مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۱ شماره ۳ صفحه‌های ۳۰۹ تا ۳۱۸ (۱۳۹۹)
مقاله پژوهشی

ریزافزایی گیاه آب‌بشقابی با کشت نوک روندک[1]

Micropropagation of Gotu Kola (*Centella asiatica* L.) via Runner Tip Culture

محمدولی حبیبی سیلابی، یوسف حمیداوغلی* و امیر صحرارو[2]

چکیده

گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) از دسته گیاهان با ارزش دارویی است که گوناگونی زیستی آن به‌دلیل کاهش آب‌های سطحی و محدودیت منطقه‌های پراکنش با خطر نابودی در دنیا رو به رو می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش معرفی یک پروتکل کشت درون‌شیشه‌ای برای افزایش سریع گیاه آب‌بشقابی بود. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین (BA) شامل صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و نفتالن استیک اسید (NAA) شامل صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بر پینه‌زایی ریزنمونه‌های نوک روندک این گیاه بررسی شد. بهترین پینه‌زایی با بیشینه درصد انگیزش (۸۳/۳۳٪)، وزن تر (۴/۲۶ گرم) و نرخ رشد روزانه پینه (۰/۱۳ گرم در روز) با کاربرد ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. برای شاخساره‌زایی، غلظت‌های مختلف BA (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱ میلی‌گرم درلیتر) به کار برده شد. بیشترین درصد شاخساره‌زایی (۷۴/۹۹٪)، شمار شاخساره در هر پینه (۷/۶۶)، شمار دمبرگ در هر شاخساره (۶/۸۶) و طول شاخساره (۱/۵۶ سانتی‌متر) در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. برای ریشه‌زایی، شاخساره‌ها در محیط کشت دارای ایندول‌بوتیریک اسید (IBA) با غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۴/۶۶٪)، بیشترین شمار ریشه در هر گیاهچه (۱۵)، بلندترین طول ریشه (۸/۳۳ سانتی‌متر) و هم‌چنین بالاترین درصد زنده‌مانی (۷۴/۹۹٪) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، پینه‌زایی، سایتوکاینین، کشت بافت گیاهی، گیاهان دارویی.

مقدمه

گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.)، یک گیاه ارزشمند دارویی از تیره چتریان[3] است. این جنس شامل ۵۰ گونه است که در سراسر کشورهای دارای اقلیم گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند بنگلادش، هند و سریلانکا گسترش یافته است و با نام‌های Gotu kola و Urban نیز شناخته می‌شود (۱۹). با توجه به منابع موجود، گزارش‌های پژوهشگران و نمونه‌های هرباریومی، این گونه در ایران در تالاب انزلی پراکنش دارد (۲۵،۱۰). این گیاه دارای ویژگی‌های درمانی بسیاری است و در طول تاریخ از آن برای درمان بیماری‌های آسم، برونشیت، صرع، تب و اسهال استفاده شده است (۹). درمانگران امروزی از این گیاه برای درمان اضطراب، تقویت حافظه، پایین آوردن فشار خون و بی‌خوابی استفاده می‌کنند (۱۳). هم‌چنین ویژگی‌های ضد باکتری، ضد قارچی، ضد انعقاد و بهبود زخم آن گزارش شده است (۱۹). آب‌بشقابی گیاهی چندساله و همیشه‌سبز است که دارای ساقه‌های رونده بوده و در محل گره‌ها ریشه‌زا است. برگ‌ها کلیوی شکل و در سطح رویی کرکدار و دارای ۷ تا ۹ رگبرگ می‌باشند. گل‌ها

۱- تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۴/۵

۲- به‌ترتیب دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳-Apiaceae (Umbelliferae)

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (hamidoghli@guilan.ac.ir).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

سفید تا متمایل به صورتی، گل‌آذین چتری شامل ۲ تا ۴ گل، دوپایه و دارای دمگل کوتاه است. میوه‌ها قهوه‌ای و پره‌دار بوده و زمان گل‌دهی آن اردیبهشت و خرداد و زمان میوه‌دهی آن تیر و مرداد می‌باشد (۴، ۱۵). گیاه آب‌شقابی دارای ماده‌های موثره و ترکیب‌های بسیاری شامل گلیکوزیدهای مختلف، ترپنوئیدها (ماداکاسیک اسید[۱] آسیاتیاکوزید اسید[۲] و ماداکازوئید[۳])، فلاونوئیدها (کوئرسین[۴] و کامپفرول[۵]) و تانن است (۴).

کاربرد روش‌های کارآمد مانند ریزافزایی برای سرعت بخشیدن به افزایش هم‌گروه‌های برتر و حفاظت از آن‌ها دارای اهمیت است. فنون کشت درون‌شیشه‌ای می‌توانند نقش مهمی در گسترش همگروه‌های برتر و حفاظت از ژرم‌پلاسم آب‌شقابی داشته باشند (۲۶). در همین راستا پژوهشی توسط Das و همکاران (۲) روی ریزافزایی گیاه آب‌شقابی با کشت نوک شاخساره انجام گرفت که در آن بیشترین درصد شاخساره‌زایی (۷۶/۶۷٪) و بیشترین شمار شاخساره در هر ریزنمونه روی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS)[۶] دارای ۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA)[۷] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن‌استیک اسید (NAA)[۸] به دست آمد. هم‌چنین، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۰٪) در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک اسید (IBA)[۹] مشاهده شد. در بررسی پینه‌زایی برگ آب‌شقابی، بیشترین درصد پینه‌زایی (۷۳٪) روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4-D)[۱۰] به دست آمد (۱۳). آزمایش دیگری توسط Joshi و همکاران (۱۱) روی ریزافزایی آب‌شقابی با کاربرد ساقه و برگ انجام شد. بیشترین درصد پینه‌زایی برگ (۷۵٪) و ساقه (۸۳/۳۳٪) در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش شد. بهترین غلظت برای شاخساره‌زایی از پینه برگ، محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و برای پینه ساقه، محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بود. همچنین، بیشترین میزان ریشه‌زایی در ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در محیط کشت MS به دست آمد.

