Research Article
Nova Biologica Reperta 9(4): 289-295 (2023)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.9.4.289

مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۲۸۹ الی ۲۹۵ (۱۴۰۱)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی کالوس‌زایی در گیاه دارویی آب‌بشقابی

فرشته حیدرقلی‌نژاد[۱]، یوسف حمیداوغلی[۱]، ولی‌الله قاسمی‌عمران[۲] و پوریا بی‌پروا[۳]
[۱] گروه باغبانی دانشگاه گیلان، رشت، ایران؛ [۲]پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، مازندران، ایران، [۳] گروه علوم‌پایه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران
مسئول مکاتبات: فرشته حیدرقلی‌نژاد، f.heidargholinezhad2021@gmail.com

چکیده. گیاه آب‌بشقابی به‌واسطه تولید ترکیبات ارزشمندی نظیر آسیاتیکوزید، آسیاتیک‌اسید، مادکاسوزید و مادکازیک‌اسید از گیاهان دارویی ارزشمند به حساب می‌آید. این گیاه دارای خواص دارویی فراوان از جمله افزایش حافظه و یادگیری، آرام‌بخش، کاهش فشارخون، آنتی‌اکسیدان قوی و ضدسرطان است. بهینه‌سازی روش‌های کشت‌بافت به‌منظور آسان‌نمودن استحصال ترکیبات‌دارویی آن، فرایند انتقال ژن و نیز بهبود صفات دارویی گیاه، حائز اهمیت است. کالوس‌های تهیه‌شده از گیاهان‌دارویی مختلف را می‌توان به‌منظور افزایش مواد موثره در کشت سوسپانسیون سلولی و انتقال ژن مورد استفاده قرار داد. باتوجه به این که آب‌بشقابی به‌عنوان گیاه دارویی ارزشمندی شناخته شده و پژوهش‌های محدودی در زمینه کشت‌بافت آن انجام شده است، هدف از انجام این آزمایش بررسی غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP و NAA از ریزنمونه برگ برای تولید کالوس، یکی از منابع مهم تولید متابولیت‌های ثانویه است. بدین منظور، از ریزنمونه برگ در محیط MS همراه با غلظت‌های مختلف BAP در شش سطح ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر به همراه NAA در پنج سطح ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌داد بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه برگ با درصد القا کالوس ۱۰۰ درصد، وزن‌تر ۱/۴۵۷ گرم و قطر ۱/۴۵۹ سانتی‌متر در ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آمد. نتایج نشان داد دو هورمون BAP و NAA اثرات سینرژیکی در افزایش و تولید کالوس‌های باکیفیت و مناسب دارند.

واژه‌های کلیدی. آب‌بشقابی، اکسین، ترکیبات‌ثانویه، سیتوکنین، کشت‌بافت

Evaluation of the callogenesis of *Centella asiatica*, a medicinal plant

Fereshteh Heidargholinezhad[1], Yousef Hamidoghli[1], Valiollah ghasemiomran[2] & Pouria Biparva[3]
[1]Department of Horticulture, Guilan University, Rasht, Iran, [2]Tabarestan Institute of Genetics and Biotechnology, Sari, Iran, [3]Department Basic Sciences of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
Correspondent author: Fereshteh heidargholinezhad, f.heidargholinezhad2021@gmail.com

Abstract. *Centella asiatica*, is well known to be a valuable medicinal plant for producing valuable compounds such as asiaticoside, asiatic acid, madcasoside and madcasic acid. The plant is believed to improve memory, lower blood pressure, be a strong antioxidant and anticancer. Therefore, it is important to optimize tissue culture methods in order to facilitate the extraction of medicinal compounds, gene transfer as well as improvement of medicinal properties of the plant. Calli prepared from various medicinal plants can be used to increase the amount of medicinal compounds in the cell suspension culture and gene transfer. The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of two hormones, BAP and NAA, on leaf explant for callus initiation, as one of the important sources of secondary metabolites production. For this purpose, leaf explants were treated with 6 different concentrations of BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5 mg/L) and 5 different concentrations of NAA (0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L). The results of this study showed that the best callus was obtained by the combination 1.5 mg/L of BAP and 0.5 mg/L of NAA, resulting in the leaf explants with callus induction of 100%, fresh weight of 1.457 gr and callus diameter of 1.459 cm. The results showed that two hormones of BAP and NAA have synergistic effects on the increase of the quality and quantity of the produced calli.

