باززایی مستقیم گیاه دارویی آب بشقابی (*Centella asiatica* (L.) Urban) از طریق نوک ساقه رونده

محمدولی حبیبی سیلابی[1*]، یوسف حمید اوغلی، امیر صحرارو
[1] گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت
*نویسنده مسئول: mohammadhabibi23vh@gmail.com

چکیده

گیاه آب‌بشقابی یکی از گیاهان ارزشمند دارویی است که دارای خواص دارویی متعددی می‌باشد و از دیرباز برای درمان انواع بیماری‌ها استفاده می‌شده است. این گیاه در سراسر کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند بنگلادش، هند و سریلانکا توزیع شده است. آب‌بشقابی جز گیاهان در معرض انقراض ایران طبقه بندی شده است که بیشتر در تالاب انزلی یافت می‌شود. هدف از انجام این پژوهش ازدیاد و نگهداری این گیاه در حال انقراض به صورت درون شیشه‌ای است. به همین منظور از نوک ساقه‌های رونده این گیاه استفاده شد. در این پژوهش توانایی گیاه برای کالوس‌زایی و شاخه‌زایی مستقیم در محیط کشت بافت به صورت بلوک‌های کامل تصادفی با تنظیم کننده‌های رشد BAP درغلظت‌های (۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و در ترکیب با NAA درغلظت‌های (۰/۲۵، ۰/۵و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در ۳سطح و ۳ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار با غلظت ۳میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین تیمار برای کالوس‌زایی و شاخه‌زایی بود. و همچنین تیمار IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بهترین غلظت برای ریشه‌زایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: کشت بافت، IBA, BAP,NAA .

مقدمه

گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) یک گیاه ارزشمند دارویی متعلق به خانواده Apiaceae است. جنس سنتلا شامل ۵۰ گونه است که در سراسر کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند بنگلادش، هند و سریلانکا توزیع شده است(James and Dubery, 2009). این گیاه علفی، پایا، در محل بندها ریشه‌زا، کرکینه پوش، نیمه آبزی، رونده در حاشیه آب است. دارای ساقه‌های رونده و خزنده، تقریباً در تمامی بندها ریشه‌زا، علفی، باریک، گوشتی و نرم است. برگ‌ها متناوب، کلیوی شکل، کم و بیش در سطح رویی کرکدار و گل‌ها به رنگ سفید متمایل به صورتی، اپی‌ژینیوس[1] و دوپایه است (Oyedeji and Afolayan, 2005). زمان رویش و گل‌دهی آن اردیبهشت و خردادماه و زمان میوه‌دهی آن تیر و مردادماه است. ترکیبات اصلی این گیاه استیک‌اسید[2]، ماداکاسیک اسید[3] و سایر مشتقات گلیکوزیدهای استری‌ترپنی، آسیاتیاکوزید[4] و مادکازوئید[5]است (Fetrow and Avila, 2001). در طول تاریخ از این گیاه برای درمان بیماری‌هایی مانند سفلیس، هپاتیت، زخم معده، صرع، آسم، اسهال و تب استفاده می‌کرده‌اند. امروزه نیز از این گیاه به عنوان داروهای ضد دیابتی، ضد ویروسی، ضد انعقاد، ضد باکتری، ضد واریس (جمع شدن خون در سیاهرگ پا)، ضد تومور و تقویت حافظه استفاده می‌کنند (Vasantharuba *et al*., 2012). آب بشقابی جز گیاهان در معرض انقراض ایران طبقه بندی شده است که بیشتر در تالاب انزلی یافت می‌شود (Jalili and Jamzad, 1999). تنوع زیستی گیاه آب‌بشقابی به دلیل کاهش آب سطحی، محدودیت مناطق پراکنش، برداشت بی‌رویه و استفاده از علف‌کش‌ها در معرض خطر انقراض قرار دارد (تقی زاده و همکاران، ۱۳۸۳). بنابراین، استفاده از یک تکنیک ریزازدیادی کارآمد برای سرعت بخشیدن به تکثیرکلون‌های برتر و حفاظت از آن‌ها حائز اهمیت است. تکثیر سریع به ویژه درمورد گیاهانی که ازدیاد جنسی آن‌ها غیر ممکن و یا مشکل است از طریق ریزازدیادی امکان‌پذیر است

