

تأثیر اکسین و سیتوکنین بر کشت درون شیشه‌ای آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) Impact of Auxin and Cytokinin on *in vitro* Culture of Asiatic Gotu Kola [(*Centella asiatica* (L.)) Urban

فرشته حیدرقلی‌نژاد^۱، یوسف حمیداوغلی^{۲*}، ولی‌الله قاسمی‌عمران^۳ و پوریا بی‌پروا^۴

۱- اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان باغبانی دانشگاه گیلان

۲- گروه باغبانی دانشگاه گیلان

۳- پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان

۴- گروه علوم پایه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: (y.hamidoghli@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۵

چکیده

گیاه دارویی آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) به‌عنوان گونه‌ای در معرض انقراض در ایران شناخته شده است. این گیاه دارای ویژگی‌های درمانی گوناگونی مانند درمان زخم، ضد سرطان، بهبود اعصاب و حافظه می‌باشد. با توجه به ارزش بالای آب‌بشقابی، می‌توان از کشت درون شیشه‌ای برای تولید بیش‌تر این گیاه بهره برد. بنابراین، هدف این پژوهش، دستیابی به یک پروتکل مناسب برای افزایش این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای است. در مرحله اول، برای انگیزش پینه، 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. یافته‌های این پژوهش نشان داد بهترین پینه‌زایی در ریزنمونه برگ در ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌دست آمد. در ارزیابی ریزافزایی از ریزنمونه گره برهمکنش BAP در غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر با IBA در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت MS بررسی شد. در مرحله بعد ریشه‌زایی از ریزنمونه‌های تکثیر یافته با کاربرد دو نوع اکسین IBA و NAA ارزیابی شد. با بررسی نتایج، محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، مناسب‌ترین محیط برای شاخه‌زایی تعیین شد. همچنین، محیط دارای IBA در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر بهترین نتایج را جهت ریشه‌زایی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آب‌بشقابی، انگیزش پینه، کشت بافت، گیاه دارویی، ریزافزایی.

مقدمه

آب‌بشقابی با نام علمی (*Centella asiatica* L.) از خانواده چتریان گیاهی چند ساله، علفی، پایا، رونده، در محل بندها ریشه‌زا، نیمه‌آبزی و روینده در حاشیه آب است. اغلب در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و مرطوب در ارتفاع ۰ تا ۲۰۰۰ متر رویش دارد. این گیاه نه‌روی و آسیب‌پذیر، با توجه به منابع معتبر و نمونه‌های دقیق هرباریومی، تاکنون پراکنشی فراتر از محدوده تالاب انزلی برای آن گزارش نشده است (Ghadirisardrood et al., 2019; Sweetman, 2002). این گونه گیاهی نیازمند رویش در بخش‌های نمناک و مرطوب حواشی تالاب است (Ghadirisardrood et al., 2019). از جمله گیاهانی است که با توجه به وجود ترکیبات ارزشمند دارویی، پراکنش خاص و محدود، بسیار دارای اهمیت است. ترکیبات گیاه شامل فلاونوئیدها (کوئرستین^۲، کامپفرول^۳)، گلیکوزیدهای مختلف، ترپنوئیدها (آسیاتیکوزید^۴، سنتللوئید^۵، مادکاسوزید^۶، براهموزید^۷، براهمینوزید^۸)،

Madecassoside -۶	Centelloside -۵	Asiaticoside -۴	Kaempferol -۳	Quercetin -۲	Apiaceae -۱
Asiatic acid -۱۰	Madecassic acid -۹		Brahminoside -۸		Brahmoside -۷

مادکاسسیک اسید^۹، آسیاتیک اسید^{۱۰}، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، فیتواستروئول و تانن می باشد (Gruenwald et al., 2000). ترکیبات اصلی آن، آسیاتیک اسید، مادکازیک اسید و سایر مشتقات گلیکوزیدهای تری ترپنی، آسیاتیکوزید و مادکاسوزید می باشد که دارای خواص دارویی می باشند (Sweetman, 2000). از این گیاه در درمان آسم، برونشیت، مشکلات کلیه، بیماری های پوستی و هم چنین در بهبود حافظه، افزایش قدرت یادگیری، ضدسرطان و کاهنده فشارخون استفاده می شود (Gupta et al., 2014).