Key words. auxin, cytokinin, secondary metabolites, tissue culture

Received 20.04.2022/ Revised 03.06.2022/ Accepted 21.06.2022/ Published 20.03.2023
دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱/ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۳/۱۳/ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۱/ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]

مقدمه

گیاه‌دارویی آب‌بشقابی با نام علمی *Centella asiatica* (L.) Urb.، از تیره کرفسیان (Apiaceae)، با توجه به پراکنش خاص و خواص دارویی با ارزش دارای اهمیت است و از گذشته در درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. این گیاه بومی شمال ایران است که عمدتاً در تالاب انزلی یافت می‌شود (Jalili & Jamzad, 1999). از نظر گیاهشناسی، این گونه علفی، پایا، رونده، در محل‌بندها ریشه‌زا، کرکینه‌پوش، نیمه‌آبزی و رونده در حاشیه منابع آبی است (Mozaffarian, 1983). ترکیبات گیاه شامل فلاونوئیدها (کوئرستین، کامپفرول)، گلیکوزیدهای مختلف، ترپنوئیدها (آسیاتیکوزید، سنتللوزید، مادکاسوزید، براهموزید، براهمینوزید)، مادکاسسول، مادکاسسیک‌اسید، آسیاتیک‌اسید، آسیاتیسنوتیک‌اسید، سنتلیک‌اسید، سنتویک‌اسید، اسیدهای‌چرب، آمینواسیدها، فیتواسترول و تانن است (Jalili & Jamzad, 1999; Greunwald et al., 2000). ترکیبات اصلی این گیاه، آسیاتیک‌اسید، مادکازیک‌اسید و سایر مشتقات گلیکوزیدهای‌استری تری‌ترپنی، آسیاتیکوزید و مادکاسوزید می‌باشد. از این گیاه برای درمان بیماری‌های پوستی، سیفلیس، روماتیسم، بیماری‌های مغزی، صرع و هیستری استفاده می‌شود (Kuhn, 2000). در طب آیورودا نیز به‌عنوان جوان‌کننده و تسکین‌دهنده سلول‌های عصبی و مغزی، افزایش‌دهنده هوش، طولانی‌شدن عمر و بهبود حافظه استفاده می‌نمایند (Kuhn, 2000). ترکیبات آلی در گیاهان دارویی در بیش‌تر موارد در دوره خاصی از رشد گیاه تولید می‌شوند. نقش این مواد گوناگون بوده و در صنایع مختلف مانند دارویی، عطرسازی و غذایی به‌کار می‌روند و از همین‌رو در بیوتکنولوژی و زیست‌فناوری مورد توجه قرارگرفته‌اند (Maziard et al., 2011).

