و NAA بر روی ریشه‌زایی شاخه‌های تشکیل شده در شرایط درون‌شیشه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد اثرهای تنظیم‌کننده‌های رشد بر همه صفات مورد مطالعه در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲). در تمامی محیط کشت‌هایی که از اکسین استفاده شد ریشه‌زایی رخ داد، اما در مقایسه بین دو نوع اکسین بکاررفته، IBA تنظیم‌کننده رشد مؤثرتری در ریشه‌زایی بود و استفاده از آن در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین درصد، تعداد و طول ریشه را

داشت (جدول ۳). استفاده از IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب با میانگین ریشه‌زایی ۱۰۰٪، تعداد ریشه ۲۲/۵ و طول ریشه ۱۰/۶۲ سانتی‌متر نقش مؤثرتری در القاء ریشه‌زایی و صفات بررسی شده نشان داد (شکل ۳- a). براساس نتایج بدست آمده در میان غلظت‌های مختلف از دو نوع اکسین بکاررفته، IBA برتری نسبت به NAA داشت و در حضور اکسین در محیط کشت، ریشه‌زایی در تمامی تیمارها دیده شد. در محیط فاقد اکسین ریشه‌زایی مشاهده نشد (شکل ۳- b).







b

شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر شاخه‌زایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گره در گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica*)؛ درصد شاخه‌زایی (**a**)، تعداد شاخه (**b**) و طول شاخه (**C**)

Figure 1. Means comparison of plant growth regulators effects on *in vitro* proliferation of nodal explants in *Centella asiatica*; a) Shoot induction, b) Number of shoots, and C) Shoot length

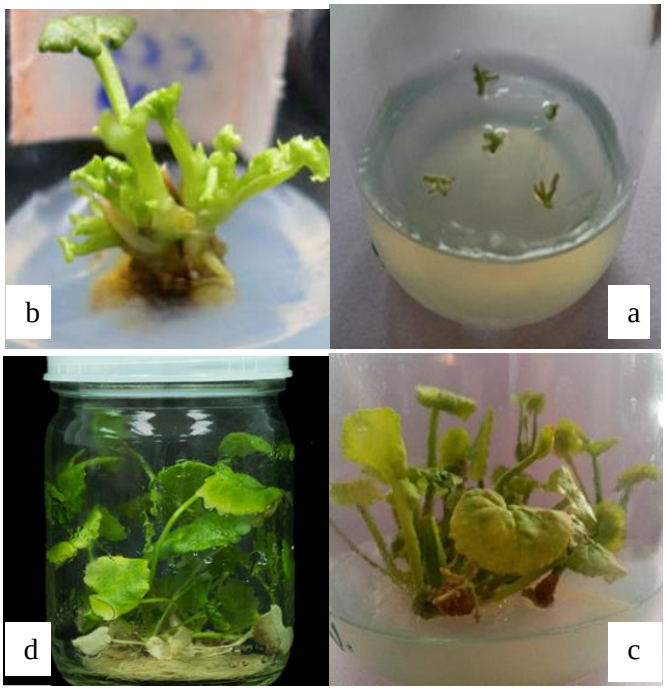
Non-similar letters indicate significant difference at 1% probability level (LSD test).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای ***Centella asiatica***

Table 2. ANOVA of plant growth regulators effects on *in vitro* rooting in *Centella asiatica*

S.O.V.	d.f.	Mean square		
		Root induction	Number of roots	Root length
Auxin (A)	7	6696.42**	317.60**	74.89**
Experimental error	24	65.10	1.94	0.30
C.V. (%)		15.18	11.13	8.66

**: significant at 1% probability level.



شکل ۲- شاخه زایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گره در گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica*)؛ a) زمان کشت، b) دو هفته پس از کشت، C) شش هفته پس از کشت در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و d) گیاه کامل حاصل از تکثیر درون‌شیشه‌ای

Figure 2. *In vitro* proliferation of nodal explants in *Centella asiatica*; a) culture time, b) two weeks after culture, c) six weeks after culture in MS medium with 2 mg.l^{-1} BAP + 1 mg.l^{-1} IBA, and d) *in vitro* propagated whole plant

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای *Centella asiatica*

Table 3. Means comparison of plant growth regulators effects on *in vitro* rooting in *Centella asiatica*

Auxin	Concentration (mg.l^{-1})	Root induction (%)	Number of roots	Root length (cm)
IBA	0	0e	0e	0e
	0.5	62.5c	18bc	8.9bc
	1	100a	22.5a	10.62a
	2	100a	19.25b	9.47b
NAA	0	0e	0e	0e
	0.5	25d	7d	4.37d
	1	56.25c	16c	8.22c
	2	81.25b	17.5bc	9.08b

Non-similar letters indicate significant difference at the 1% probability level (LSD test).