در شرایط طبیعی، تولید گیاهان دارویی در تمام طول سال مقدور نیست و محدودیت هایی در تولید آن وجود دارد. استفاده از کشت درون شیشه ای به عنوان ابزاری توانمند برای مطالعات کاربردی و تجاری، شناخته می شود (Akbas et al., 2009). با روش کشت درون شیشه ای می توان در مورد اصلاح گیاهان دارویی و یا بهبود در میزان متابولیت های ثانویه اقدام نمود (Nourafcan et al., 2008). از بافت پینه (کالوس) برای افزایش گیاهان، انتقال ژن به گیاه و هم چنین تولید متابولیت های ثانویه و سایر ترکیبات مفید می توان استفاده نمود (Sharafi et al., 2008). کشت سلول و بافت گیاهی ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است، زیرا به کمک آن می توان به سرعت تعداد زیادی از واریته های جدید گیاهی را در فضای آزمایشگاهی محدود و کنترل شده تولید نمود یا برای تولید گیاهان مادری عاری از بیماری از آن بهره جست. افزایش درون شیشه ای دارای پتانسیل بالقوه در تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا می باشد که این مهم، می تواند به شیوه های گوناگون ریززایی به دست آید. با وجود ترکیبات با ارزش در گیاه آبشقبایی، بهینه سازی کشت درون شیشه ای، افزایش ترکیبات دارویی و اصلاح صفات آن باید مورد توجه قرار گیرد. ریزازدیادی در گونه های متنوعی از گیاهان دارویی و از جمله آبشقبایی نتایج مطلوبی نشان داده است (Nath and Buragoharin, 2005 & Sivakumar et al., 2006).

با توجه به این که آبشقبایی جز گیاهان با خواص دارویی ارزشمند است، ارزیابی کشت درون شیشه ای آن به منظور تولید کالوس و ریزازدیادی برای حفظ این گونه ارزشمند و در معرض انقراض، ضروری است. تولید پینه، باززایی و ایجاد ساقه های جدید به طور معمول به تیمار همزمان اکسین و سیتوکنین نیاز دارد و این دو تنظیم کننده رشد، از مهم ترین تنظیم کننده های رشد مورد استفاده در کشت درون شیشه ای گیاهان هستند. توازن بین اکسین و سیتوکنین تولید اندام هوایی و ریشه ها را سبب می شود. گرچه میزان تنظیم کننده های خارجی به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد. اندامزایی در شرایط درون شیشه ای علاوه بر استفاده از تنظیم کننده های رشد گیاهی به توانایی بافت ها برای پاسخ به این تغییرات در طول کشت وابسته است (Akbas et al., 2009). ریزنمونه گره به دلیل سادگی به عنوان یکی از روش های ترجیحی و بهترین ریزنمونه به منظور باززایی مستقیم برای تکثیر تجاری گیاهان شناخته شده است (Malcolm et al., 2013).

در گزارشی در گیاه آبشقبایی از ریزنمونه برگ در محیط کشت موراشیگ و اسکوک (MS) و غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین (BA)، نفتالین استیک اسید (NAA) و توفوردی (2,4-D) استفاده گردید. نتایج نشان داد مناسب ترین پینه زایی در محیط دارای ۱ میلی گرم بر لیتر BA و NAA به دست آمد. پینه ها بیس از ۳۵ روز دارای رنگ سبز و بافتی تُرد بودند (Nath and Buragohain, 2005). در بررسی پینه زایی ریزنمونه گره در آبشقبایی، مشخص شد محیط کشت MS همراه با ۴ میلی گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D موثرین محیط برای پینه انگیزی (۹۲٪) بوده است (Bangaru et al., 2010). در بررسی اثرات تنظیم کننده های رشد مختلف بر کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی آبشقبایی، بالاترین میزان القا کالوس (۸۷/۶۷٪) با ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D دیده شد و از طرفی بالاترین بیوماس در محیطی که حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین (Kin) بود با وزن خشک ۰/۲۷ گرم به دست آمد (Suathian et al., 2010). برای پرآوری آبشقبایی در محیط کشت MS از ریزنمونه نوک رونده همراه با ۴ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA استفاده شد و به طور میانگین ۱۰ شاخه از هر ریزنمونه تولید گردید. شاخه ها در محیط MS با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA ریشه دار شدند و گیاهان باززایی شده با موفقیت با محیط بیرون سازگار گردیدند (Farukhhsan et al., 2008). در باززایی آبشقبایی از کالوس های به دست آمده در محیط MS همراه با BAP و ۱/۵ kin ۱ میلی گرم بر لیتر بعد از گذشت ۶ هفته، شاخه های متعددی تشکیل گردید. برای ریشه زایی شاخه ها از محیط کشت MS همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر NAA استفاده شد (Bangaru et al., 2010). در باززایی آبشقبایی از کالوس ها بالاترین تعداد شاخه در محیط MS همراه با ۵/۳۷ میکرومولار NAA و ۴/۴۲ میکرومولار BA با ۱۰ شاخه در هر کالوس به دست 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 تکثیر

گیاه آب‌بشقابی از ریزنمونه گره همراه با غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP و kin در ۱، ۲ و ۳ میلی گرم بر لیتر استفاده گردید. بالاترین درصد القا شاخه (۹۰ درصد) در محیط دارای ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر kin با میانگین ۱۶ شاخه بود. هم‌چنین، محیط دارای ۱ میلی گرم بر لیتر IBA همراه با NAA بالاترین القا ریشه را طی ۴ هفته داشت و ۱۶ ریشه در هر شاخه به دست آمد (Singh et al., 2014).