اکسین و سیتوکنین از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تاثیرگذار بر تقسیم‌سلولی در کشت درون‌شیشه‌ای هستند. براساس تحقیقات گذشته حضور دو هورمون اکسین و سیتوکنین به‌منظور القا کالوس در محیط کشت بافت ضروری است. در گزارشی در گیاه آب‌بشقابی از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوک (MS) و غلظت‌های مختلف هورمون‌های گیاهی بنزیل‌آمینوپورین (BA)، نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و توفوردی (2,4-D) استفاده گردید. نتایج نشان داد مناسب‌ترین کالوس‌دهی در محیط دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و NAA به دست می‌آید. کالوس‌ها بعد از ۳۵ روز دارای رنگ سبز و بافتی ترد بودند (Nath & Buragohain, 2005). در بررسی کالوس‌زایی ریزنمونه گره در آب‌بشقابی مشخص شد محیط کشت MS همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D موثرین محیط برای القا کالوس (۹۲ درصد) بوده است (Bangaru et al., 2010). در بررسی اثرات هورمون‌های مختلف گیاهی بر کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی آب‌بشقابی بالاترین میزان القا کالوس (۸۷/۶۷ درصد) با ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D دیده شد و از طرفی بالاترین زیست توده در محیطی که حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر کینتین (Kin) بود با وزن‌خشک ۰/۲۷ گرم به‌دست آمد (Suathian et al., 2010). در گزارشی دیگر اثر ترکیبی BAP و NAA برای تولید کالوس از ریزنمونه دمبرگ در آب‌بشقابی ارزیابی شد. نتایج نشان داد استفاده از BAP و NAA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS مناسب‌ترین محیط برای تولید کالوس بوده است (Hoang Loc & Nguyen, 2010). در مطالعه‌ای از ریزنمونه برگ آب‌بشقابی در محیط کشت MS در ترکیبی از ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کالوس‌های مناسبی تولید شد (Arumugam et al., 2011)، همچنین در گزارشی از ریزنمونه برگ در ترکیب‌های مختلفی از BAP و NAA برای تولید کالوس استفاده شد. تنها در ترکیبی از ۴/۴۲ میکرومولار BA به‌همراه ۱۰/۷۴ یا ۲۱/۴۸ میکرومولار NAA کالوس‌هایی غیرجنینی، شکننده و به رنگ سبزروشن تا سبزقهوه‌ای تولید گردید که این کالوس‌ها کیفیت مناسبی داشته و قابلیت باززایی را داشتند (Bibi et al., 2011). در بررسی میزان آسیاتیکوزید درکشت‌سلولی آب‌بشقابی در محیط کشت MS همراه با BAP و ایندول‌استیک‌اسید (IAA) در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر کالوس‌های مناسبی تولید شد (Komar et al., 2012). باتوجه به گزارشات بیان شده اکسین و سیتوکنین دو هورمون مهم در القا کالوس هستند که استفاده توام از آن‌ها نتایج قابل‌قبولی در تولید کالوس‌ها داشته است. کال‌زایی و تکثیر در شرایط درون‌شیشه‌ای به استفاده از هورمون‌های‌گیاهی و توانایی بافت‌ها برای پاسخ به اثرات هورمونی در طول‌کشت وابسته است (Akbas et al., 2009). میزان استفاده از تنظیم‌کننده‌های خارجی به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های داخلی گیاه بستگی دارد، البته تولید کالوس، اندام‌های هوایی و ریشه بستگی به حضور اکسین و سیتوکنین داشته و توازن بین آن‌ها تولید هریک را سبب می‌شود (Bhaskaran & Smith, 1990). در شرایط آزمایشگاهی می‌توان متابولیت‌های با ارزش موجود در گیاهان دارویی را در تمام

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]

فصول و با مقدار و کیفیت مناسب تولید نمود (Debnath et al., 2006). از بافت کالوس به‌منظور ازدیاد گیاهان، انتقال‌ژن به گیاه و هم‌چنین تولید متابولیت‌های‌ثانویه و سایر ترکیبات مفید استفاده می شود (Sharafi, 2008). با توجه به مواد موثره ارزشمند در آب‌بشقابی با استفاده از روش کشت بافت می‌توان با رفع محدودیت‌های زمانی و مکانی این مواد را در شرایط آزمایشگاهی تولید کرد و حتی میزان متابولیت‌های ثانویه این گیاه را افزایش داد. در حال حاضر، تحقیقات محدودی در رابطه با کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه در ایران انجام شده است و از آن‌جایی که کالوس منبعی از ترکیبات ارزشمند موجود در این گیاه است، تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی سیستم کشت بافت آب‌بشقابی به منظور تولید کالوس برای مطالعات بعدی به ویژه تولید مواد موثره گیاه و افزایش آن‌ها انجام شده است.

