مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۵ شماره ۱ صفحه های ۱۱۹ تا ۱۲۸ (۱۴۰۳)
مقاله پژوهشی

تاثیر 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 علوم‌پایه 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 ویژگی های درمانی گوناگونی مانند درمان زخم، ضد سرطان، بهبود اعصاب و حافظه می‌باشد. با توجه به ارزش بالای آب‌بشقابی، می‌توان از کشت درون‌شیشه‌ای 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.

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

مقدمه

آب‌بشقابی با نام علمی (*Centella asiatica* L.) از خانواده چتریان[۱]گیاهی چند ساله، علفی، پایا، رونده، در محل بندها ریشه‌زا، نیمه‌آبزی و رونده در حاشیه آب است. اغلب در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و مرطوب در ارتفاع ۰ تا ۲۰۰۰ متر رویش دارد. این گیاه نم‌روی 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]، سنتللوزید[۵]، مادکاسوزید[۶]، براهموزید[۷]، براهمینوزید[۸])،

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

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

مادکاسسیک اسید[9]، آسیاتیک اسید[10]، اسیدهای چرب، آمینواسیدها، فیتواسترول و تانن می‌باشد (Gruenwald *et al*., 2000). ترکیبات اصلی آن، آسیاتیک اسید، مادکازیک اسید و سایر مشتقات گلیکوزیدهای تری‌ترپنی، آسیاتیکوزید و مادکاسوزید می‌باشد که دارای خواص دارویی می‌باشند (Sweetman, 2000). از این گیاه در درمان آسم، برونشیت، مشکلات کلیه، بیماری‌های پوستی و هم‌چنین در بهبود حافظه، افزایش قدرت یادگیری، ضدسرطان و کاهنده فشارخون استفاده می‌شود (Gupta *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 درون شیشه‌ای به عنوان ابزاری توانمند برای مطالعات کاربردی و تجاری، شناخته می‌شود (Akbas *et al*., 2009). با روش کشت درون‌شیشه‌ای می‌توان در مورد اصلاح گیاهان دارویی و یا بهبود در میزان متابولیت‌های ثانویه اقدام نمود (Nourafcan *et al*., 2008). از بافت پینه (کالوس) برای افزایش گیاهان، انتقال‌ژن به گیاه و هم‌چنین تولید متابولیت‌های‌ثانویه و سایر ترکیبات مفید می‌توان 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 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. افزایش درون شیشه‌ای دارای پتانسیل بالقوه در تولید گیاهان دارویی با کیفیت بالا می‌باشد که این مهم، می‌تواند به شیوه های گوناگون ریزافزایی به‌دست آید. با وجود ترکیبات با ارزش در گیاه آب‌بشقابی، بهینه‌سازی کشت درون شیشه‌ای، افزایش ترکیبات دارویی و اصلاح صفات آن باید مورد توجه قرار گیرد. ریزازدیادی در گونه‌های متنوعی از گیاهان دارویی و از جمله آب‌بشقابی نتایج مطلوبی نشان داده است (Nath and Buragoharin, 2005 & Sivakumar *et al*., 2006).

با توجه به این که آب‌بشقابی جز گیاهان با خواص دارویی ارزشمند است، ارزیابی کشت درون‌شیشه‌ای آن به منظور تولید کالوس و ریزازدیادی برای حفظ این گونه ارزشمند و در معرض انقراض، ضروری است. تولید پینه، باززایی و ایجاد ساقه‌های جدید به‌طور معمول به تیمار همزمان اکسین و سیتوکنین نیاز دارد و این دو تنظیم‌کننده رشد، از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان هستند. توازن بین اکسین و سیتوکنین تولید اندام هوایی و ریشه‌ها را سبب می‌شود. گرچه میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد. اندام‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای 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*., 2013).