بهینه‌سازی فرآیند تولید گیاه آب‌بشقابی با استفاده از روش‌های مختلف مانند باززایی مستقیم و غیرمستقیم می‌تواند برای انجام پژوهش‌های بنیادی و کاربردی از جمله دست‌ورزی‌های ژنتیکی مانند تراریختی، تغییر سطوح پلوئیدی، مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مهم در آب‌بشقابی مفید باشد. با توجه به مواد موثره ارزشمند در آب‌بشقابی از روش کشت درون شیشه‌ای می‌توان با رفع محدودیت‌های زمانی و مکانی، این مواد را در شرایط آزمایشگاهی تولید کرد و حتی میزان متابولیت‌های ثانویه را افزایش داد. 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 در خصوص تولید مواد موثره و افزایش این ترکیبات ارزشمند انجام شده است و 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 جهت تکثیر این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

گیاه آب‌بشقابی از گلخانه آموزشی دانشگاه گیلان تهیه شد. در ابتدا قطعات برگ و گره از گیاه گلدانی جمع‌آوری شد و به مدت نیم ساعت در زیر آب جاری قرار گرفت. سپس جهت گندزدایی نهایی، نمونه‌ها در زیر دستگاه هود لامینار به اندازه ۱ سانتی‌متر جدا شدند و به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد قرار گرفتند. در نهایت ریزنمونه‌ها سه مرتبه با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار آبکشی شدند.

برای استریل کردن محیط کشت، از دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، فشار ۱/۵ بار و به مدت زمانی ۲۵ دقیقه استفاده گردید. آزمایش اول (کالوس‌زایی) با دو فاکتور و شش تکرار و هر تکرار شامل پنج ریزنمونه که فاکتورهای مورد ارزیابی شامل BAP با شش سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ میلی گرم بر لیتر) و NAA با پنج سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) با ریزنمونه برگ انجام گرفت. برگ‌های استریل بر روی محیط کشت MS دارای ۳ درصد ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸، همراه با غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کشت شدند. بعد از گذشت ۴۰ روز، درصد کالوس‌زایی، وزن تر، قطر کالوس و ویژگی‌های ظاهری آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش دوم (ریزافزایی) با ریزنمونه گره شامل دو فاکتور و چهار تکرار و هر تکرار شامل چهار ریزنمونه انجام شد که فاکتورهای مطالعه شده شامل BAP در چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳ میلی گرم بر لیتر) و IBA در سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر) بود. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS استریل همراه با غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد شامل چهار ریزنمونه قرار گرفتند. کشت‌ها در اتاقک کشت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس 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، میانگین طول شاخه‌ها محاسبه شد.

در ادامه این آزمایش، ریشه‌زایی نمونه‌ها با دو فاکتور IBA و NAA در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) بررسی شد. شاخه‌های باززایی شده به قطعات کوچک‌تر تقسیم و برای القای ریشه در محیط MS دارای غلظت‌های مختلف از دو تنظیم‌کننده رشد IBA و NAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) کشت شدند. پس از یک ماه درصد ریشه‌زایی، میانگین تعداد ریشه و میانگین طول ریشه ارزیابی شد. کلیه آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بود. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج

پینه‌زایی

پس از گذشت یک هفته، ریزنمونه‌های برگ در ترکیب ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA پینه زایی داشتند. در سایر تیمارها به طور میانگین بین ۸ تا ۲۴ روز کالوس زایی دیده شد. ریزنمونه‌ها ابتدا از مقطع برش شروع به تشکیل کالوس‌هایی با رنگ کرم تا سبز روشن کردند که به تدریج گسترده شدند. بعد از گذشت ۴۰ روز سایر صفات نظیر درصد القا کالوس، وزن تر و قطر کالوس‌ها ارزیابی شد. میان این صفات در تیمارهای مختلف اختلافات معنی‌داری دیده 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. براساس نتایج مقایسه میانگین، بهترین تیمار در تمامی صفات بررسی شده ترکیب ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA بوده است که دارای بیش‌ترین درصد القا کالوس (۱۰۰ درصد)، وزن تر (۱/۴۵۷ گرم) و قطر کالوس (۱/۴۵۹ سانتی‌متر) بود (جدول ۱، شکل ۱). بررسی‌ها نشان داد استفاده هم‌زمان 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 میلی گرم 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. ریزنمونه‌های برگ در تمامی 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.

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در کالوس‌زایی آب‌بشقابی.

Table 1. Mean comparison of callogenesis in *Centella asiatica* L.