مواد و روش‌ها

گیاه آب‌بشقابی از گلخانه آموزشی دانشگاه گیلان تهیه و برگ‌های نورس آن جمع‌آوری گردید. از برگ‌ها به عنوان ریزنمونه برای تولید کالوس در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای استفاده شد. برای استریل‌کردن ریزنمونه‌ها، پس از شست‌وشو با آب و مواد شوینده، در زیر دستگاه هود لامینار با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل سه بار به مدت ۵ دقیقه آب‌کشی شدند. برگ‌های استریل در قالب ۶ تکرار، بر روی محیط کشت MS دارای ۳ درصد ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸، با شش سطح ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و پنج سطح ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. ریزنمونه‌ها هر هفته دوبار مورد ارزیابی قرار گرفته و شروع آغاز کالوس‌زایی در هر تیمار یادداشت گردید. تمامی ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۱۴ روز در محیط مشابه و تازه بازکشت شدند. بعد از گذشت ۴۰ روز، درصد کالوس‌زایی، وزن‌تر، قطرکالوس و ویژگی‌های ظاهری آن مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد کالوس‌زایی در هر پتری از تقسیم تعداد ریزنمونه‌هایی که صفت مورد نظر را نشان داده بودند، بر تعداد کل ریزنمونه‌های پتری و ضرب‌کردن در عدد ۱۰۰ به‌دست آمد. میانگین وزن‌تر و قطرکالوس در تیمارهای دارای سطوح مختلف BAP و NAA به‌ترتیب از تقسیم وزن و قطر کل کالوس‌های پتری بر تعداد ریزنمونه‌های پاسخ داده حاصل شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تکرار انجام شد و در هر تکرار پنج ریزنمونه کشت گردید. به منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج

آغاز کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ در میان تیمارهای مختلف متفاوت بود (شکل A۱). پس از گذشت یک هفته ریزنمونه‌های برگ در ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA کالوس‌زایی داشتند. در سایر تیمارها به‌طور میانگین بین ۸ تا ۲۴ روز کالوس‌زایی دیده شد. ریزنمونه‌ها ابتدا از مقطع برش شروع به تشکیل کالوس‌هایی با رنگ کرم تا سبزروشن کردند که به‌تدریج گسترده شدند. بعد از گذشت ۴۰ روز سایر صفات نظیر درصد القا کالوس، وزن تر و قطر کالوس‌ها ارزیابی شد و اختلافات معنی داری در میان صفات مذکور مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر سطوح مختلف BAP و NAA بر تمامی صفات بررسی شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین، بهترین تیمار در تمامی صفات بررسی شده ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بوده است که دارای بیش‌ترین درصد القا کالوس (۱۰۰ درصد)، وزن‌تر (۱/۴۵۷ گرم) و قطرکالوس (۱/۴۵۹ سانتی‌متر) بود (جدول ۲، شکل B۱). بررسی‌ها نشان داد استفاده هم زمان از دو هورمون BAP و NAA در تشکیل کالوس‌های مناسب با وزن و بافت مطلوب موثر است. تیمار بهینه BAP همراه با NAA منجر به تولید کالوس‌هایی سبز رنگ با بافتی ترد گردید. استفاده از سطوح بالاتر BAP (۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با NAA در افزایش تولید کالوس نقش موثری نداشت و بافت کالوس اندکی تغییر کرد که منجر به تولید کالوس‌هایی فشرده گردید. ازطرفی استفاده از سطوح بالاتر NAA (۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به تنهایی یا همراه با BAP باعث تغییر رنگ کالوس‌ها شده و از همان ابتدا کالوس‌هایی به رنگ سبزتیره تا قهوه‌ای تولید شد (شکل C۱). ریزنمونه‌های برگ درتمامی محیط کشت‌های حاوی هورمون‌های گیاهی کالوس تولید کردند اما برای داشتن کالوس‌هایی با وزن، بافت و رنگ مطلوب غلظت استفاده شده از این هورمون‌ها بسیار مهم است. در محیط فاقد هورمون نیز کالوسی تولید نشد (شکل D۱).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]

جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات بررسی شده در کالوس‌زایی آب‌بشقابی.