افزایش گیاه آب بشقابی از راه بذر بسیار دشوار است، زیرا قوه نامیه بذر بسیار پایین است. هم‌چنین افزایش رویشی این گیاه پرهزینه و زمان بر است (۳). با توجه به ارزش دارویی گیاه آب‌شقابی، درخواست برای این گیاه روز به روز رو به افزایش است. در سال‌های گذشته، به دلیل برداشت بی‌رویه، افزایش نیاز صنایع داروسازی، کاهش آب‌های سطحی، استفاده بیش از حد از سم‌ها و آفت‌کش‌ها، محدودیت پراکنش و نبود تلاش کافی برای نجات این گیاه، ذخیره گیاهی آب‌شقابی در طبیعت به سرعت کاهش یافته به طوری که نام این گیاه در اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت و منابع ملی (IUCN) در فهرست گیاهان رو به رو با خطر نابودی قرار گرفته است (۱۳). ریزافزایی یکی از روش‌های حفظ و نگهداری گیاهان رو به رو با خطر نابودی است (۱۶). از این رو در سال‌های گذشته، کاربرد فنون کشت درون‌شیشه‌ای برای افزایش سریع این گیاه گسترش یافته است. در این پژوهش نوک روندک برای ریزافزایی گیاه آب‌شقابی به کار برده شد. نوک روندک به دلیل داشتن بافت مریستمی رشد سریع‌تری داشته و مهار آلودگی آن ساده‌تر است.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه و گندزدایی

در این پژوهش گیاهان آب‌شقابی کشت شده از طریق غیرجنسی در گلخانه آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان به عنوان گیاهان مادری به کار رفتند و قطعه‌های نوک روندک به عنوان منبع ریزنمونه برای ریزافزایی آب‌شقابی به کار برده شد. روندک‌های به طول ۵ تا ۶ سانتی‌متر از گیاه مادری جدا شده و بی‌درنگ برای گندزدایی به آزمایشگاه منتقل شدند. نخست، نمونه‌های گیاهی با آب و مایع ظرفشویی شسته شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند. پس از آن، بافت گیاهی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه زیر هود لامینار گندزدایی شدند. سپس، نمونه‌ها برای سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر گندزدایی شده آبشویی شدند.

مراحل پینه‌زایی

۱- Madecassic acid ۲- Asiaticoside acid ۳- Madecassoside ۴- Quercetin ۵- Kaempferol
۶- Murashige and Skoog ۷- 6- Benzyl adenine ۸- Naphthalene Acetic acid ۹- Indole-3-butyric acid
۱۰- 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

پس از گندزدایی، نوک ساقه‌های رونده به اندازه ۴ تا ۵ میلی‌متر برش داده شدند و روی محیط کشت MS به همراه غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کنندهای رشد BA (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. تمامی مواد تنظیم کننده رشد گیاهی و آگار از شرکت مرک[۱] کشور آلمان تهیه شدند.

پیش از اتوکلاو کردن محیط کشت (در فشار ۱/۵ بار و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه)، pH روی ۵/۸ تنظیم شد. هر دو هفته یک‌بار، تمامی ریزنمونه‌ها در محیط مشابه و تازه زیرکشت شدند. پس از ۵ هفته، ویژگی‌هایی مانند وزن تر پینه‌های تشکیل شده، نرخ رشد روزانه پینه‌ها و درصد پینه‌زایی اندازه‌گیری و سپس پینه‌ها در محیط کشت شاخساره‌زایی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری نرخ رشد روزانه و درصد پینه‌زایی به ترتیب از رابطه ۱ و ۲ استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح به طور کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر تکرار شامل سه شیشه و در هر شیشه سه ریزنمونه قرار گرفت. هر شیشه دارای ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS به همراه تیمارهای BA و NAA بود.

رابطه ۱- $DGR = (\ln x - \ln xo)/t$ (۶)

DGR: نرخ رشد روزانه $\ln x$: وزن پینه‌ها در پایان آزمایش $\ln xo$: وزن پینه‌ها در ابتدای آزمایش

t: مدت زمان انجام آزمایش

فرمول ۲- $\text{درصد پینه‌زایی} = \frac{\text{شمار ریز نمونه های پینه داده}}{\text{کل ریز نمونه های کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$ (۲۷)

مرحله شاخساره‌زایی

در این مرحله پینه‌های تشکیل شده از تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA روی محیط‌های شاخساره‌زایی قرار گرفتند. آزمایش به صورت طرح به‌طور کامل تصادفی با شش تکرار انجام شد. هر تکرار شامل شش شیشه و در هر شیشه سه ریزنمونه قرار گرفت. هر شیشه دارای ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS به همراه تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد BA در پنج سطح (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با NAA در یک سطح (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بود. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار در محیط مشابه و تازه زیرکشت و در هر نوبت قسمت‌های قهوه‌ای و سیاه رنگ از آن جدا شد. ارزیابی مرحله شاخساره‌زایی بعد از ۶ هفته انجام شد. در این مرحله ویژگی‌های مورد نظر شامل درصد شاخساره‌زایی، طول و شمار شاخساره‌های ایجاد شده از هر ریزنمونه و هم‌چنین شمار دمبرگ ارزیابی شدند. قسمت‌های قهوه‌ای و سیاه رنگ از هر شاخساره حذف شده و شاخساره‌های باززایی شده که دستکم ۰/۵ سانتی‌متر طول داشتند برای مرحله ریشه‌زایی به کار رفتند.