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Time of beginning callus induction	Callus induction (%)	Fresh wieght (g)	Callus diameter (Cm)
0	0	0±0.00 ^k	0±0.00 ^j	0±0.00 ⁿ	0±0.00 ^o
	0.25	15.5±1.64 ^{ef}	26.66 ±10.32 ^{hi}	0.409±0.023 ^j	0.831±0.047 ^{ijklm}
	0.5	12±2.190 ^d	30 ±10.95 ^{hi}	0.404±0.013 ^j	0.789±0.065 ^m
	1	11.33±2.06 ^{cd}	50 ±10.95 ^{gf}	0.547±0.026 ^{hi}	0.871±0.024 ^{hijkl}
	2	11.33±2.065 ^{cd}	56.66 ±8.16 ^{efg}	0.582±0.018 ^h	0.881±0.030 ^{ghijk}
0.5	0	19.66±2.06 ^{hi}	26.66 ±10.32 ^{hi}	0.251±0.011 ^k	0.608±0.020 ⁿ
	0.25	12.66±2.06 ^d	33.33 ±10.328 ^h	0.685±0.036 ^g	0.906±0.009 ^{efghi}
	0.5	13.33±1.63 ^{de}	33.33 ±10.32 ^h	0.720±0.018 ^{fg}	0.921±0.018 ^{efgh}
	1	8.5±1.64 ^b	66.6 ±10.328 ^{bcde}	0.983±0.035 ^{bcd}	0.980±0.014 ^{cde}
	2	8±1.54 ^b	60 ±17.88 ^{def}	0.971±0.016 ^{bcd}	0.895±0.014 ^{fghi}
1	0	18.33±2.06 ^{hg}	30 ±10.95 ^{hi}	0.117±0.117 ^m	0.805±0.018 ^{klm}
	0.25	12.66±2.06 ^d	30 ±10.945 ^{hi}	0.47±0.045 ⁱ	0.823±0.035 ^{ijklm}
	0.5	8±1.54 ^b	100±0.00 ^a	1.025±0.134 ^{bc}	1.162±0.132 ^b
	1	12.5±2.190 ^d	66.6 ±10.328 ^{bcde}	0.971±0.048 ^{bcd}	0.961±0.043 ^{def}
	2	15.66±1.643 ^{ef}	73.3 ±10.32 ^{bc}	0.968±0.036 ^{cde}	0.953±0.031 ^{defg}
1.5	0	16±1.54 ^{fg}	46.66 ±10.32 ^g	0.210±0.005 ^{kl}	0.869±0.031 ^{hijkl}
	0.25	12±2.190 ^d	46.66 ±10.328 ^g	0.882±0.035 ^e	0.789±0.041 ^m
	0.5	7±0.00 ^a	100±0.00 ^a	1.457±0.051 ^a	1.459±0.192 ^a
	1	9±1.54 ^{bc}	70 ±13.019 ^{bcd}	0.972±0.019 ^{bcd}	1.039±0.102 ^c
	2	15.5±1.64 ^{ef}	76.66 ±8.165 ^b	0.985±0.018 ^{bcd}	0.971±0.024 ^{cdef}
2.5	0	21.33±2.138 ⁱ	26.66 ±10.32 ⁱ	0.12±0.003 ^m	0.796 ±0.012 ^{lm}
	0.25	13.5±3.834 ^{de}	50 ±10.954 ^{gf}	0.787±0.026 ^f	0.823±0.041 ^{ijklm}
	0.5	9.5±1.224 ^{cd}	90±10.95 ^a	1.058±0.308 ^b	1.146±0.133 ^b
	1	12±2.190 ^d	73.3 ±10.32 ^{bc}	0.941±0.017 ^{cde}	0.971±0.027 ^{cdef}
	2	16±1.549 ^{fg}	70 ±10.95 ^{bcd}	0.975±0.015 ^{bcd}	0.964±0.038 ^{cdef}
3.5	0	24.33± 2.943 ^j	30 ± 10.954 ^{hi}	0.128± 0.005 ^{lm}	0.801± 0.014 ^{lm}
	0.25	17.5± 3.834 ^{hgf}	46.66 ± 10.328 ^g	0.781± 0.039 ^f	0.804± 0.025 ^{lm}
	0.5	16.83±3.430 ^{fg}	73.3 ±10.95 ^{bc}	0.931± 0.018 ^{de}	1.029± 0.049 ^{cd}
	1	15.5±1.643 ^{ef}	63.33 ± 8.165 ^{cde}	0.925± 0.022 ^{de}	0.919 ± 0.02 ^{efgh}
	2	19.66 ± 2.065 ^{hi}	66.6 ± 10.32 ^{bcde}	0.907 ± 0.029 ^{de}	0.856± 0.022 ^{hijklm}

حروف غیرمشابه نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون LSD می‌باشد.

Non-similar letters indicate significant difference in the probability level of 1% using LSD.



شکل ۱- پینه های تیمار ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA.
Fig. 1. Callus formation in 1.5 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA.