بحث

در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر ریزازدیادی گیاه دارویی آب‌بشقابی در شرایط کشت درون‌شیشه بررسی شد. نتایج نقش مؤثر دو تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین و اکسین را در تکثیر و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گره در آب‌بشقابی نشان داد. البته بین اثر غلظت‌های مختلف این تنظیم‌کننده‌های رشد، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشته و مناسب‌ترین محیط در تکثیر ریزنمونه گره محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بوده است که با نتایج گزارش Shashikala و همکاران (۲۰۰۵) که از ترکیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده کردند مطابقت داشت.

شکل ۳– a: ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای آب‌بشقابی (*Centella asiatica*) در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و b: عدم تشکیل ریشه در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

Figure 3. a: Rooting of *in vitro* propagated *Centella asiatica* shoots in MS medium with 1 mg.l^{-1} IBA and b: Not rooting in medium without plant growth regulators

استفاده همزمان از BAP و IBA در غلظت‌های مناسب نقش مؤثری در افزایش طول و تعداد شاخه‌های تولید شده نشان داد. مطالعات انجام شده درباره اثرهای تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی بر ریزازدیادی حکایت از تأثیر بیشتر و بهتر BAP در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه داشت که تأکیدی بر نتایج بدست آمده است (Gandi & Giri, 2013). نکته مهم در استفاده از سیتوکینین غلظت بکاررفته آن است که می‌تواند نتایج متفاوتی نشان دهد و مطابق نتایج این تحقیق غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر آن توصیه می‌شود. افزایش غلظت آن به ۳ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش تعداد و طول شاخه گردید. سیتوکینین باعث تقسیم‌سلولی، حفظ پروتئین‌ها و کلروفیل می‌شود، درنتیجه با کاربرد بهینه تنظیم‌کننده رشد BAP می‌توان گیاهچه‌هایی با کیفیت بالا بدست آورد، اما افزایش غلظت BAP از افزایش تعداد و رشد طولی شاخساره‌ها جلوگیری کرد. همچنین در محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد BAP و دارای IBA شاخه‌زایی انجام شد اما تعداد و طول شاخه‌ها نسبت به زمانی که از هر دو تنظیم‌کننده رشد استفاده شد کمتر بود. ریزنمونه گره منبعی از هورمون‌هاست و در حضور تنظیم‌کننده رشد اکسین (اکسین خارجی) شاخساره تولید شد، به نظر می‌رسد سیتوکینین موجود در ریزنمونه در مجاورت اکسین خارجی سبب تولید شاخساره گردید. به‌طور کل سیتوکینین نقش ضروری در تقسیم سلولی دارد و در القای شاخه‌زایی مستقیم و غیرمستقیم بسیار مؤثر است (Decendit *et al.*, 1992). استفاده از سیستم تکثیر تک مرحله‌ای از طریق ریزنمونه گره و نیز اجتناب از غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد به ویژه سیتوکینین در بافت‌های جوان که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند تداخلی با

هورمون‌های داخلی گیاه نداشته و توانست با حفظ تعادل هورمونی مسیر تکثیر و تکامل را به‌خوبی طی کند. بنابراین می‌توان گفت غلظت بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده بیشترین تأثیرگذاری را بر چگونگی عملکرد و واکنش هورمون‌های درونی دارد.