مراحل ریشه‌زایی و زنده‌مانی

شاخساره‌های باززایی شده از مرحله پیشین برای ریشه‌زایی به محیط کشت MS دارای شش تیمار هورمونی IBA (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. آزمایش در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. هر تکرار شامل سه شیشه و در هر شیشه چهار گیاه کشت شد. پس از ۴ هفته شاخص‌هایی مانند درصد ریشه‌زایی، شمار ریشه و طول ریشه اندازه‌گیری شد. سپس، گیاهچه‌ها برای بررسی درصد زنده‌مانی در شرایط آزمایشگاهی به داخل لیوان‌های پلاستیکی شفاف ۵۰۰ میلی‌لیتری دارای ترکیب کوکوپیت، پرلایت و ورمی‌کمپوست با نسبت‌های به ترتیب ۲، ۱ و ۰/۵ و EC برابر ۲ میکرو موس بر سانتی‌متر شدند (۲۴) و روی لیوان‌ها یک لیوان دیگر با شماری سوراخ برای حفظ رطوبت قرار داده شد. پس از یک هفته با باز کردن تدریجی پوشش لیوان‌ها گیاهان کشت بافتی سازگار شدند. داده‌برداری ۱۵ روز پس از انتقال گیاهچه‌ها به داخل لیوان‌ها آغاز و درصد زنده‌مانی گیاهان هر تیمار یادداشت شد. در پایان همه گیاهچه‌ها برای رشد بیشتر به محیط گلخانه با میانگین دمای حدود ۲۰/۲۵ درجه سلسیوس (روز/شب) با ۱۲ ساعت روشنایی منتقل شدند و پس از تهیه بستر کشت در شرایط مزرعه‌ای کشت شدند.

۱- Merck

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

فرمول ۴- $$\text{درصد ریشه‌زایی} = \frac{\text{شمار گیاهان ریشه دار شده}}{\text{شمار کل گیاهان کشت شده در شیشه}} \times ۱۰۰$$ (۲۷)

واکاوی آماری

تجزیه واریانس داده‌ها به وسیله نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام و مقایسه میانگین داده‌ها در صورت معنی‌داری با آزمون کمینه اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ ارزیابی شد. هم‌چنین برای انجام محاسبات آماری و رسم نمودارها از نرم افزار اکسل و برای نرمال‌سازی داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

نتایج

وزن تر، سرعت رشد نسبی و درصد پینه‌زایی

آغاز پینه‌زایی ریزنمونه‌های نوک روندک در بین تیمارهای گوناگون، متفاوت بود. پس از گذشت ۷ روز ریزنمونه‌ها در ترکیب ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA شروع به پینه‌زایی کردند. در دیگر تیمارها به طور میانگین پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ روز پینه‌زایی دیده شد. نتیجه‌های به دست آمده از تجزیه واریانس، نشان داد که اثر سطح های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA و NAA بر تمام ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. بر اساس نتیجه‌های مقایسه میانگین، از نظر وزن تر پینه، نرخ رشد روزانه پینه و درصد پینه‌زایی، بهترین تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی مربوط به ترکیب ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود که دارای بیشترین میانگین وزن تر پینه (۴/۲۴ گرم)، نرخ رشد روزانه پینه (۰/۱۳ گرم در روز) و درصد پینه‌زایی (۸۳/۳۳٪) بود. هم‌چنین در همه ویژگی‌های اندازه‌گیری شده کمترین میزان وزن تر پینه، نرخ رشد روزانه و درصد پینه‌زایی مربوط به تیمار شاهد (MS پایه) بود (جدول ۱). بررسی‌ها نشان داد که تیمارهای BA به همراه NAA منجر به تشکیل پینه‌های سبز رنگی شدند که بافت تردی داشتند. تیمارهای NAA منجر به تشکیل پینه‌های قهوه‌ای شدند که دارای بافت نرمی بودند و اجزای کروی شکل روی آن مشاهده می‌شد. در تیمار شاهد پینه‌های آبکی و سفید رنگی تشکیل شد. تیمار BA به تنهایی باعث تشکیل پینه‌های به رنگ سبز مایل به زرد شد که دارای بافت سفتی بودند (شکل ۱).

جدول ۱- اثر ترکیب‌های مختلف BA و NAA بر وزن تر، نرخ رشد روزانه و پینه‌زایی نوک روندک آب‌بشقابی.

Table 1. Effect of different combinations of BA and NAA on fresh weight, daily growth rate and callus induction of runner tip of Gotu kola.

BA (mgL^{-1})	NAA (mgL^{-1})	وزن تر (گرم) Fresh weight (g)	نرخ رشد روزانه Daily growth rate (g/day)	پینه‌زایی Callus induction (٪)
شاهد	0	0.91g†	0.02f	16e
۰	0.25	2.35d	0.07d	30.44d
	0.5	2.86c	0.09c	55.c
	1	1.88f	0.05e	33d
	0	2.7c	0.08d	44.29c
	0.25	2.48d	0.07d	37.66cd
1	0.5	1.74e	0.05e	30.11cd
	1	2.75c	0.08d	47c
	0	2.68c	0.08d	55.33c
	0.25	2.69c	0.08d	52.66c
2	0.5	2.59d	0.08d	44.33cd
	1	2.48d	0.07d	38.33cd
	0	3.22b	0.10b	55c
	0.25	2.50d	0.08d	39.44cd
3	0.5	2.62d	0.08d	44.33cd
	1	3.17b	0.10b	66.77b
	0	3.35b	0.10b	66b

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

	0.25	3.03b	0.09c	66.66b
4	0.5	3.36b	0.10b	74.55b
	1	4.26a	0.13a	83.33a
	0	3.27b	0.10b	69b
	0.25	2.10e	0.06e	38.11cd
5	0.5	2.54d	0.08d	33d
	1	1.78f	0.05e	27.44d

† In each column, different letters indicate significant differences in 5% level of probability using LSD test.

† در هر ستون،حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون LSD می‌باشد.

