The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

In Vitro Callus Induction, Somatic Embryogenesis and Indirect Regeneration in Gotu Kola (*Centella asiatica*) as a Medicinal Plant

Mohammadvali Habibi Silabi[1], Yousef Hamidoghli [2]✉, Amir Sahraroo[3]

1. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran. E-mail: mohammadbhabibi23vh@hmail.com
2. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Guilan University, Guilan, Iran. E-mail: hamidoghli@gmail.com
3. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Guilan University, Guilan, Iran. E-mail: asahraroo@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 18 June 2023

Received in revised form: 7 December 2023

Accepted: 27 December 2023

Published online: Summer 2024

Keywords:

Tissue culture,

Callus induction,

Embryogenesis,

Growth regulator.

ABSTRACT

Gotu kola (*Centella asiatica* L.) is one of the valuable medicinal plants, whose biodiversity is facing the risk of extinction in the world due to the limitation of distribution areas and the reduction of surface waters. In order to investigate somatic embryogenesis in gotu kola, an experiment was carried out in 2018 in the tissue culture laboratory of the Faculty of Agriculture of Gilan University. Leaves were used as explants and MS medium as basal medium. The effect of different concentrations of plant growth regulators (2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in five concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L in combination with benzyl adenine (BAP) in four concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 1 mg/L) were tested to determine the appropriate culture medium for inducing gotu kola embryogenic callus. For the induction of somatic embryos the good status obtained calli were transferred to different concentration of 2,4-D including 0, 0.1, 0.2 and 0.3 mg/L. In the next step the derived somatic embryos were subjected to 0, 0.25, 0.5 and 1 mg/L of BAP for germination. The results showed that the treatment with 2 mg/L of 2,4-D had the highest percentage of callus formation (96.61%), fresh weight (3.96 g/cm^2 of leaf) and average callus diameter (3.56 cm) in dark conditions. Also, the treatment of 0.1 mg/L of 2,4-D had the highest average number of embryos formed in different stages of spherical, heart, and torpedo shaped, and the treatment of 0.1 mg/L of 2,4-D had the highest percentage of embryogenesis (55.27%), which was not significantly different from the treatment of 0.2 mg/L of 2,4-D. The results showed that the treatment of 1 mg/liter of BAP had the highest percentage (56.8%) of embryo germination and also the highest average number (12.4) of produced seedlings. In general, the use of 2,4-D to create embryogenic calli and BAP to germinate the formed embryos was satisfactory.

Cite this article: Habibi Silabi, M., Hamidoghli, Y. & Sahraroo, A. (2024). In Vitro Callus Induction, Somatic Embryogenesis and Indirect Regeneration in Gotu Kola (*Centella asiatica*) as a Medicinal Plant. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (2), 199-214. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.360103.2110

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.360103.2110

Extended Abstract

Introduction

Gotu kola (*Centella asiatica* L.) is one of the important medicinal plants that are used in traditional medicine for the treatment of diseases and in the cosmetics industry. In Iran it grows in wetlands of Anzali city. Due to the excessive exploitation of natural resources, as well as the reduction of surface water and the increase of agricultural toxins, the biodiversity of Gotu kola is at risk in the whole world. This is why its name has been registered as a threatened plant species by the International Union for Conservation of Nature and National Resources (IUCN). Considering the low seed germination of this plant, it seems necessary to use in-vitro micropropagation methods for producing a large number of plants in the shortest time.

Materials and methods

In this research, in order to control fungal and bacterial contamination and reduce the use of disinfectants, first the disinfected runner tips were cultivated in MS culture medium, and when transformed into whole plants, their leaves were used as explants for embryogenesis. Leaf explants were used to induce embryonic calli on MS solid media containing 0, 0.25, 0.5, 1.5 and 2 mg/l 2,4-D alone or in combination with 0,0.25,0.5 and 1 mg/l BAP. The obtained calli were transferred to MS medium containing different concentrations of 2,4-D, including 0, 0.1, 0.2 and 0.3 mg/l for induction of somatic embryos. BAP growth regulator was used at concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 1 mg/l to germinate the formed embryos.