Table1- Analysis of variance of mean square related indices with tissue culture of *Centella asiatica*.

Sources changes	DF	Mean square			
		Time of beginning callus induction	callus induction	Fresh weight	Callus diameter
BAP (A)	5	266.352**	0.503**	0.869**	0.425**
NAA (B)	4	184.158**	1.448**	4.017**	0.953**
A×B	20	106.355**	0.097**	0.114**	0.146**
Error	150	4.583	0.0102	0.005	0.004
Total	179				
CV (%)		15.85	12.91	10.95	7.55

**: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**: significantly difference at 1%.

جدول۲- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در کالوس‌زایی آب‌بشقابی.

Table 2- Mean comparison of callogenesis in *Centella asiatica*.

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Time of beginning callus induction	Callus induction (%)	Fresh wieght (gr)	Callus diameter (Cm)
0	0	0^{k}	0^{j}	0^{n}	0^{o}
	0.25	15.5^{ef}	26.66^{hi}	0.409^{j}	0.831^{ijklm}
	0.5	12^{d}	30^{hi}	0.404^{j}	0.789^{m}
	1	11.33^{cd}	50^{gf}	0.547^{hi}	0.871^{hijkl}
	2	11.33^{cd}	56.66^{efg}	0.582^{h}	0.881^{ghijk}
0.5	0	19.66^{hi}	26.66^{hi}	0.251^{k}	0.608^{n}
	0.25	12.66^{d}	33.33^{h}	0.685^{g}	0.906^{efghi}
	0.5	13.33^{de}	33.33^{h}	0.720^{fg}	0.921^{efgh}
	1	8.5^{b}	66.6^{bcde}	0.983^{bcd}	0.980^{cde}
	2	8^{b}	60^{def}	0.971^{bcd}	0.895^{fghi}
1	0	18.33^{hg}	30^{hi}	0.117^{m}	0.805^{klm}
	0.25	12.66^{d}	30^{hi}	0.47^{i}	0.823^{jklm}
	0.5	8^{b}	100^{a}	1.025^{bc}	1.162^{b}
	1	12.5^{d}	66.6^{bcde}	0.971^{bcd}	0.961^{def}
	2	15.66^{ef}	73.3^{bc}	0.968^{cde}	0.953^{defg}
1.5	0	16^{fg}	46.66^{g}	0.210^{kl}	0.869^{hijkl}
	0.25	12^{d}	46.66^{g}	0.882^{e}	0.789^{m}
	0.5	7^{a}	100^{a}	1.457^{a}	1.459^{a}
	1	9^{bc}	70^{bcd}	0.972^{bcd}	1.039^{c}
	2	15.5^{ef}	76.66^{b}	0.985^{bcd}	0.971^{cdef}
2.5	0	21.33^{i}	21.66^{i}	0.12^{m}	0.796^{lm}
	0.25	13.5^{de}	50^{gf}	0.787^{f}	0.823^{jklm}
	0.5	9.5^{cd}	90^{a}	1.058^{b}	1.146^{b}
	1	12^{d}	73.3^{bc}	0.941^{cde}	0.971^{cdef}
	2	16^{fg}	70^{bcd}	0.975^{bcd}	0.964^{cdef}
3.5	0	24.33^{j}	30^{hi}	0.128^{lm}	0.801^{lm}
	0.25	17.5^{hgf}	46.66^{g}	0.781^{f}	0.804^{lm}
	0.5	16.83^{fg}	73.3^{bc}	0.931^{de}	1.029^{cd}
	1	15.5^{ef}	63.33^{cde}	0.925^{de}	0.919^{efgh}
	2	19.66^{hi}	66.6^{bcde}	0.907^{de}	0.856^{hijklm}

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، از نظر آماری مطابق آزمون LSD در سطح احتمال ۱درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column, the means with a common letter are not significantly different at 1% probability level base on the LSD analysis.