باززایی و ایجاد ساقه‌چه به‌طور معمول به تیمار همزمان اکسین و سیتوکینین نیاز دارد. مطالعات انجام شده توسط Siddiqui و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که بهترین القاء شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه گره بدست آمده اما در این مطالعه با افزایش BAP و IBA به‌ترتیب در غلظت‌های ۲ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر در مدت زمانی کوتاه تکثیر و تشکیل نوشاخه‌ها در مقدار قابل‌قبولی دیده شد. همچنین اشاره شد که برای ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف اکسین‌های IBA و NAA استفاده کردند که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از IBA نقش مؤثری در القاء ریشه با نسبت ۹۵٪ داشته است اما در این گزارش غلظت‌های بالاتر از تنظیم‌کننده رشد IBA (۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) بالاترین میزان ریشه‌زایی را داشت. Ghadirisardrood و همکاران (۲۰۱۹) نیز در ریزازدیادی از ریزنمونه گره در آب‌بشقابی به نقش مؤثر BAP در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر برای استقرار اولیه ریزنمونه‌ها اشاره کردند که بعد از حدود یک ماه در تیمارهای مختلف شاخه‌زایی قرار گرفتند و بهترین محیط ترکیبی از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و 2ip همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. در حالی که در این گزارش با ترکیبی از یک نوع سیتوکینین BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر شاخه‌زایی و تکثیر طی مدت ۴ هفته انجام شد. همچنین Habibisilabi و همکاران (۲۰۲۰) استفاده ترکیبی از BAP و NAA را در ریزافزایی از کالوس‌های آب‌بشقابی مؤثر دانسته اما در این گزارش BAP همراه با نوع دیگری از اکسین IBA نقش مؤثری در ریزازدیادی از ریزنمونه گره داشت.

در زمینه تأثیرات اکسین بر ریشه‌زایی گیاهان مختلف تحقیقات زیادی انجام شده است. در مطالعات ریشه‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای معمولاً از تنظیم‌کننده‌های رشد گروه اکسین استفاده می‌شود. بیشترین اکسین مورد استفاده در ریشه‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای IBA و NAA است که باعث تقسیم سلولی، طویل شدن و رشد سلولی شده و تشکیل ریشه‌ها را تحریک می‌کند (Jiang *et al.*, 2015؛ Zhang *et al.*, 2010). اکسین تنظیم‌کننده رشد ضروری برای ریشه‌زایی در بیشتر گیاهان کشت بافتی است که نوع و غلظت‌های مختلف از این تنظیم‌کننده رشد می‌تواند اثرهای متفاوتی بر میزان ریشه‌دهی، تعداد و طول آن داشته باشد. در این پژوهش هر دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و NAA در ریشه‌زایی مؤثر بوده که IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین درصد، طول و تعداد ریشه را داشت. با استفاده از IBA ۱ میلی‌گرم بر لیتر افزایش قابل‌توجهی در کیفیت و درصد ریشه‌زایی دیده شد و با نتایج Joshi و همکاران (۲۰۱۳) که بر نقش مؤثر IBA در ریشه‌زایی ریزنمونه‌های باززایی شده آب‌بشقابی اشاره داشتند هم‌راستا می‌باشد. همچنین Kumar (۲۰۱۷) نیز اشاره داشت که محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مناسب‌ترین محیط در القاء و توسعه ریشه‌ها در آب‌بشقابی بود که با نتایج این گزارش کاملاً مطابقت دارد.

به‌طور کل اثر مثبت اکسین بر ریشه‌زایی احتمالاً به این دلیل است که اکسین حمل کربوهیدرات‌ها و سایر مواد مغذی را برعهده داشته و به‌دنبال آن با تحریک تقسیم و طویل‌شدن سلول‌ها سبب تولید و تحریک تراکم ریشه‌زایی می‌شود (Zhang *et al.*, 2010). برای تکثیر و پرآوری مناسب، افزایش تعداد و طول شاخه که در نهایت منجر به تولید گیاهچه مقاوم می‌گردد استفاده از BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA توانست محیط کشت مناسبی در تکثیر ریزنمونه گره باشد که این می‌تواند به‌دلیل تقسیم سلولی مناسب در این ترکیب هورمونی باشد که سبب جذب آب، مواد کربوهیدراتی و معدنی به مقدار لازم شده است. در نتیجه گیاهچه‌های

حاصل، کیفیت و شکل ظاهری بهتری را داشتند. در ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولیدی IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بهترین نتیجه را در ریشه‌زایی داشت. این پژوهش گام کوچکی در راه تولید و تکثیر این گیاه ارزشمند و در معرض انقراض در شرایط آزمایشگاهی و سیستم کشت بافت است.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، می‌توان با استفاده از مناسب‌ترین تیمارهای تعیین شده در تکثیر درون‌شیشه‌ای، از آنها برای ادامه تحقیقات در رابطه با کشت بافت گیاه آب‌بشقابی ازجمله دستیابی به ترکیب‌های مختلف موجود در اسانس برگ‌ها و گیاه کامل و نیز تنوع سوماکلونال حاصل از کشت بافت برای گزینش گیاهان با عملکرد بالای مواد مؤثره مورد استفاده قرار داد.