ریزافزایی

نتایج حاصل از بررسی اثرات متقابل هورمونی بر تکثیر از ریزنمونه گره در کشت درون شیشه نشان داد، دو هورمون BAP و IBA از کارآمدی و اثرگذاری مطلوبی بر شاخه زایی و صفات مطالعه شده در ریزنمونه گره برخوردارند. نتایج تجزیه واریانس حاکی از وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد میان غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد BAP و IBA و اثر آن بر ریزازدیادی آبشقبایی می باشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین های مربوط به اثر متقابل دو هورمون BAP و IBA نشان داد که بالاترین میزان شاخه زایی (۱۰۰ درصد) در غلظت های ۲ و ۳ میلی گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA به دست آمد (جدول ۲). عامل اختلاف در میزان شاخه زایی و صفات ارزیابی شده غلظت و ترکیب تنظیم کننده های رشد به کار رفته بود. در صفات بررسی شده، استفاده ترکیبی از BAP و IBA بهترین نتیجه را داشت. ترکیب ۲ میلی گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA با میانگین ۹/۷۵ شاخه و ۶/۲۷ سانتی متر طول، مناسب ترین محیط در تکثیر و شاخه زایی از ریزنمونه گره بوده است (شکل ۲). در محیط فاقد تنظیم کننده رشد ریزنمونه ها واکنشی نداشته و تکثیر گیاه انجام نشد. در محیط فاقد BAP و دارای IBA ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر شاخه زایی انجام شد اما تعداد و طول شاخه ها نسبت به زمانی که از هر دو هورمون استفاده شد کمتر بود. استفاده همزمان از BAP و IBA سبب افزایش درصد شاخه زایی، تعداد و طول شاخه ها گردید. بهترین محیط تکثیر محیط کشت دارای ۲ میلی گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA بوده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر تکثیر درون شیشه ای ریزنمونه گره در آبشقبایی (*Centella asiatica* L.).

Table 2. Means comparison of the PGRs effects on *in vitro* micropropagation of nodal explants in gotukola (*Centella asiatica* L.).

BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	Shoot induction (%)	Shoot number	Shoot length (cm)
0	0	0±0.00 ^f	0±0.00 ^j	0±0.00 ⁱ
	0.5	31.25±12.50 ^e	1±0.00 ^l	2.25±0.228 ^h
	1	50±0.00 ^d	2±0.00 ^h	3.07±0.095 ^g
1	0	50±0.00 ^d	3±0.00 ^g	3.05±0.12 ^g
	0.5	56.25±12.50 ^d	4±0.00 ^f	3.65±0.30 ^f
	1	75±0.00 ^c	4.25±0.25 ^f	4.025±0.29 ^e
2	0	50±0.00 ^d	5±0.00 ^e	4.75±0.29 ^d
	0.5	75±0.00 ^c	6.25±0.50 ^c	4.725±0.17 ^d
	1	100±0.00 ^a	9.75±0.57 ^a	6.275±0.24 ^a
3	0	75±0.00 ^c	5.5±0.51 ^d	5.312±0.24 ^{bc}
	0.5	87.5±14.43 ^b	6.5±0.5 ^c	5.42±0.26 ^b
	1	100±0.00 ^a	8±0.00 ^b	5.125±0.15 ^c

حروف غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون LSD می باشد.

Non-similar letters indicate significant difference in the probability level of 1% using LSD.



شکل ۲- تکثیر از ریزنمونه گره در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA.

Fig. 2. Micropropagation on nodal explants in the MS medium with 2 mg/L BAP + 1 mg/L IBA.

ریشه زایی

در این پژوهش اثر دو نوع تنظیم کننده رشد گیاهی از گروه اکسین IBA و NAA بر ریشه زایی شاخه های تشکیل شده در شرایط درون شیشه ای بررسی شد. نتایج نشان داد اثرات این تنظیم کننده های رشد بر همه صفات مورد مطالعه در سطح ۱٪ معنی دار است. در تمامی محیط کشت هایی که از اکسین استفاده شد ریشه زایی رخ داد، اما در مقایسه بین دو نوع اکسین به کار رفته IBA نقش موثرتری در ریشه زایی داشت و استفاده از آن در سطح ۱ میلی گرم بر لیتر بالاترین درصد، تعداد و طول ریشه را داشت که البته در صفات درصد و تعداد ریشه با غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر تفاوتی نداشت و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۳). استفاده از IBA در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر به ترتیب با میانگین ریشه زایی ۱۰۰ درصد، تعداد ریشه ۲۱/۷۵ و طول ریشه ۱۰/۶۲ سانتی متر نقش موثرتری در القا ریشه زایی و صفات بررسی شده نشان داد. در میان غلظت های مختلف از دو نوع اکسین به کار رفته IBA برتری نسبت به NAA داشته و در حضور اکسین در محیط کشت ریشه زایی در تمامی تیمارها دیده شد. در محیط فاقد اکسین ریشه زایی مشاهده نشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین IBA و NAA در صفات مربوط به ریشه زایی درون شیشه ای آبشقای (*Centella asiatica* L.).

Table 3. Means comparison of IBA and NAA on *in vitro* rooting parameters of gotu kola (*Centella asiatica* L.).