بحث

بررسی تشکیل کالوس روی ریزنمونه‌های اولیه نشان می‌دهد که پاسخ‌دهی در محیط‌های کشت مختلف متفاوت است. به‌طورکلی،همه ریزنمونه‌های کشت شده در محیط حاوی هورمون‌های گیاهی کالوس ایجاد کردند، ولی نوع کالوس ایجاد شده براساس وزن، قطر، رنگ و شکنندگی متفاوت بود. نتایج این تحقیق نشان داد حضور دو هورمون سیتوکنین و اکسین برای کالوس‌دهی مطلوب در گیاه آب‌بشقابی ضروری است. در مطالعات پیشین درباره نقش موثر BAP و NAA در کالوس‌زایی آب‌بشقابی و دیگر گیاهان دارویی اشاره شده است (Bonfill et al., 2011, Bibi et al., 2011, Kumari & Prasad., 2020). اما دامنه استفاده از این هورمون‌ها در گزارشات متفاوت بود. به همین دلیل در این پژوهش غلظت‌های ۰/۵ تا ۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر از BAP و ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده گردید.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]

شکل ۱– A: کشت ریزنمونه برگ به منظور القاکالوس. **B**: کالوس حاصل از برترین تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA. **C**: تشکیل کالوس‌های قهوه‌ای در سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA. **D**: عدم تشکیل کالوس در محیط فاقد هورمون.

Figure1. A. Callus induction from leaf explants. **B.** Callus formation on 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA. **C.** Formation brown calli in levels 1 and 2 mg/L NAA. **D.** No callus formation on control medium.

طبق نتایج به‌دست آمده بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. نکته قابل‌توجه در استفاده از سطوح مختلف از هورمون‌های گیاهی نوع ریزنمونه به کار رفته است، در واقع بسته به گونه گیاهی، نوع و سن ریزنمونه‌های مورد استفاده غلظت به خصوصی از این هورمون‌ها بیشترین تاثیر را در کالوس‌زایی نشان می‌دهد (Abbasi et al., 2007). در این مطالعه با توجه به این که از ریزنمونه برگ استفاده گردید ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین نتیجه را نشان داد، استفاده از سطوح بالاتر BAP (۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۱ و۲ میلی‌گرم بر لیتر) زمان القا کالوس را به طور میانگین بین ۱۷ تا ۲۴ روز افزایش داد. همچنین با افزایش میزان اکسین از ۰/۵ به ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر درصد و میزان کالوس‌زایی کاهش معنی‌داری پیدا کرد که منجر به تولید کالوس‌هایی به رنگ قهوه‌ای گردید. عدم حضور اکسین و نسبت بالاتر اکسین به سیتوکنین در محیط کشت نیز تولید کالوس را محدود کرده و سبب تشکیل کالوس‌هایی ریز گردید. پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه به کالوس‌دهی در غلظت‌های مختلف هورمونی به دلیل غلظت متفاوت از سطوح درونی اکسین و سیتوکنین است که در ارتباط با اثرات ژن‌ها به آغاز تمایزیابی در سلول‌هاست (Rout & Das, 1997). در تحقیق حاضر برهمکنش سیتوکنین و اکسین بر کالوس‌زایی در صفات بررسی شده موثرتر عمل کرده و وزن و قطرکالوس‌ها در غلظت مناسب از این دو هورمون افزایش یافته است. میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های رشد به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعیین کننده و مهم به شمار می‌رود (Abbasi et al., 2007). بنابراین برای کشت موفقیت‌آمیز در شرایط درون‌شیشه‌ای تعیین غلظت مناسب از هورمون‌های رشد گیاهی بسیار حائز اهمیت است که در این پژوهش غلظت‌های مناسب هورمون‌ها تعیین شد. در گزارشی در بررسی کالوس‌زایی آب‌بشقابی از ریزنمونه نوک‌رونده همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده شد و کالوس‌های مطلوبی به‌دست آمد (Habibisilabi et al., 2020). نتایج این تحقیق با گزارش فوق که برنقش موثر BAP و NAA در کالوس‌زایی آب‌بشقابی اشاره داشتند تا حدودی همسو می‌باشد. در این پژوهش در سطوح پایین‌تر BAP (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) به همراه NAA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) مناسب‌ترین کالوس‌ها به‌دست آمد که البته با توجه به نوع ریزنمونه این سطوح هورمونی مناسب تعیین شد و در ریزنمونه برگ استفاده از غلظت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]