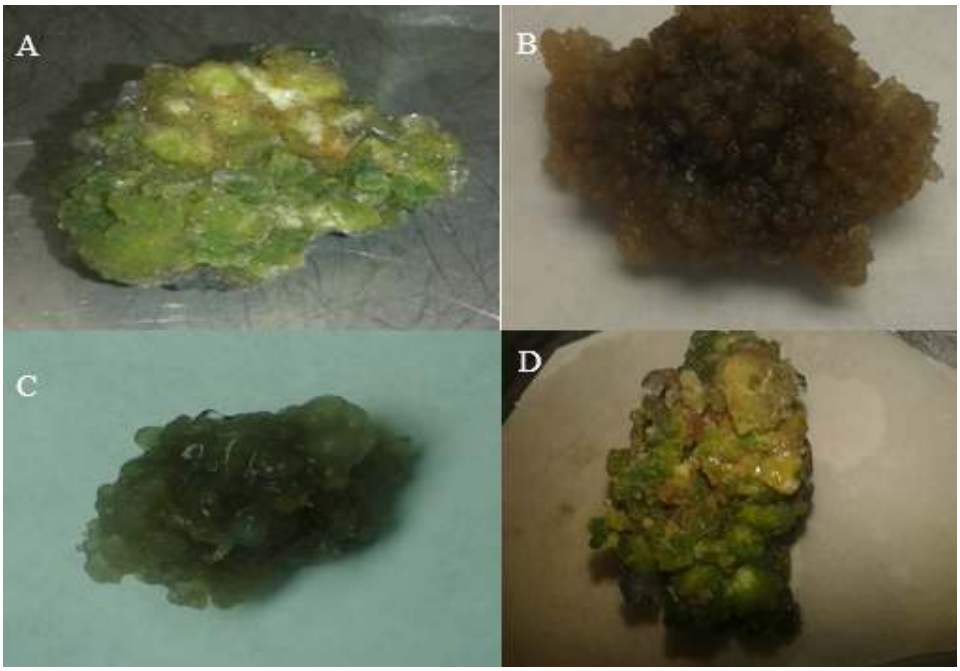

Fig. 1. Callus induction from runner tip explant of *C. asiatica*. A, Callus induction on medium containing BA (4.0 mgL^{-1}) and NAA (1.0 mgL^{-1}). B, Callus induction using NAA ((1.0 mgL^{-1}). C, Callus induction on MS medium free of plant growth regulator (control). D, Callus induction using BA (3.0 mgL^{-1}).

شکل ۱- انگیزش پینه از ریزنمونه‌های نوک ساقه رونده گیاه *Centella asiatica*. A، انگیزش پینه روی محیط حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. B، انگیزش پینهها استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. C، انگیزش پینه روی محیط MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (شاهد). D، انگیزش پینه با استفاده از ۳ میلی‌گرم در لیتر BA.

شاخساره‌زایی

نتیجه‌های تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری را بین ترکیب‌های سطح‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA به همراه NAA در رابطه با شاخساره‌زایی پینه‌های تشکیل شده نشان داد. نتیجه‌های مقایسه میانگین نشان داد که تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA دارای بیشینه درصد شاخساره‌زایی (۷۴/۹۹٪)، شمار شاخساره (۷/۶۶) در هر پینه، شمار دمبرگ (۶/۸۶) در هر شاخساره و طول شاخساره (۱/۵۶ سانتی‌متر) در مدت زمان یک ماه بود که اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ با بقیه تیمارها داشت (جدول ۲). با توجه به شرایط ویژه شاخساره‌زایی آب‌بشقابی، مرحله‌های مختلف شاخساره‌زایی غیر مستقیم از پینه‌های تشکیل شده از نوک روندک در شکل ۲ آورده شده است. براساس شکل، طول شاخساره‌های تشکیل شده کمتر از دمبرگ آن‌ها است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

جدول ۲- اثر ترکیب‌های مختلف BA با NAA بر درصد شاخساره‌زایی، شمار شاخساره، شمار دمبرگ و طول شاخساره باززایی شده از پینه‌های تشکیل شده روی ریزنمونه‌های نوک روندک آب‌بشقابی.

Table 2. Effect of different levels of BA in combination with NAA on percentage of shoot proliferation, number of shoot, number of petiole and length of regenerated shoots on runner tip calli of *C. asiatica*.

BA (mgL^{-1})	NAA (mgL^{-1})	شاخساره‌زایی(٪) Shoot proliferation (%)	شمار شاخساره Number of shoot	شمار دمبرگ Number of petiole	طول شاخساره (سانتی متر) Length of shoot (cm)
1	0.1	33.33c†	2.33b	2.66c	1.10b
2	0.1	38.88b	3.86c	4.33b	0.89c
3	0.1	74.99a	7.66a	6.86a	1.56a
4	0.1	35.99b	3.33c	2.77c	0.77c
5	0.1	27.77d	2.66c	2.83c	0.5d

†In each column, the different letters indicate significant differences in 5% level of probability using LSD test.

† در هر ستون، حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون LSD می‌باشد.