1. Epigynous
2. Acetic acid
3. Madecassic Acid
4. Madecassoside
5. Asiaticoside

IrHC2019

(حاج نجاری، ۱۳۷۳). قوه نامیه پایین و درصد جوانه‌زنی کم در بذر گیاه آب‌بشقابی مشکل اصلی برای تکثیر این گیاه به حساب می‌آید (Devkota and Kumar, 2010). تکنیک‌های کشت بافت می‌توانند نقش مهمی در گسترش کلون‌های برتر و حفاظت از ژرم پلاسم آب‌بشقابی داشته باشند (Tiwari *et al.*, 2000). ازدیاد و نگهداری این گیاه در حال انقراض به صورت درون شیشه‌ای دارای اهمیت فراوانی است و تکثیر درون شیشه‌ای آن از طریق ساقه‌رونده تا به حال گزارش نشده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش، گیاهان مد نظر جهت ریزازدیادی از گیاهان کشت شده در محیط گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان تهیه گردید. نوک ساقه‌های‌رونده در اندازه‌های (۵ تا ۶ سانتی‌متری) از گیاه قطع شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در ابتدا ساقه‌های‌رونده در یک توری مناسب قرارداده شده و با آب حاوی مایع ظرفشویی به میزان مناسب به مدت ۱۵ دقیقه به خوبی شسته شد و پس از شستشوی اولیه، در زیر هود لامینار در هیپوکلریت‌سدیم ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند تا ضدعفونی ریزنمونه‌ها صورت گیرد. در پایان ریزنمونه‌ها سه مرتبه، هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس به مدت ۳۰ ثانیه در داخل اتانول ۷۰٪ استریل شده و در نهایت ۳ تا ۴ با آب مقطر استریل شسته شدند. محیط کشت موراشیگ و اسکوگ[1] دارای ۳٪ ساکارز ۰/۷ درصد آگار با pH محیط برابر ۵/۷ تهیه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار Bar ۱/۲ اتوکلاو شد. ریزنمونه‌های استریل شده در ظروف دارای محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد منتقل شدند. تیمارهای مورد نظر برای کالوس‌زایی و شاخه‌زایی شامل استفاده از تنظیم‌کننده رشد نفتالن‌استیک‌اسید[2] (۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا در ترکیب با ۶-بنزیل آمینوپورین[3] (درغلظت‌های ۱/۰، ۲/۰و ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر) بودند. و برای ریشه‌زایی از تنظیم کننده رشد ایندول‌بوتیریک‌اسید[4] (در غلظت‌های۰/۵، ۱/۰و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد همچنین تیمار MS به تنهایی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس ظروف کشت به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

اندازه‌گیری صفات مورد نظر

پس از یک ماه نمونه‌ها برای شمارش و محاسبه شاخص کالوس‌زایی ، شاخص شاخه‌زایی و شاخص ریشه‌زایی به زیر هود لامینار آزمایشگاه تحت شرایط استریل منتقل شدند. صفات مورد نظر با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه شد.

$$\text{شاخص کالوس‌زایی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه های کال داده}}{\text{کل ریز نمونه های کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص ریشه‌زایی} \frac{\text{تعداد ریز نمونه‌های ریشه‌زایی کرده}}{\text{کل ریز نمونه های کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$$

$$\text{شاخص شاخه‌زایی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه‌های شاخه‌زایی کرده}}{\text{کل ریز نمونه های کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$$

آنالیز آماری

داده‌های مربوط به هر ریزنمونه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار آنالیز شدند. پس از نرمال سازی با استفاده از نرم افزار SPSS آنالیز داده‌ها در محیط SAS انجام پذیرفت. نمودارها در نرم افزاری Excel رسم شد.