بالاتر BAP میزان وزن و قطرکالوس را کاهش داد و بر تعداد روزهای القا کالوس اضافه گردید. استفاده از غلظت بالاتر BAP نسبت به NAA به تکثیر و افزایش وزن کالوس کمک کرد و در محیط‌هایی که حاوی مقادیر کم‌تر BAP نسبت به NAA بودند وزن و قطرکالوس کاهش یافت. نتایج این تحقیق با گزارشی که اشاره داشتند در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیترBAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بالاترین القا کالوس دیده شده (Rao et al., 2015) و مطالعه‌ای دیگر که از ریزنمونه برگ در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیترBAP و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در آب‌شقایی کالوس‌های مناسب تولید کردند (Krishnan et al., 2019)، مغایرت دارد. در این تحقیق استفاده از نسبت بیشتر سیتوکنین به اکسین در افزایش تکثیر و تقسیم سلولی موثر بوده و توانست وزن و قطرکالوس را در زمان کوتاه‌تری افزایش دهد. نتایج نشان داد ترکیب هورمونی BAP درسطح بالاتری نسبت به NAA در تسهیل القای کالوس و حفظ آن موثر است. در این تحقیق استفاده از سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA منجر به تولید کالوس‌هایی به‌رنگ قهوه‌ای شد. به نظر می‌رسد استفاده از این هورمون درغلظت بالاتر منجر به افزایش اکسین درونی در بافت شده و با تغییر تعادل هورمونی کالوس‌هایی به‌رنگ قهوه‌ای و کیفیت نامطلوب تولید شده است. به‌طور کلی تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل‌کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده برخی از ژن‌های مسئول درسنتز کالوس به‌طور کامل بیان نشوند (Mahmood et al., 2012). درتحقیق حاضر گیاه دارویی آب‌شقایی قابلیت تولید کالوس قابل‌توجهی را در محیط‌کشت MS همراه با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA نشان داد.

نتیجه‌گیری

اثر دو هورمون اکسین و سیتوکنین بر تحریک و رشد کالوس در گزارشات مختلف بیان شده است. عوامل موثر درالقا کالوس نوع هورمون‌های گیاهی به کار رفته و نوع ریزنمونه است. طبق نتایج این تحقیق ریزنمونه برگ درترکیب با ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین نتیجه را در کالوس‌دهی آب‌شقایی داشته است. این دو هورمون تاثیر مطلوبی درالقا، رشد و توسعه کالوس‌ها داشته‌اند. استفاده از BAP در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر به رشد و گسترش کالوس کمک کرد. NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نقش موثری درکالوس‌دهی نشان داد، بنابراین تعادل هورمون‌های مورد استفاده در ترکیب با نوع ریزنمونه نقش موثری در کشت بافت گیاهان دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از زحمات کلیه افرادی که در انجام این تحقیق آن‌ها را یاری کردند، نهایت قدردانی و تشکر را دارند.

REFERENCES

Akbas, F., Isikalan, C. & Namli, S. 2009. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Applied Biochemistry Biotechnology 158: 470-475.

Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. & Liu, C.Z. 2007. Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities in vitro cell. Development Biology Plant 43: 481-492.

Arumugam, Th., Ayyanar, M., Justinkoilpilly, Y. & Sekar, Th. 2011. Phytochemical screening and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Centella asiatica* L. Journal of the Bangladesh Pharmacological Society 6: 55-60.