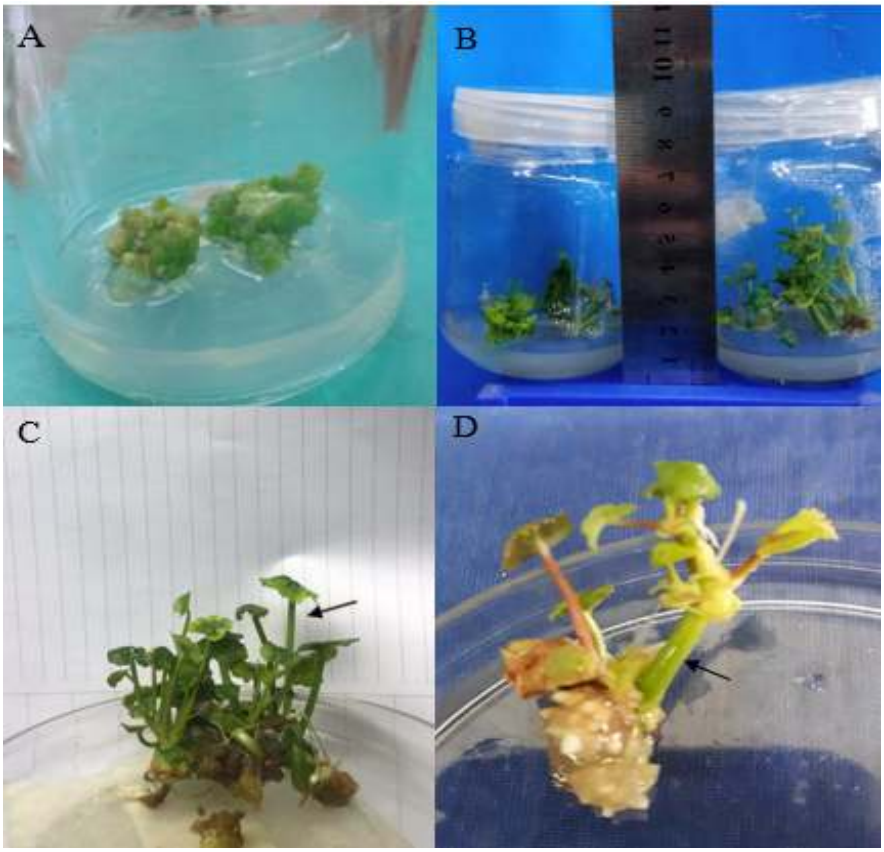

Fig.2. Regeneration of shoots from calli of runner tip explants of *C. asiatica*. A; Callus induction from runner tip explants (on MS media with 4 mgL^{-1} BA + 1 mgL^{-1} NAA). B, Indirect regeneration of shoots from runner tip calli. C; the arrow indicates the petiole of the produced shoots. D; the arrow indicates the produced shoot.

شکل ۲- باززایی شاخساره از پینه‌های ریزنمونه‌های نوک روندک آب‌بشقابی. A، انگیزش پینه از ریزنمونه‌های نوک روندک (روی محیط کشت MS با ۴ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA). B، شاخساره‌زایی غیرمستقیم از پینه‌های نوک روندک. C، پیکان نشان‌دهنده دمبرگ شاخساره‌های تولید شده است. D، پیکان نشان‌دهنده شاخساره تولید شده است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

ریشه‌زایی و زنده‌مانی

نتیجه‌های تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را بین ۶ تیمار مختلف IBA برای ریشه‌زایی در شاخساره‌های به دست آمده از مرحله پیشین نشان داد. نتیجه‌های مقایسه میانگین نشان داد که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای بیشترین میانگین درصد ریشه‌زایی (۸۴/۶۶٪)، شمار ریشه (۱۵) و طول ریشه (۸/۳۳ سانتی‌متر) بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ با بقیه تیمارها دارد. کمترین میزان اندازه‌گیری شده در تمامی ویژگی‌ها، مربوط به تیمار شاهد بود. نتیجه‌های مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی، شمار ریشه و طول ریشه در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی گیاهان نشان داد که گیاهچه‌های تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای بیشینه میزان زنده‌مانی (۷۴/۹۹٪) بودند که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ با سایر تیمارها دارد. مراحل مختلف ریشه‌زایی و سازگارکردن گیاهچه‌های تولید شده در شکل ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- اثر غلظت های مختلف IBA بر درصد ریشه‌زایی، شمار ریشه، طول ریشه و درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های باززایی شده از پینه‌های نوک روندک آب‌بشقابی.

Table 3. Effect of different IBA concentrations on rooting, root number, root length and survival percentage of plantlets regenerated from calli of runner tip of *C. asiatica*.

IBA (mgL^{-1})	ریشه‌زایی(٪) Rooting (%)	شمار ریشه Root number	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (cm)	زنده‌مانی گیاهچه‌ها (٪) Plantlets survival (%)
0	13.88^{e}†	1.66^{d}	2^{d}	7.10^{e}
0.5	49.66^{c}	6.33^{b}	6.63^{b}	45.33^{b}
1	84.66^{a}	15^{a}	8.33^{a}	74.99^{a}
1.5	55.^{b}	5.66^{b}	5^{c}	43.66^{b}
2	33.66^{c}	3^{c}	4.73^{c}	26.66^{c}
2.5	19.66^{d}	2^{cd}	3^{d}	17.33^{d}

†In each column, the different letters indicate significant differences in 5% level of probability using LSD test.

† در هر ستون، حرف‌های غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از ازمون LSD می‌باشد.

بحث

در این پژوهش اتانول ۷۰٪ و هیپوکلرید سدیم برای گندزدایی ریزنمونه‌های نوک روندک به کار رفت که نتیجه‌های آن رضایت بخش بود. این درحالی بود که در بیشتر پژوهش‌های انجام شده از ماده‌های گندزدای مختلف مانند کلرید جیوه و انواع قارچ‌کش‌ها برای گندزدایی استفاده شده است (۲، ۱۱، ۱۲). کاربرد نوک روندک آب‌بشقابی به دلیل داشتن فعالیت مریستمی یک برتری بود که افزون بر آلودگی کمتر، در مدت زمان کوتاه (دو ماه) نتیجه چشمگیری را در برداشت. انگیزش پینه به طور معمول به حضور اکسین‌ها یا سیتوکینین‌ها یا هر دو در محیط ماده‌های مغذی نیاز دارد. در این پژوهش استفاده از ۴ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA اثر مثبتی بر پینه‌زایی نسبت به تیمارهای دیگر داشت. در بیشتر گزارش‌ها برای پینه‌زایی از قسمت‌های مختلف آب‌بشقابی، ترکیبی از اکسین و سیتوکینین به ویژه BA پیشنهاد شده است (۱). در پژوهش حاضر برهمکنش سایتوکینین و اکسین اثر بهتری بر پینه‌زایی و نیز وزن تر و نرخ رشد پینه‌ها نسبت به تیمارهای شاهد و اکسین به تنهایی نشان داد، تا جایی که با افزایش غلظت سایتوکینین نسبت به اکسین، درصد انگیزش پینه و وزن تر پینه‌ها و هم‌چنین نرخ رشد روزانه تا میزان تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA افزایش یافته و در بیشتر از آن، سیر کاهشی پیدا کرد. در این رابطه نتیجه‌های پژوهش ما با گزارش Das و همکاران (۲) که گزارش کردند افزایش غلظت سایتوکینین نسبت به اکسین اثر بهتری بر پینه‌زایی آب‌بشقابی داشت همسو می‌باشد. اکسین در بافت‌های دارای سرعت تقسیم و رشد بالا به ویژه در اندام‌های هوایی به صورت طبیعی ساخته می‌شود (۱۳). در پژوهشی Skoog و Miller (۲۲) گزارش کردند که نسبت اکسین به سایتوکاینین در حد متعادل، موجب پینه‌زایی می‌شود. با توجه به نتیجه‌های پژوهش حاضر به نظر می‌رسد بالا بودن اکسین طبیعی در نوک ساقه رونده آب‌بشقابی و کاربرد سیتوکینین در غلظت بالاتر نسبت به اکسین برای رسیدن به