نتایج و بحث

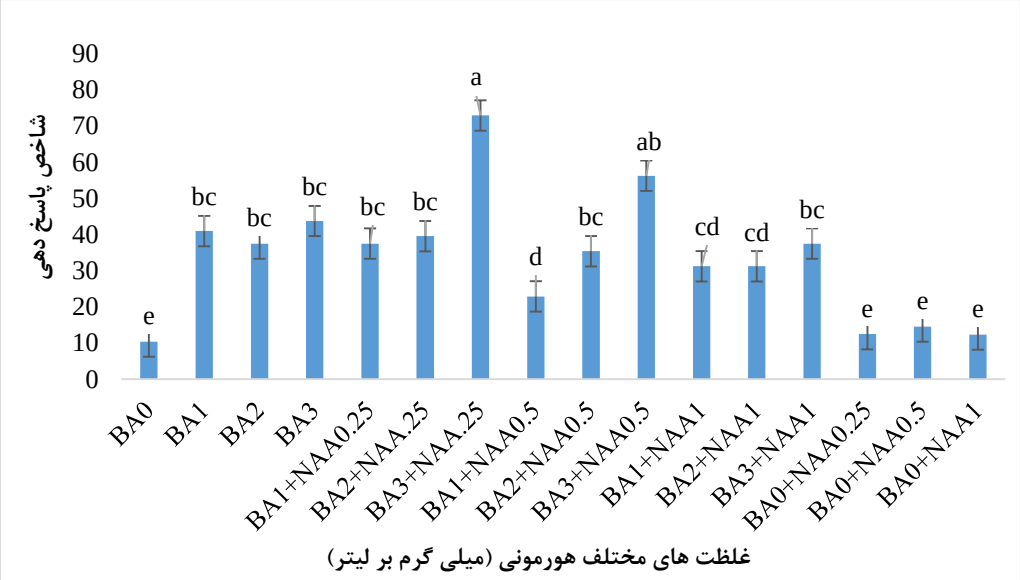
1. MS= MSurashige and Skoog
2. NAA= Naphthalene Acetic Acid
3. BAP= 6-Benzyl Amino Purine
4. IBA= Indole-3-butyric acid

IrHC2019

امروزه تکثیر به روش درون شیشه‌ای یکی از جنبه‌های تجاری تکثیر بسیاری از گیاهان بوده و روند رو به افزایشی دارد(Khoshkhoi, 1984). تاکنون در زمینه ریزازدیادی گیاهان دارویی مانند آلوئه‌ورا (کاظمی‌تبار و گلچوبیان، ۱۳۸۹)، استویا (حمیداوغلی و همکاران، ۱۳۸۹) و ازمک (سعادت و همکاران، ۱۳۸۷) تحقیقات متعددی انجام شده و امکان تکثیر سریع و انبوه برخی از گونه‌های آنها فراهم گردیده است. مؤثرترین فاکتورها در پاسخ‌دهی ریزنمونه‌ها به محیط کشت بافت شامل ژنوتیپ، سن گیاه دهنده، نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت است و می توان گفت اولین مرحله برای پیدا کردن روش مناسب کشت بافت انتخاب ریزنمونه و ترکیب هورمونی مناسب است (Sanjida *et al.*, 2011).

کالوس‌زایی

در این مطالعه، غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینین (BAP) و اکسین (NAA) به تنهایی و یا در ترکیب باهم-دیگر برای کالوس‌زایی به محیط‌کشت MS اضافه شدند در هر شیشه چهار ریز نمونه قرار داده شده بود نتایج نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۲٪/۷۲٪) در تیمار حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر سیتوکینین در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر اکسین بود و کمترین میزان کالوس‌زایی (۴۱٪/۱۰٪) مربوط به تیمار MS بدون هورمون و اکسین به تنهایی (۱۲/۵٪) بود (نمودار ۱).