References

- Akbas, F., Isikalan, C. and Namli, S., 2009. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Biochemical Biotechnology, 158: 470-475.
- Bangaru, T., Rao, S., Mani, N., Jagan, Y. and Pola, S., 2010. Conservation of an endagered medicinal plant *Centella asiatica* through plant tissue culture. Drug Invention Today, 2(1): 17-21.
- Bhaskaran, S. and Smith, R.H., 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Science, 30(6): 1329-1336.
- Bibi, Y., Zia, M., Nisa, S., Habib, D., Waheed, A. and Chaudhary, M., 2012. Regeneration of *Centella asiatica* plants from non-embryogenic cell lines and evaluation of antibacterial and antifungal properties of regenerated calli and plants. Journal of Biological Engineering, 5: 13.
- Das, R., Hasan, M.F., Hossain, M.S. and Rahman, M., 2008. Micropropagation of *Centella asiatica* L. an important medicinal herb. Progressive Agriculture, 19(2): 51-56.
- Decendit, A.D., Liu, L., Ouelhazi, P., Doireau, J., Merillon, M. and Rideau, M., 1992. Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures-the factors affecting the cytokinin response. Plant Cell, 11: 400-403.
- Gandi, S. and Giri, A., 2013. Production and quantification of Asiatic acid from *in vitro* raised shoots and callus cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban. Annals of Phytomedicine, 2(1): 95-101.
- Ghadirisardrood, S., Saadatmand, S., Assareh, M.H. and Nejad satari, T., 2019. Micropropagation of *Centella asiatica* L. (A medicinal plant). Journal of Plant Research, 32(1): 143-150.
- Gruenwald, J., Brendler, A. and Jaenicke, C., 2000. PDR for Herbal Medicine. Medical Economics Company, Montvale New Jersey, 858p.
- Gupta, A., Verma, S., Kushwaha, P., Srivastava, S. and Aks, R., 2014. Quantitative estimation of asiatic acid, asiaticoside & madecassoside in two accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban for morpho-chemotypic variation. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 48(3): 75-79.
- Habibisilabi, M., Hamidoghli, Y. and Sahraroo, A., 2020. Micropropagation of Gotu kola (*Centella asiatica* L.) via runner tip culture. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 21(3): 309-318.
- Jalili, A. and Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, 748p.
- Jiang, C.H., Liu, Z. and Zheng, Q., 2015. Direct regeneration of plants derived from *in vitro* cultured shoot tips and leaves of poplar (*Populus euramericana*). Journal of Life Sciences, 9(3): 366-372.
- Joshi, K., chaturvedi, P. and Shubhpriy, A., 2013. Efficient *in vitro* regeneration protocol of *Centella asiatica* (L.) urbn: An endemic and underutilized nutraceutical herb. African Journal of Biotechnology, 12(33): 5164-5172.
- Kumar, M.S., 2017. Rapid *in vitro* multiplication of *Centella asiatica* (L.) Urban through multiple shoots from leaf explants. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 5(3): 41-47.
- Malcolm, C.V., Lindley, V.A., O'Leary, J.W. and Runciman, H.V., 2003. Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. Plant and Soil, 253: 171-185.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Nath, S. and Buragohain, A.K., 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. Biologia Plantarum, 49(3): 411-415.
- Nourafcan, H., Sefidkon, F., Khalighi, A., Mousavi, A. and Sharifi, M., 2014. Effects of IAA and BAP on chemical composition and essential oil content of lemon verbena (*Lippia Citriodora* H.B.K.). Journal of Herbal Drugs, 5(1): 25-32.
- Prasad, A., Singh, M., Yadav, N.P., Mathur, A.K. and Mathur, A., 2014. Molecular, chemical and biological stability of plants derived from artificial seeds of *Centella asiatica* (L.) Urban-An industrially