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

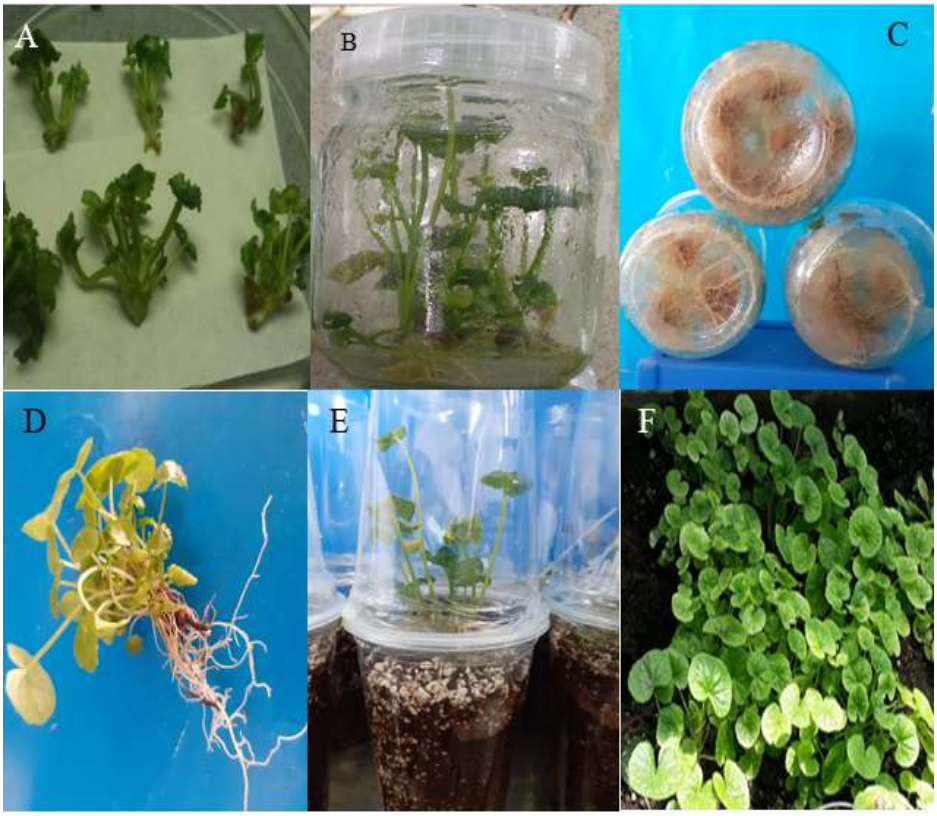

Fig.3. A, Proliferated shoots ready to receive rooting treatment. B and C, *In vitro* rooted plantlets. D: *In vitro* rooted plantlets ready for acclimatization. E, Acclimatization stage. F: plants in greenhouse.

شکل ۳- A، شاخساره‌های پرآوری‌شده، آماده دریافت تیمار ریشه‌زایی . B و C، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط درون‌شیشه‌ای. D، گیاهچه‌های ریشه‌دارشده درشرایط درون شیشه‌ای و آماده برای سازگارسازی. E، مرحله سازگاری. F، گیاهان در گلخانه.

تعادل هورمونی برای پینه‌زایی منطقی به نظر می‌رسد. تنظیم‌کننده رشد BA باعث فعالیت کمتر آنزیم لیپوکسیژناز[۱]شده و از تخریب کلروفیل پیشگیری می‌نماید. (۱۸) به نظر می‌رسد رنگ سبز پینه‌ها در حضور BA به همین دلیل باشد. اکسین برون‌زا باعث افزایش اکسین درونی می‌شود و این امر باعث ایجاد هورمون اتیلن شده که آن نیز سبب تولید آبسایزیک اسید (ABA)[۲] می‌شود (۷). آبسایزیک اسید به عنوان مهارکننده رشد گیاه در نظر گرفته می‌شود و به طور معمول به عنوان مهار رشد در کشت بافت گیاهان به کار می رود (۲۲). ممکن است به همین دلیل استفاده از اکسین به تنهایی باعث تولید پینه‌های بی‌کیفیت شده باشد.

در بیشتر منابع برای باززایی آب‌بشقابی سایتوکینین به تنهایی یا در ترکیب با غلظت کم اکسین به کار رفته است. برای شاخساره‌زایی در پژوهش ما از BA به عنوان سایتوکینین در غلظت‌های بالاتر به همراه NAA به عنوان اکسین در غلظت پایین‌تر استفاده شد که بیشترین درصد و شمار شاخساره در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. در پژوهش حاضر درصد شاخساره‌زایی و شمار شاخساره از تیمار ۱ تا تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA افزایش یافت و سپس از تیمار ۳ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA شمار شاخساره حالت کاهشی پیدا کرد. نتیجه‌های پژوهش حاضر با نتیجه‌های پژوهش Kumar (۱۲) که نشان داد در شاخساره‌زایی پینه‌های برگ آب بشقابی با افزایش نسبت BA به NAA درصد شاخساره‌زایی نیز افزایش می‌یابد، همسو نمی‌باشد. نتیجه‌های