Auxin	concentration	Root induction	Root number	Root length
IBA	0	0±0.00 ^e	0±0.00 ^d	0±0.00 ^f
	0.5	62.5±14.43 ^b	12.5±3.31 ^b	6.6±0.25 ^c
	1	100±0.00 ^a	21.75±2.08 ^a	10.62±5.02 ^a
	2	100±0.00 ^a	19.25±2.21 ^a	9.47±6.84 ^b
NAA	0	0±0.00 ^e	0±0.00 ^d	0±0.00 ^f
	0.5	25±0.00 ^d	4.25±0.5 ^c	4.37±0.31 ^e
	1	43.75±12.5 ^c	6.5±0.57 ^c	5.37±0.55 ^d
	2	75±20.41 ^b	11.75±1.25 ^b	9.08±0.53 ^b

حروف غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون LSD می باشد.

Non-similar letters indicate significant difference in the probability level of 1% using LSD.



شکل ۳- a: ریشه‌زایی در محیط MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر IBA و b: در محیط حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر NAA.
Fig. 3. a: Rooting in MS medium with 1 mg/L IBA and b: 2 mg/L NAA.

بحث

بررسی تشکیل کالوس روی ریزنمونه‌های اولیه نشان می‌دهد که پاسخ‌دهی در محیط‌های کشت مختلف متفاوت است. به‌طور کلی، همه ریزنمونه‌های کشت شده در محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کالوس ایجاد کردند، ولی نوع کالوس ایجاد شده براساس وزن، قطر، رنگ و شکنندگی متفاوت بود. نتایج این تحقیق نشان داد حضور دو تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین و اکسین برای کالوس‌دهی مطلوب در گیاه آب‌بشقابی ضروری می‌باشد. در مطالعات پیشین درباره نقش موثر BAP و NAA در کالوس‌زایی آب‌بشقابی و دیگر گیاهان دارویی اشاره شده است (Bibi *et al.*, 2012, Bonfill *et al.*, 2011 & Habibiseilabi *et al.*, 2020). طبق نتایج به‌دست آمده بهترین کالوس‌دهی در ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA بود. نکته قابل توجه در استفاده از سطوح مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نوع ریزنمونه به‌کار رفته است. به‌طور کل بسته به گونه گیاهی، نوع و سن ریزنمونه‌های مورد استفاده غلظت به خصوصی از این تنظیم‌کننده‌های رشد بیش‌ترین تاثیر را در کالوس‌زایی نشان می‌دهد (Abbasi *et al.*, 2007). در این گزارش با توجه به این که از ریزنمونه برگ استفاده گردید ترکیب ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر NAA بهترین نتیجه را نشان داد، استفاده از سطوح بالاتر BAP (۳/۵ میلی گرم بر لیتر) و NAA (۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) زمان القا کالوس را به‌طور میانگین بین ۱۷ تا ۲۴ روز افزایش داد. همچنین با افزایش میزان اکسین از ۰/۵ به ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر درصد و میزان کالوس‌زایی کاهش معنی‌داری پیدا کرد که منجر به تولید کالوس‌هایی به‌رنگ قهوه‌ای گردید. عدم حضور اکسین و نسبت بالاتر اکسین به سیتوکینین در محیط کشت نیز تولید کالوس را محدود کرده و سبب تشکیل کالوس‌هایی ریز گردید. پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه به کالوس‌دهی در غلظت‌های مختلف هورمونی به‌دلیل غلظت متفاوت از سطوح درونی اکسین و سیتوکینین است که در ارتباط با اثرات ژن‌ها به آغاز تمایز یابی در سلول‌هاست (Akbas *et al.*, 2009).

در پژوهش حاضر برهمکنش سیتوکینین و اکسین بر کالوس‌زایی در صفات بررسی شده موثرتر عمل کرده و وزن و قطر کالوس‌ها در غلظت مناسب از این دو هورمون افزایش یافته است. در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر ریزازدیادی گیاه دارویی آب‌بشقابی در شرایط کشت درون شیشه بررسی شد. نتایج نقش موثر دو تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین و اکسین را در تکثیر و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گره در آب‌بشقابی نشان داده است. بین اثر غلظت‌های مختلف این تنظیم‌کننده‌های رشد، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته و مناسب‌ترین محیط در تکثیر ریزنمونه گره محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA بوده است که با نتایج گزارش Shashikala و همکاران (2005) که از ترکیب ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی گرم بر لیتر NAA استفاده نمودند مطابقت می‌نماید. استفاده هم‌زمان از BAP و IBA در غلظت‌های مناسب نقش موثری در افزایش طول و تعداد شاخه‌های تولید شده داشت. مطالعات انجام شده درباره اثرات

تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی بر ریزازدیادی حاکی از تاثیر بیشتر و بهتر BAP در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه بوده که تاکید بر نتایج به‌دست آمده است (Gandi and Giri, 2013). نکته مهم در استفاده از هورمون سیتوکینین غلظت به‌کار رفته آن است که می‌تواند نتایج متفاوتی نشان دهد و مطابق نتایج این تحقیق، غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر آن توصیه می‌شود، افزایش غلظت آن به ۳ میلی گرم بر لیتر سبب کاهش تعداد و طول شاخه گردید. سیتوکینین باعث تقسیم سلولی، حفظ پروتئین‌ها و کلروفیل می‌شود، در نتیجه با کاربرد بهینه BAP می‌توان گیاهچه‌هایی با کیفیت بالا به‌دست آورد، اما افزایش غلظت BAP از افزایش تعداد و رشد طولی شاخساره‌ها جلوگیری کرد. به‌طور کل سیتوکینین نقش ضروری در تقسیم سلولی دارد و در القا شاخه‌زایی مستقیم و غیرمستقیم بسیار موثر است (Gandi and Giri, 2013).