Bangaru, T., Rao, S.N., Mani, N.S., Mohan, J. & Pola, S. 2010. Conservation of an endangered medicinal plant *Centella asiatica* through plant tissue culture. Drug Invention Today 2: 17-21.

Bhaskaran, S. & Smith, R.H. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Science 30: 1329-1336.

Bibi, Y., Zia, M., Nisa, S., Darima, H., Waheed, A. & Chaudhary, F.M. 2011. 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 5:13-18.

Bonfill, M., Mangas, S., Moyano, E., Cusido, R.M. & Palazon, J. 2011. Production of centelloside and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica* (L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 104: 61-67.

Debnath, M., Malik, C.P. & Bisen, P.S. 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology 7: 33-49.

Gruenwald, J, Brendler, A. & Jaenicke, C. 2000. PDR for Herbal Medicine. Second Edition: Medical economics Co Montvale New Jersey. pp: 729-31.

Habibisilabi, V., Hamidoghli, Y. & Sahraroo, A. 2020. Micropropagation of Gotukola (*Centella asiatica* L.) via runner tip culture. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 21: 309-318. (In Persian)

Hong Loc, N. & Thitam, N. 2010. Asiaticoside production from centella (*Centella asiatica* (L.) Urban) cell culture. Biotechnology and Biology Process Engineering 15: 1065-1070.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]

Jalili, A., & Jamzad, Z. 1999. Red data book of plant species of Iran: Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran p: 663.

Komar, R., Dewi, A., Bulan, Sh., Rukayadi., Y. & Elfahmi, H. 2012. Effect of agrobacterium rhizogenes and elicitation on the asiaticoide production in cell cultures of *Centella asiatica*. Pharmacognosy Magazine 8: 111-115.

Krishnan, M., Roy, A. & Bharadvaja, N. 2019. Elicitation effect on the production of Asiaticosid and Asiatic acid in shoot, callus and cell suspension culture of *Centella asiatica*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 9: 67-74.

Kuhn, MA. 2000. Herbal therapy & supplements, Lippincott: NewYork, pp: 163- 66.

Kumari, Sh. & Prasad, M. 2020. An efficient protocol for mass multiplication of *Centella asiatica* (L.) Urban and determination its phenolic content. Current Botany, 11: 233-239.

Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z.U.D., Hafez, I.A., & Kaleem, S. 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pakistan Journal of Botany 44: 277-284.

Maziard, M., Khan, T. & Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanism of plants. Biology and Medicine 3: 232-249.

Mozaffarian, V. 1983.The family of Umbelliferae in Iran (keys and distribution): Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran. pp: 23-24.

Nath, S. & Buragohain, A.K. 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica* L. Biologia Plantarum 49: 411-413.

Rao, S., Usha, K., & Arjun, M. 2015. Production of secondary metabolites from callus cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban. Annals of Phytomedicine 4: 74-78.

Rout, G.R., & Das, P. 1997. In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants 4: 41-51.

Sharafi, A., Hashemi Sohi, H. & Jourabchi, E. 2008. Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L. Journal of Environmental Research 21: 565-573. (In Persian).

Suathian, T., Musa, R., Ariff, A. & Maziah, M. 2010. Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonid production from pegaga (*Centella asiatica* (L.) Urban). American Journal of Biochemistry and Biotechnology 6: 284-299.

*****

How to cite this article:

Fereshteh Heidargholine, F., Hamidoghli, Y., ghasemiomran, V. & Biparva, P. 2023. Evaluation of the callogenesis of *Centella asiatica* (L.) Urb., a medicinal plant. Nova Biologica Reperta 9: 289-295. (In Persian).

حیدرقلی‌نژاد، ف.، حمیداوغلی، ی.، قاسمی‌عمران، و. و بی‌پروا، پ. ۱۴۰۱. بررسی کالوس‌زایی در گیاه دارویی آب‌بشقابی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۲۹۵-۲۸۹.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.5.7]