در گزارشی در گیاه آب‌بشقابی از ریزنمونه برگ در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوک (MS) و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین (BA)، نفتالین استیک اسید (NAA) و توفوردی (2,4-D) استفاده گردید. نتایج نشان داد مناسب‌ترین پینه زایی در محیط دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و NAA به‌دست آمد. پینه ها بپس از ۳۵ روز دارای رنگ سبز و بافتی تُرد بودند (Nath and Buragohain, 2005). در بررسی پینه‌زایی 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 پینه انگیزی (۹۲٪) بوده است (Bangaru *et al*., 2010). در بررسی اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر کالوس و کشت سوسپانسیون‌سلولی آب‌بشقابی، بالاترین میزان القا کالوس (۸۷/۶۷٪) با ریزنمونه برگ در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D دیده شد و از طرفی بالاترین بیوماس 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). برای پرآوری آب‌بشقابی در محیط کشت MS از ریزنمونه نوک‌رونده همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA 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 (Farukhhsan *et al*., 2008). در باززایی آب‌بشقابی از کالوس‌های به‌دست آمده در محیط MS همراه با BAP و kin ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر بعد از گذشت ۶ هفته، شاخه‌های متعددی تشکیل گردید. برای ریشه‌زایی شاخه‌ها از محیط‌کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA استفاده شد (Bangaru *et al*., 2010). در باززایی آب‌بشقابی از کالوس‌ها بالاترین تعداد شاخه در محیط MS همراه با ۵/۳۷ میکرومولار NAA و ۴/۴۲ میکرومولار BA با ۱۰ شاخه در هر کالوس به‌دست 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

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

گیاه آب‌بشقابی از ریزنمونه گره همراه با غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP و kin در ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر استفاده گردید. بالاترین درصد القا شاخه (۹۰ درصد) 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 القا ریشه را طی ۴ هفته داشت و ۱۶ ریشه در هر شاخه به‌دست آمد (Singh *et al*., 2014).

بهینه‌سازی فرآیند تولید گیاه آب‌بشقابی با استفاده از روش‌های مختلف مانند باززایی مستقیم و غیرمستقیم می‌تواند برای انجام پژوهش های 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 کشت‌بافت آب‌بشقابی به‌منظور 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 میلی‌گرم بر لیتر) و NAA با پنج سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر) و IBA در سه سطح (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم 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 نورسفید 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 کاملا 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

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

پس از گذشت یک هفته، ریزنمونه‌های‌برگ در ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیترNAA پینه زایی داشتند. در سایر تیمارها به‌طور میانگین بین ۸ تا ۲۴ روز کالوس‌زایی دیده‌شد. 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 میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم 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 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. 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.

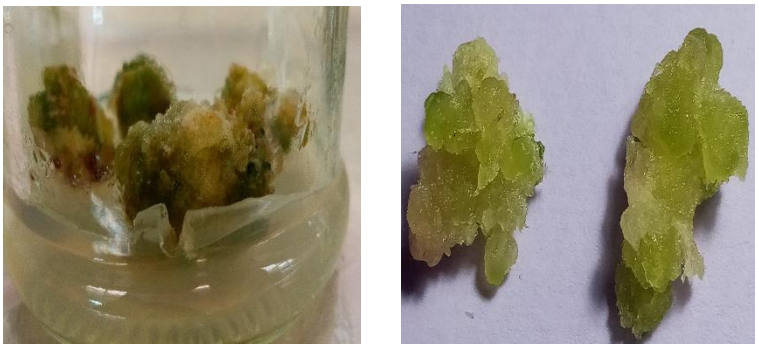
Table 1. Mean comparison of callogenesis in *Centella asiatica* L.

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 ^{jklm}
	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 ^{jklm}
	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.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

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



شکل ۱- پینه های تیمار ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم 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 شاخه‌زایی و صفات مطالعه شده در ریزنمونه گره برخوردارند. نتایج تجزیه واریانس حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد میان غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و IBA و اثر آن بر ریزازدیادی آب‌بشقابی می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرمتقابل دو هورمون BAP و IBA نشان داد که بالاترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) در غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد (جدول ۲). عامل اختلاف در میزان شاخه‌زایی و صفات ارزیابی شده غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد به‌کار 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 ۹/۷۵ شاخه و ۶/۲۷ سانتی‌متر طول، مناسب‌ترین محیط در تکثیر و شاخه‌زایی از ریزنمونه گره بوده است (شکل ۲). در محیط فاقد تنظیم‌کننده رشد ریزنمونه‌ها واکنشی نداشته و تکثیر گیاه انجام نشد. در محیط فاقد 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 هورمون استفاده شد کمتر بود. 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 بوده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تکثیر درون‌شیشه‌ای ریزنمونه گره در آب‌بشقابی (*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]

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

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 ۲- تکثیر از ریزنمونه گره در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA.
Fig. 2. Micropropagation on nodal explants in the MS medium with 2 mg/L BAP + 1 mg/L IBA.