important medicinal herb. Industrial Crops and Products, 60: 205-211.
- Rakotondralambo, S.O.R., Rodier-Goud, M., Rivallan, R., Lussert, A., Danthu, P., Lamotte, F., Ralambofetra, E., Ramavovololona, P., Noyer, J.L., Baurens, F.L., 2013. Insight into the biology, genetics and evolution of the *Centella asiatica* polyploid complex in Madagascar. Industrial Crops and Products, 47: 118-127.
- Shashikala, C.M., Shashidhara, S. and Rajashekharan, P.E., 2005. In vitro regeneration of *Centella asiatica* L. Plant Cell Biotechnology, 8(4): 53-65.
- Siddiqui, S., Thomas, T. and Khan, Sh., 2019. Standardization of an efficient protocol for *in vitro* micropropagation of Centella asiatica L. –An important medicinal plant. Pharmaceutical and Bioscience Journal, 7(4): 22-26.
- Singh, G., Kaur, B., Sharma, N., Bano, A., Kumar, S., Dhaliwal, S. and Sharm, V., 2014. In vitro micropropagation and cytomorphological evaluation of *Centella asiatica* L. urban (Mandukparni) from Himachal pradesh, Indian-An endemic, endangered and threatened herb. Plant Tissue culture and Biotechnology, 24(2): 155-171.
- Sivakumar, G., Alagumanian, S. and Rao, M.V., 2006. High frequency in vitro multiplication of *Centella asiatica* an important industrial medicinal herb. English Life Science, 6: 597-601.
- Sweetman, S.C., 2002. Martindale: The Complete Drug Reference. Pharmaceutical press, 2483p.
- Taghizadeh, M., Naghinejhad, A. and Ahvazi, M., 2004. Determination of growth and distribution of *Centella asiatica* L. in the Anzali lagoon. International Congress on Traditional Medicine and Materia Medica.
- Tiwari, K.N., Sharma, N.C., Tiwari, V. and Singh, B.D., 2000. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63:179-185.
- Zhang, L., Jiarong. L., Hogan, S., Chung, H., Gregorg, E. and Zhou, W.K., 2010. Inhibitory effect of rasberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. Food chemistry, 11(9): 592-599.

Optimization of tissue culture in *Centella asiatica* (L.) Urban, an endangered medicinal plant

F. Heidargholinezhad[1*], Y. Hamidoghli[2], V. Ghasemiomran[3] and P. Biparva[4]

1*- Corresponding author, Ph.D. student, Breeding and Biotechnology of Horticultural Products, Horticulture Department, Guilan University, Rasht, Iran, E-mail: f.heidargholinezhad2021@gmail.com
2- Horticulture Department, Guilan University, Rasht, Iran
3- Tabarestan Institute of Genetics and Biotechnology, Sari, Iran
4- Department of Basic Sciences, Sari Agriculture Science and Natural Resources university, Sari, Iran

Received: April 2022 Revised: December 2022 Accepted: December 2022

Abstract

Centella asiatica (L.) Urban, a medicinal plant from Apiaceae family, is known as an endangered species in Iran. This plant has many therapeutic properties, including memory enhancement, anticancer, and treating skin diseases and has also high antioxidant activities. Plant cell and tissue culture is an important tool in basic studies and has commercial applications. Tissue culture method can be used to breed medicinal plants or change the amount of secondary metabolites. Due to the high value of *C. asiatica*, *in vitro* cultivation can be used to produce more of this plant. Optimizing tissue culture is useful for conducting the applied researches and metabolic engineering of different secondary metabolites biosynthetic pathways. The present study was aimed at achieving a suitable protocol for *in vitro* propagation and determining the appropriate concentrations of growth regulators for micropropagation of this valuable species. The interaction of BAP (0, 1, 2, and 3 $mg.l^{-1}$) and IBA (0, 0.5, and 1 $mg.l^{-1}$) was investigated on proliferation of nodal explants in MS medium. Then, rooting of the propagated explants was evaluated using IBA and NAA. The results showed that MS with 2 $mg.l^{-1}$ BAP and 1 $mg.l^{-1}$ IBA and MS with 1 $mg.l^{-1}$ IBA were the best media for proliferation and rooting, respectively.

Keywords: *Centella asiatica* (L.) Urban, auxin, tissue culture, cytokinin, micropropagation.