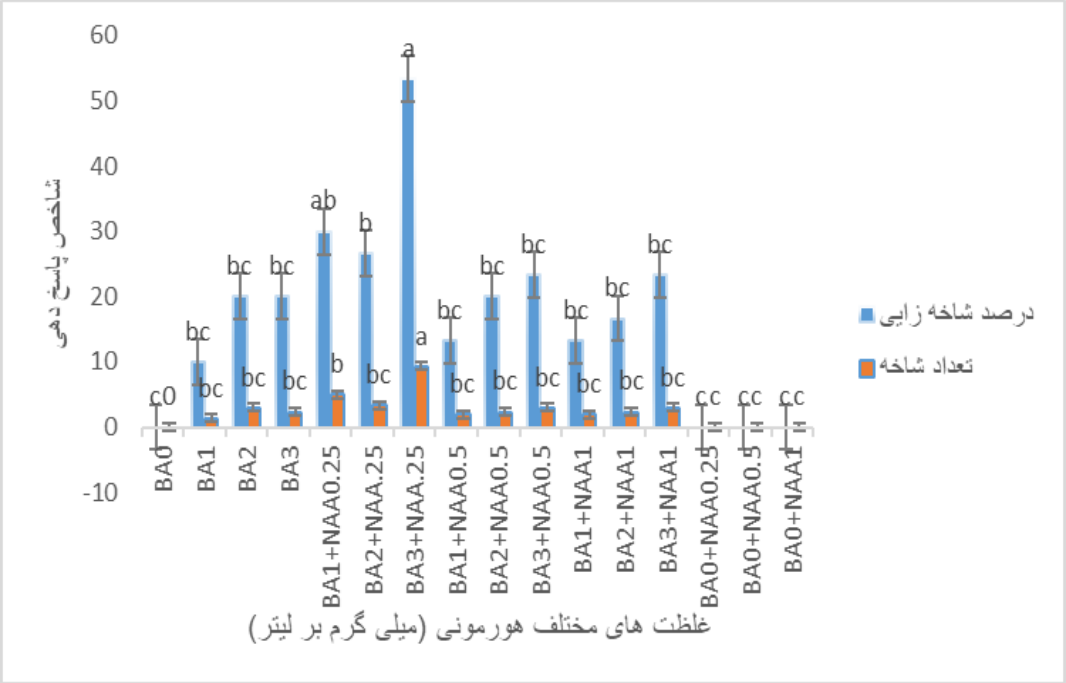


نمودار ۱- شاخص کالوس‌زایی نوک رانر در غلظت‌های هورمونی سیتوکینین (BA) و اکسین (NAA) به تنهایی و در ترکیب با یک دیگر (برحسب میلی‌گرم بر لیتر). حروف روی شکل برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد می‌باشد. وجود حداقل دو حرف بر روی شکل نشان-دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

شاخه‌زایی

در این مرحله تاثیر غلظت‌های مختلفی از سیتوکینین و اکسین بر روی شاخه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. در هر شیشه ۵ ریز نمونه قرار داده شده بود. نتایج به دست آمده نشان داد تیمار ۳ میلی‌گرم درلیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین میزان شاخه‌زایی (۵۳/۳۳٪) باعث گردید و همچنین بیشترین تعداد شاخه (۹/۳۳) نیز در همین تیمار (۳ میلی‌گرم درلیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) به دست آمد (نمودار ۲).