ریشه‌زایی

در این پژوهش اثر دو نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی از گروه اکسین IBA و NAA بر ریشه‌زایی شاخه‌های تشکیل شده در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد اثرات این تنظیم‌کننده‌های رشد بر همه صفات مورد مطالعه در سطح ۱٪ معنی‌دار است. در تمامی محیط کشت‌هایی که از اکسین استفاده شد ریشه‌زایی رخ داد، اما در مقایسه بین دو نوع اکسین به‌کار رفته IBA نقش موثرتری در ریشه‌زایی داشت و استفاده از آن در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر بالاترین درصد، تعداد و طول ریشه را داشت که البته در صفات درصد و تعداد ریشه با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر تفاوتی نداشت و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۳). استفاده از IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب با میانگین ریشه‌زایی ۱۰۰ درصد، تعداد ریشه ۲۱/۷۵ و طول ریشه ۱۰/۶۲ سانتی‌متر نقش موثرتری در القا ریشه‌زایی و صفات بررسی شده نشان داد. در میان غلظت‌های مختلف از دو نوع اکسین به‌کار رفته IBA برتری نسبت به NAA داشته و در حضور اکسین در محیط کشت ریشه‌زایی در تمامی تیمارها دیده شد. در محیط فاقد اکسین ریشه‌زایی مشاهده نشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین IBA و NAA در صفات مربوط به ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای آب‌بشقابی (*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 معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در آزمون LSD می‌باشد.
Non-similar letters indicate significant difference in the probability level of 1% using LSD.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

شکل3- a: ریشه‌زایی در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و b: در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم 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. به‌طورکلی، 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 سیتوکنین 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 محیط‌کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. نکته قابل‌توجه 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 این‌که 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 به‌طور 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 به‌رنگ 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 به‌دلیل غلظت متفاوت از سطوح درونی اکسین و سیتوکنین است که در ارتباط با اثرات ژن‌ها به آغاز تمایزیابی در سلول‌هاست (Akbas *et al*., 2009).

در پژوهش 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. 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 میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA بوده است که با نتایج گزارش Shashikala و همکاران (2005) که از ترکیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم 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

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکنینی بر ریزازدیادی حاکی از تاثیر بیشتر و بهتر BAP در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه بوده که تاکیدی بر نتایج به‌دست آمده است (Gandi and Giri , 2013). نکته مهم در استفاده از هورمون سیتوکنین غلظت به‌کار رفته 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. سیتوکنین باعث تقسیم‌سلولی، حفظ پروتئین‌ها و کلروفیل می‌شود، درنتیجه 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 سیتوکنین 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 سیتوکنین 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 ساقه‌چه به‌طور معمول به تیمار همزمان اکسین و سیتوکنین نیاز دارد. مطالعات انجام شده توسط Siddiqui و همکاران (2019) نشان داد بهترین القا شاخه در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP همراه با ۰/۱ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر و IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر BAP و 2ip همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. حال آن که در گزارش پیش رو با ترکیبی از یک نوع سیتوکنین BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم 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 معمولا 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 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 (2013) که بر نقش موثر IBA در ریشه‌زایی ریزنمونه‌های باززایی شده آب‌بشقابی اشاره داشتند، همراستاست. همچنین، Kumar (2017) نیز اشاره داشتند محیط‌کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مناسب‌ترین محیط در القا و توسعه ریشه‌ها در آب‌بشقابی بود که با نتایج این گزارش کاملا مطابقت دارد.

به‌طور کلی، اثر مثبت اکسین بر ریشه‌زایی احتمالا به این خاطر است که اکسین حمل کربوهیدرات‌ها و سایر مواد غذایی را برعهده داشته و به طبع 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 هورمون BAP در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۱ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر بهترین نتیجه را در ریشه‌زایی داشت. این پژوهش

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

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 یافته های 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 پینه ها 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 endagered 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).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

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 Biotechno;ogy*, *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 rasberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, *11*(9), 592-599.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 25 (1): 119-128 (2024)
Research article

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

Fereshteh Heidargholinezhad[1], Yousef Hamidoghli[2*], Valiollah Ghasemiomran[3], Pouria Biparva[4]

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 mgl^{-1}) and NAA (0, 0.25, 0.5, 1, 2 mgl^{-1}) were examined on leaf explants. The results of the callogenesis experiment showed that MS medium with 1.5 mgl^{-1} BAP and 0.5 mgl^{-1} NAA, produced the best callus. In the next step, the interaction of BAP at 0, 1, 2, 3 mgl^{-1} and IBA at 0, 0.5, 1 mgl^{-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 mgl^{-1} BAP and 1 mgl^{-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 mgl^{-1} were chosen as the best rooting treatment.

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

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-07-08]