۱- Lypoxgenase

۲- Abscisic acid

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

به دست آمده از پژوهش ما با نتیجه‌های پژوهش Das و همکاران (۲) هم‌خوانی دارد که آن‌ها برای شاخساره‌زایی از پینه‌های نوک ساقه آب‌بشقابی از غلظت‌های مختلف BA به همراه NAA استفاده کردند. نتیجه پژوهش آن‌ها نشان داد که درصد شاخساره‌زایی، شمار شاخساره و طول شاخساره‌از تیمار ۱ تا ۴ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA افزایش یافت، اما از تیمار ۵ تا ۷ میلی‌گرم در لیتر BA میزان این ویژگی ها کاهش یافت. کارایی BA در انگیزش شاخساره‌ممکن است به دلیل توانایی بافت گیاهی برای ساخت هورمون‌های درون‌زا ناشی از انگیزش تنظیم‌کننده‌های رشد برون زا و یا توانایی BA برای ساخت هورمون‌های درون‌زا مانند زآتین[۱]در داخل بافت گیاهی باشد (۲۱). در تیمار پینه‌زایی از نوک روندک، نسبت بالای سایتوکینین به اکسین (۴ به ۱) باعث تشکیل پینه‌های بزرگ‌تر شد که با توجه به وجود چنین پینه‌هایی، ویژگی‌هایی مانند طول شاخساره افزایش یافت. در این زمینه، Saez و همکاران (۱۹) بیان کردند که غلظت‌های بالای BA باعث کاهش شمار شاخساره در گیاهان و کوتاه شدن آن‌ها می‌شود. هم‌چنین در پژوهش‌های پیشین، افزایش شمار شاخساره و طول شاخساره حالت سیگموئیدی داشت به طوری که ابتدا با افزایش غلظت BA بر شمار و طول شاخساره گیاه افزوده شد و پس از اوج، دوباره کاهش پیدا کرد.

در مرحله ریشه‌زایی، اثر سطح‌های مختلف IBA بر ریشه‌زایی گیاهان معنی‌دار بود و بیشترین درصد ریشه‌زایی در ۱ میلی‌گرم IBA به‌دست آمد. بالا رفتن چشم‌گیر درصد ریشه‌زایی و زنده‌مانی در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با نتیجه‌های Das و همکاران (۲) همسو بود. قدیری‌سردود و همکاران (۵) و Tiwari و همکاران (۲۵) در مرحله ریشه‌زایی از پینه‌های گره آب‌بشقابی، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA را به عنوان بهترین تیمار برای ریشه‌زایی و زنده‌مانی گزارش کردند که بیشترین شمار و طول ریشه نیز مربوط به این تیمار بود. در پژوهشی Kumar (۱۲) در مرحله ریشه‌زایی تیمارهای مختلفی به کار برد. کاربرد ۲، ۴، ۵-کلروفنوکسی استیک اسید (2,4,5-T)[۲] در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین درصد ریشه‌زایی (به ترتیب، ۸۵/۵ و ۹۲/۳٪)، شمار ریشه (به ترتیب ۸۲ و ۸۸) و طول ریشه (به ترتیب، ۸/۲ و ۹/۲ سانتی‌متر) را داشت در حالی که کمترین درصد زنده‌مانی را نشان داد. در این آزمایش تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین زنده‌مانی را به همراه داشت.

اکسین‌ها بیشتر منجر به انگیزش ریشه‌زایی می‌شوند و از رشد طولی آن پیشگیری می‌کنند (۲۴). براساس جدول ۳ طول ریشه با کاربرد غلظت ۱/۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA رو به کاهش است. در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به حدی بالا نبوده است که از رشد ریشه جلوگیری نماید و گیاهانی که شمار ریشه بیشتر و بلندتر داشتند از توانایی زنده‌مانی بالاتری برخوردار بودند.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌های پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد روی ویژگی‌های مختلف در پینه‌زایی و باززایی گیاه آب‌بشقابی اثرگذار است. هم‌چنین این پژوهش نشان داد که ویژگی‌های مختلف پینه‌زایی و باززایی مانند درصد پینه‌زایی، وزن‌تر پینه، درصد باززایی و شمار شاخساره تولید شده در هر ریزنمونه، می‌تواند اثر متفاوتی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بپذیرد. کاربرد بنزیل‌آدنین (BA) در غلظت بالاتر نسبت به نفتالین استیک اسید (NAA) اثر بهتری بر پینه‌زایی و شاخساره‌زایی آب‌شقابی داشت. هم‌چنین استفاده از IBA به عنوان اکسین اثر مثبتی روی ریشه‌زایی و زنده‌مانی گیاه داشت. استفاده از نوک روندک منجر به کاهش آلودگی و افزایش سریع آب‌بشقابی در مدت زمان کوتاه شد. در پایان، پروتکل پیشنهاد شده در این پژوهش برای ریزافزایی آب‌بشقابی موفقیت آمیز بود و نتیجه‌های رضایت بخشی را به همراه داشت.

منابع

References

1. Bibi, Y., M. Zia. 2011. Regeneration of *Centella asiatica* (L.) plants from non-embryogenic cell lines and evaluation of antibacterial and antifungal properties of regenerated calli and plants. J. Biol. Eng. 5(1): 5-13.
2. Das, M., F. Hasan, M. Hossain and M. Rahman. 2008. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.) an important medicinal herb department of genetic engineering and Biotechnology university of Rashahi, Rashahi-6205, Bangladesh. 19(2):51-56.