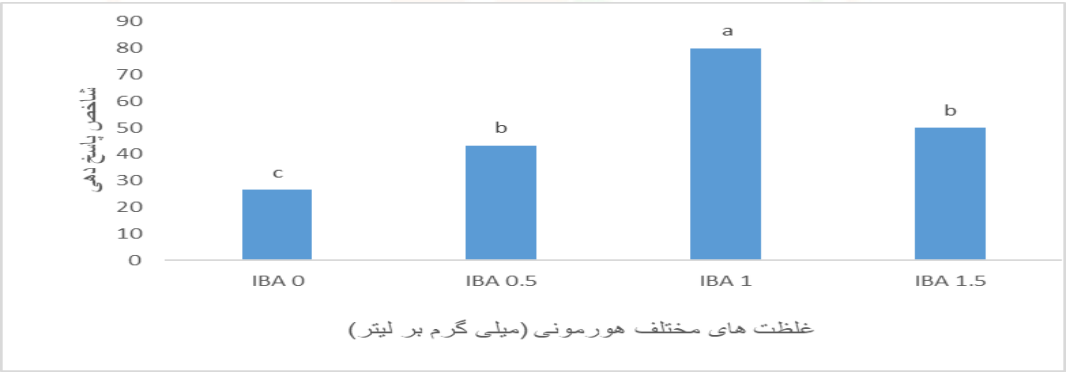
IrHC2019



نمودار۲- شاخص شاخه‌زایی نوک ساقه‌رونده در غلظت‌های هورمونی سیتوکینین (BA) و اکسین (NAA) به تنهایی و در ترکیب با یک دیگر (برحسب میلی‌گرم بر لیتر). حروف روی شکل برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد می‌باشد.وجود حداقل دو حرف بر روی شکل نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

ریشه‌زایی

برای ریشه‌زایی از تنظیم‌کننده رشد اکسین (IBA) در غلظت‌های مختلف استفاده شد. در هر شیشه ۴ ریزنمونه قرار داده شده بود تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بعد از گذشت ۴ هفته بیشترین میزان ریشه‌دهی (۸۰٪) را نشان داد (نمودار ۳).



نمودار۳- شاخص ریشه‌زایی نوک ساقه‌رونده در غلظت‌های هورمونی سیتوکینین (BA) و اکسین (NAA) به تنهایی و در ترکیب با یک‌دیگر (برحسب میلی‌گرم بر لیتر). حروف روی شکل برحسب آزمون توکی در سطح ۵ درصد می‌باشد. وجود حداقل دو حرف بر روی شکل نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بحث

تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و NAA به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر در محیط کشت MS برای کالوس‌زایی و شاخه‌زایی از نوک ساقه‌رونده گیاه دارویی آب‌بشقابی بررسی شد. کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و تعداد شاخه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف BAP و NAA قرار گرفت و در غلظت‌های ۱میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین درصد کالوس‌زایی و شاخه‌زایی و همچنین بیشترین تعداد شاخه به ازای هر ریزنمونه ایجاد شد. در پژوهشی بیشترین درصد کالوس‌زایی برگ (۷۵٪) و ساقه(۸۳٪/۳۳) آب‌بشقابی از ترکیب محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در

IrHC2019

لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شد (Joshi at el., 2013) با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش و پژوهش‌های دیگر نسبت بالای سیتوکینین به اکسین باعث ایجاد کالوس در این گیاه می‌شود.

در پژوهشی که روی ریزازدیادی گیاه آب‌بشقابی از طریق نوک شاخه انجام گرفته شده بود، بیشترین القایی شاخه-زایی (۷۶/۶۷٪) و همچنین بیشترین تعداد شاخه در هر بوته در محیط کشت (MS) به همراه ۴/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Das *et al.*, 2008) که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد و نشان می‌دهد که نسبت بالای BAP به NAA می‌تواند باعث القایی شاخه‌زایی در این گیاه شود. با اندازه‌گیری‌هایی که بر روی درصد ریشه‌زایی این گیاه انجام شد مشخص شد که اکسین IBA به تنهایی باعث ایجاد ریشه در این گیاه می شود که با یافته‌های داس و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد.

منابع

حاج‌نجاری، ح. ۱۳۷۳ ریزازدیادی.انتشارات و موسسه تحقیقات جنگل و مرتع، تهران.

کاظمی تبار، ک. لچوبیان، س. ۱۳۸۹. تکثیر گیاه دارویی آلوئه ورا با استفاده از کشت درون شیشه ای. وزارت علوم، تحقیقات و فناوری - دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری - دانشکده علوم کشاورزی.