استفاده از سیستم تکثیر تک مرحله‌ای از طریق ریزنمونه گره و نیز پرهیز 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 به خوبی طی کند. می‌توان گفت که غلظت بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار گرفته شده بیش‌ترین تاثیرگذاری را بر چگونگی عملکرد و واکنش هورمون‌های درونی دارد. باززایی و ایجاد ساقچه به‌طور معمول به تیمار همزمان اکسین و سیتوکینین نیاز دارد. مطالعات انجام شده توسط Siddiqui و همکاران (2019) نشان داد بهترین القا شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA در ریزنمونه گره به‌دست آمده اما در گزارش پیش رو با افزایش BAP و IBA، به ترتیب در غلظت‌های ۲ و ۱ میلی گرم بر لیتر در مدت زمانی کوتاه تکثیر و تشکیل نوشاخه‌ها در مقدار قابل قبولی دیده شد. هم‌چنین اشاره شد برای ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف اکسین‌های IBA و NAA استفاده کردند که غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر از IBA نقش موثری در القا ریشه با نسبت ۹۵ درصد داشته است اما در این گزارش غلظت‌های بالاتر از IBA (۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) بالاترین میزان ریشه‌زایی را داشت. پیش از این Ghadirisardrood و همکاران (2019) نیز در ریزازدیادی از ریزنمونه گره در آب‌بشقابی به نقش موثر هورمون BAP در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر و IBA در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر لیتر برای استقرار اولیه ریزنمونه‌ها اشاره نمودند که بعد حدود یک ماه در تیمارهای مختلف شاخه‌زایی قرار گرفتند و بهترین محیط ترکیبی از ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BAP و 2ip همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA بود. حال آن که در گزارش پیش رو با ترکیبی از یک نوع سیتوکینین BAP در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر و IBA در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر شاخه‌زایی و تکثیر طی مدت ۴ هفته انجام شد.

در زمینه تاثیرات اکسین بر ریشه‌زایی گیاهان مختلف پژوهش‌های زیادی انجام شده است. در مطالعات ریشه‌زایی در کشت درون شیشه‌ای معمولاً از تنظیم‌کننده‌های رشد گروه اکسین استفاده می‌شود. بیشترین اکسین مورد استفاده در ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای IBA و NAA می‌باشد که باعث تقسیم سلولی، طویل شدن و رشد سلولی شده و تشکیل ریشه‌ها را تحریک می‌کنند (Jiang et al., 2015). اکسین، تنظیم‌کننده رشد ضروری برای ریشه‌زایی در اکثر گیاهان کشت بافتی است که نوع و غلظت‌های مختلف از آن می‌تواند اثرات متفاوتی بر میزان ریشه‌دهی، تعداد و طول آن داشته باشد. در این پژوهش هر دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و NAA در ریشه‌زایی موثر بوده که IBA در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر بالاترین درصد، طول و تعداد ریشه را داشت. با استفاده از IBA ۱ میلی گرم بر لیتر افزایش قابل توجهی در کیفیت و درصد ریشه‌زایی دیده شد و با نتایج Joshi و همکاران (2013) که بر نقش موثر IBA در ریشه‌زایی ریزنمونه‌های باززایی شده آب‌بشقابی اشاره داشتند، هم‌راستاست. هم‌چنین، Kumar (2017) نیز اشاره داشتند محیط کشت MS همراه با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA مناسب‌ترین محیط در القا و توسعه ریشه‌ها در آب‌بشقابی بود که با نتایج این گزارش کاملاً مطابقت دارد.

به‌طور کلی، اثر مثبت اکسین بر ریشه‌زایی احتمالاً به این خاطر است که اکسین حمل کربوهیدرات‌ها و سایر مواد غذایی را برعهده داشته و به طبع با تحریک تقسیم و طویل شدن 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 هورمون BAP در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر در ترکیب با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA توانست محیط کشت مناسبی در تکثیر از ریزنمونه گره باشد که این می‌تواند به دلیل تقسیم سلولی مناسب در این ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد باشد که سبب جذب آب، مواد کربوهیدراتی و معدنی به مقدار لازم شده است. در نتیجه گیاهچه‌های حاصل شده کیفیت و شکل ظاهری بهتری را داشتند. در ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولیدی IBA در غلظت ۱ میلی گرم 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 درون‌شیشه‌ای است.