۱- Zeatin

۲- 2,4 ,5-chlorophenoxy acetic acid

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

3. Devkota A., S. Dall'Acqua, S. Comai, G. Innocenti and P.K. Jha. 2010. *Centella asiatica* (L.) urban from Nepal Quali-quantitative analysis of samples from several sites and selection of high terpene containing populations for cultivation. Biochem. Syst. Ecol. 38:12–22.
4. Fetrow. C.W and R. Avila. 2001. Professional's hand book of complementary and alternative therapies. Spring house. Pennsylvania. pp: 239-40.
5. Ghadiri Sardrood, S., S. Sara, M. mohammad hasan and N. Taher. 2020. Micropropagation Of Medicinal Herb- Centella asiatica (L.). J. Plant Research (Iranian Journal of Biology).volume 33(1).
6. Godoy-Hernandez, G and F. Vazquez-Flota. 2006. Growth measurements estimation of cell division and cell expansion. In: V.M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota (Ed.), *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, 318:51-58.
7. Grossmann, K . 2000. Mode of action of auxin herbicides a new ending to a long, drawn out story. Trends in Plant Sci. 5:506–508.
8. Gruenwald, B and C. 2000. Aenicke. PDR for herbal medicine. 2th edition. Medical economics Co. montvale New Jersey. pp:729-31.
9. Gupta, A., S. Verma, P. Kushwaha, S. Srivastava and R. Aks. 2014. quantitative estimation of asiatic acid, asiaticoside and madecassoside in two accessions of *Centella asiatica* (L) Urban for morpho-chemotypic variation. Indian. J. Phar Edu. 48(3): 75-79.
10. Jalili, A. and Z. Jamzad. 1999. Red data book of plant species of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands., p: 663.
11. Joshi, K. and P. Chaturvedi. 2013. Efficient *In vitro* regeneration protocol of *Centella asiatica (L)*. Urban: An endemic and underutilized nutraceutical herb Molecules Afr. J. Biot. 12(33):5164-5172.
12. Kumar, M. 2017. Rapid *In vitro* multiplication of *Centella asiatica* (L). Urban. Through Multiple Shoots from Leaf explants Eur. J. Biot. 2321-9122.
13. Liung, K., R. Bhalerao and G. Sandberg. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. Planta, 29:465-474.
14. Maquart, F.X., F. Chastang, A. Simeon, P. Birembaut, P. Gillery and Y. Wegrowski. 1999. Triterpenes from Centella asiatica stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. Eur. J. Derm. 9(4): 289–296.
15. Mercy, S., N. Sangeetha and D. Ganesh. 2012. *In vitro* production of adventitious roots containing asiaticoside from leaf tissues of *Centella asiatica* L. *In vitro* Cell Devel. Biol. 48:200–207.
16. Modares, M., Lahuti, M., Gangali, A. and G. Asili. 2012. Studies micropropagation *Salvia leriifolia* using cultured. J. Plant.Bio. 14(4): 89-100.
17. Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A. 2014. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophycea), Plant Growth Regul. 73:57–66.
18. Prasad, A., M. Singh, N.P. Yadav, A.K. Mathur and A. Mathur. 2014. Molecular, chemical and Biological stability of plants derived from artificial seeds of *Centella asiatica* (L.) Urban-An industrially important medicinal herb. Ind. Crops Prod. 60:205–211.
19. Saez, F., P. Sanchez and A. Piqueras. 1994. Micropropagation of *Thymus piperella*. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 39:269-272.
20. Sharma, R.K. and A.K. Wakhlu. 2003. Regeneration of *Heracleum candicans* wall plants from callus cultures through organogenesis. J. Plant Biochem. Biotech. 12:71-72.
21. Sharp, R.E., M.E. LeNoble, M.A. Else E.T. Thorne and F. Gherardi. 2000. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. J. Exp. Bot. 51:1575–1584.
22. Skoog, F and C.O. miller. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *In vitro*. Harper and Row, New York,pp. 481-494.
23. Taghizadeh. M., A. Naghinejhad and M. Ahvazi. 2004. Determination of growth and distribution of *Centella asiatica* in the Anzali lagoon. 2nd ed. International Congress on Traditional Medicine and Materia Medica.
24. Taiz, L. and Z. Eduardo. 2002. Plant Physiology,3rd ed.Publisher: Chapter 21 (510).
25. Tiwari, KN., N. Sharma, V. Tiwari and B. Singh. 2000. Micropropagation of *Centella asiatica (L).* a valuable medicinal herb. Plant cell, tissue and organ culture. Afr. J. Bio. 63:179-185.
26. Tripthi, L and J.N. Tripathati. 2003. Role of biotechnology in mediacinal plants. Pharmac. Res. (2): 243-253.
27. Verpoorte, R., V. Heiden, R. Hoge, H.C. Ten and H.G. Hoopen. 1994. Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. Pure Appl. Chem. 66(10/11):2307-2310.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 21 (3): 309 - 318 (2020)
Research article

Micropropagation of Gotu Kola (*Centella asiatica* L.) via Runner Tip Culture

M. Habibisilabi, Y. Hamidoghli*, A. Sahraroo[1]

Gotu kola (*Centella asiatica* L.) is one of the most valuable medicinal plants. Due to the reduction of surface water and the limitation of dispersion, the natural populations of this plant species are in extinction risk. The purpose of this experiment was to introduce a tissue culture protocol for rapid micropropagation of the Gotu kola plant. For callus induction, explants were established on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentration of 6-benzylamino purine (BA) at six levels (0, 1, 2, 3, 4, and 5 mgL^{-1}) and α-naphthaleneacetic acid (NAA) at four levels (0, 0.25, 0.5, and 1 mgL^{-1}). The best callogenesis was obtained with maximum callus induction (83.33%), fresh weight (4.26 g), and daily growth rate (0.14 g/day) by combined application of 4 mg L^{-1} BA and 1 mg L^{-1} NAA. Different concentrations of BA (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mgL^{-1}) and NAA (0.1 mg L^{-1}) were used for shoot regeneration. Combination of BA (4.0 mgL^{-1}) with NAA (1.0 mgL^{-1}) showed the highest shoot proliferation (74.99%), maximum number of shoots (7.66), petiole (6.66) and the longest shoots (1.56 cm). The effects of, IBA (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mgL^{-1}) were examined on adventitious root formation. MS medium supplemented with IBA (1 mgL^{-1}) showed the best percentage of rooting (84.66%), maximum number of roots Per plantlet (65), and the longest roots (3.33 cm) along with the highest percentage of survival (74.99%).

Keywords: Auxin, Cytokinin, Callus induction, Tissue culture, Medicinal plant.

1. Former M.Sc. Student, Associate and Assistant Professors of Horticulture, University of Guilan, Rasht, Iran, respectively.
* Corresponding author, Email: (hamidoghli@guilan.ac.ir).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-06-10]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1399.21.3.6.4]