حمیداوغلی، ی. ربیعی، ب. طالعی، ن. ۱۳۸۹. ریزازدیادی و تولید گیاه استویا (*stevia rebaudina*) در استان گیلان. وزارت علوم، تحقیقات و فناوری - دانشگاه گیلان - دانشکده علوم کشاورزی

سعادت، ی. جاویدتاش،الف. موسوی، ب. ۱۳۸۷. بررسی ریزازدیادی گیاه اُرمک .*وزارت علوم، تحقیقات و* فناوری - دانشگاه زابل - دانشکده کشاورزی

Das, M. Hasan, F. Hossain, M. and Rahman, M. (2008). Micropropagation of *Centella asiatica* (L.). an important medicinal herb department of genetic engineering and Biotechnology University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Banglades

Devkota, d. and Kumar, p. (2010). Seed germination responses of the medicinal herb *Centella asiatica*. Brazilian Journal of Plant Physiology. 22 no.2 Londrina

Fetrow CW, Avila JR. Professional Hand Book of complementary &Alternative therapies. Pnnsylvania: Spring House; 2001, pp: 239-40.

Jalili, A. Jamzed, Z. Red data book data of Iran, a preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Publication, 1999; 215:pp.748.

James, J. and Dubery, I. (2009). Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.). (Urban). African Journal of Biotechnology, 14:3922-3941.

Joshi, K. Chaturvedi, P. (2013). Efficient in vitro regeneration protocol of *Centella asiatica* (L). Urban: An endemic and underutilized nutraceutical herb Molecules African Journal of Biotechnology 12(33):5164-5172

Khoshkhui, M. Shekafandeh. A. Azarakhsh, H. (1984). Micropropagation of myrtle. Scientia Horticulturae 22: 139-146.

Oyedeji, O. and Afolayan, A. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *centella asiatica* growing in South Africa. Journal of Pharmaceutical Biotechnology. 43(3): 249-252.

Sanjida RM, Sarker RH, Hoque MI (2011). In vitro Plant Regeneration in Brassica spp. Plant

Taghizadeh, M. Ahvazi, M. Naghinezhad, A. Determination of growth and distribution of *centella asiatica* in the anzali lagoon. Iranian Journal Pharm Res. 2004; 3(Supplement 2):66-66.

Tissue Culture and Biotechnology 21: 127-134.

Tiwari, Ch. Bakshi, M and Vichitra, A. (2013). A rapid two step protocol of in vitro propagation of an important medicinal herb *Centella asiatica* (L.). African Journal of Biotechnology 12(10), pp. 1084-1090.

Tiwari, KN. Sharma, N. Tiwari, V. and Singh, B. (2000). Micropropagation of *Centella asiatica* (L). a valuable medicinal herb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. African Journal of Biotechnology, 63:179-185.

IrHC2019

Micropropagation of Gotu kola (*Centella asiatica* (L.) Urban) through Runer tip culture

Mohammadvali Habibi[1] *, Yousef Hamidoghli [2], Amir Sahraroo. [3]
[1*] Msc Student, Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht.
[2] Assistant Prof, University of Guilan, Rasht.
[3] Assistant Prof, University of Guilan, Rasht.
[*]*Corresponding Author: mohammadhabibi23vh@gmail.com*

Abstract
Gotu kola is one of the most valuable medicinal plants that has many medicinal properties and has long been used to treat various diseases. The plant has been distributed throughout tropical and sub-tropical countries like Bangladesh, India and Srilanka. Gotu kola is classified only in plants subject to extinction in Iran, which is found mostly in Anzali lagoon. The purpose of this study is to grow and maintain this extinct plant in vitro. For this purpose, the tip of the plant's runner was used. In this study, the ability of the plant for callus induction and shoot regeneration was studied in vitro in experiments in randomized complete block design, BAP: in 3 levels (1.0, 2.0 and 3.0 mg/L) alone or in combination with NAA in 3 levels (0.25, 0.5 and 1 mg /L).The results showed 3 mg/L BAP plus 0.25 mg/L NAA treatment hormone had the callus induction, shoots induction and the most suitable number of shoots for respectively. Also the best root generation using only 1 mg/L IBA treatment respectively.

***Keywords*:** BAP, NAA, IBA, Tissue culture

IrHC2019