نتیجه‌گیری

بر پایه یافته‌های این پژوهش، ریزنمونه برگ در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA، بهترین نتیجه را در پینه زایی آب‌بشقابی داشته است. این دو تنظیم‌کننده رشد، تاثیر مطلوبی در انگیزش، رشد و توسعه پینه‌ها داشتند. یافته‌های این پژوهش نشان داد ریزافزایی گیاه آب‌بشقابی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای با ریزنمونه گره، با موفقیت امکان‌پذیر است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، می‌توان با استفاده از مناسب‌ترین تیمارهای تعیین شده در افزایش درون‌شیشه‌ای، از آن‌ها برای ادامه پژوهش‌ها در رابطه با کشت بافت آب‌بشقابی مانند دست‌یابی به ترکیبات گوناگون موجود در پینه، برگ‌ها و گیاه کامل و نیز تنوع سوماکلونال کشت بافتی برای گزینش گیاهان با عملکرد بالای مواد موثره، مورد استفاده قرار داد.

منابع

- Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.Z. (2007). Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. *In Vitro CellUlar Development Biology-Plant*, 43, 481-492.
- 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 endangered medicinal plant *Centella asiatica* through plant tissue culture. *Drug Invention Today*, 2(1), 17-21.
- Bibi, Y., Zia, M., Nisa, S., Habib, D. and Waheed, A. and Chaudhary, M. (2012). Regeneration of *Centella asiatica* plants from non-embryogenic cell lines and evaluation of anti-bacterial and anti-fungal properties of regenerated calli and plants. *Journal of Biological Engineering*, 5, 13-18.
- Bonfill, M., Mangas, S., Moyano, E., Cusido, R.M. and Palazon, J. (2011). Production of centelloside and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 104, 61-67.
- Farukhhsan, M.D. and Rahman, M. (2008). Micropropagation of *Centella asiatica* L. An important medicinal herb. *Agriculture*, 19(2), 51-56.
- 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. (In Persian).
- Gruenwald, J., Brendler, A. and Jaenicke, C. (2000) PDR for Herbal Medicine. 2th Edition. Medical Economics Co. Montvale New Jersey, pp:729-31.
- 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.
- Habibiseilabi, M.V., Hamidoghli, Y. and Sahraro, A. (2020). Micropropagation of Gotu Kola (*Centella asiatica* L.) via runner tip culture. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 21(3), 309-318.
- 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.) Urban: 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.
- 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. (In Persian).
- Sharafi, A., Hashemi Sohi, H. and Jourabchi, E. (2008). Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L. *Journal of Environmental Research*, 21, 565-573. (In Persian).

- 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. *Engineer Life Science*, 6, 597-601.
- Suathian, T., Musa, R., Ariff, A. and 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(4), 284-299.
- Sweetman, S.C. (2002). Martindale: The complete drug reference. *Pharmaceutical press*, p: 1112.
- Zhang, L., Jiarong. L., Hogan, S., Chung, H., Gregorg, E. and Zhou, W.K. (2010). Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 11(9), 592-599.

Impact of Auxin and Cytokinin on *in vitro* Culture of Asiatic Gotu Kola [(*Centella asiatica* (L.)) Urban

Fereshteh Heidargholinezhad¹, Yousef Hamidoghli^{2*}, Valiollah Ghasemiomran³, Pouria Biparva⁴

1. Breeding and Biotechnology of Horticultural Products, Guilan University, Rash, Iran.

2. Horticulture Department of 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.

Corresponding Author, Email: (y.hamidoghli@yahoo.com)

Gotu Kola (*Centella asiatica* L.) has been listed in threatened species in Iran. It has been used for treatment of a wide number of health disorders. The herb was used for wound healing, anticarcinogenic, mental illness and revitalizing the nerves and brain cells. *In vitro* culture and micropropagation are basic tools for conserving this medicinal plant. The purpose of this study is to achieve a suitable protocol for propagation of this plant in *in vitro*. In the first experiment, interaction of different concentrations of BAP (0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5 mg l⁻¹) and NAA (0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg l⁻¹) were examined on leaf explants. The results of the callogenesis experiment showed that MS medium with 1.5 mg l⁻¹ BAP and 0.5 mg l⁻¹ NAA, produced the best callus. In the next step, the interaction of BAP at 0, 1, 2, 3 mg l⁻¹ and IBA at 0, 0.5, 1 mg l⁻¹ was investigated in proliferation of node explants. Rooting of amplified explants was investigated by using two types of auxin IBA and NAA. The results of the micropropagation experiment indicated that MS medium of 2 mg l⁻¹ BAP and 1 mg l⁻¹ IBA was determined the most suitable medium for micropropagation. In the comparison of the effect of auxin treatments in MS medium on rooting, MS medium supplemented with IBA 1 and 2 mg l⁻¹ were chosen as the best rooting treatment.

Keywords: Callus induction, Gotucola, Medicinal plant, Micropropagation, Tissue culture.