Results and Discussion

The results of inducing embryonic calli by plant growth regulators showed that the concentration of 2 mg/l 2,4-D treatment had the highest percentage of callus formation (96.61%), callus fresh weight (3.96g) and callus mean diameter (3.56cm) in dark conditions. The effect of 2,4-D treatment on somatic embryos formation showed that concentration of 0.1 mg/L 2,4-D had the highest mean number of embryos formed at different stages of spherical-, heart- and torpedo-shaped. Also, the 0.1 mg/l 2,4-D treatment had the highest percentage of embryogenesis (55.27%) which was not significantly different from 0.2 mg/l 2,4-D treatment. BAP growth regulator was used at concentrations of 0, 0.25, 0.5 and 1 mg/l to germinate the formed embryos. The results showed that maximum percentage of embryos germination (56.8%) and maximum mean number of seedling production (12.4%) were obtained at the concentration of 1 mg/l BAP. It has been reported that culture medium containing 2,4-D is one of the most suitable mediums for inducing embryogenic callus in many plant species because this medium increases internal auxin in plants.

In the examined treatments where the concentration of BAP was higher than 2,4-D, the fresh weight of the callus also increased with the increase in the amount of BAP. Adding cytokinin to the auxin-rich medium in the present study increased callus formation and also the average of callus diameter. By increasing the concentration of 2,4-D from zero to 2 mg/liter, the percentage of callus formation increased. The concentration of 0.1 mg/liter of 2,4-D had the highest percentage of embryogenesis. The results of other studies also showed that by reducing the amount of growth regulators, the stages of fetal development are improved. Although the process of embryo induction from cells in the callus is not completely understood, today it is generally believed that the continued presence of auxin causes a change in gene expression and is probably associated with an increase in DNA demethylation of the embryo masses. Under these conditions, the embryonic masses inside the calli synthesize the genes necessary to complete the globular stage of embryogenesis. Somatic embryos of many species are capable of germination in the induction medium. In a few cases, it is necessary to transfer the embryos to a fresh culture medium with different concentrations of growth-regulating compounds in which auxin has been removed. The use of 2,4-D growth regulator as auxin in the creation of embryogenic calli had good results. Induction of somatic embryos with lower concentrations of 2,4-D was more effective. For the germination of embryos, the use of BAP growth regulator was successful. In this research, the embryos formed roots after germination, and it took a long time for the roots to grow, which probably would have shortened the rooting time if growth regulators such as IBA and NAA were used after germination. Acclimatization of the seedlings in laboratory conditions resulted in a good process, but in strong light conditions, the plants suffered from sunburn, which, due to the nature of the Gotu kola plant, which is a shade-loving plant, the use of a cover as a shade solved the problem of sunburn.

Conclusion

Considering that Gotu kola is a creeping plant, it is difficult to control its various surface and internal contaminations in the conditions of in vitro cultivation. Using the tip of the creeping stem as the initial explant to obtain plants free from pollution and disease was extremely satisfactory and made the next steps of the work, i.e., the use of the free of contamination leaf as explant for callus generation, very easy. The use of 2,4-D regulator as auxin in creating embryogenic callus had good results. Induction of somatic embryos with lower concentrations of 2,4-D was more efficient, especially in the spherical and heart-shaped stages, but in these treatments, the torpedo-shaped stage was not formed, which by transfer to MS culture medium without growth regulator and also light conditions, torpedo-shaped stage was also observed. For the germination of embryos, the use of BAP growth regulator was successful.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۵، شماره ۲

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

بررسی کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی گیاه دارویی آب‌بشقابی

محمدولی حبیبی سیلابی[۱] | یوسف حمیداوغلی[۲]✉ | امیر صحرارو[۳]

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: mohammadbhabibi23vh@hmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران. رایانامه: hamidoghli@gmail.com

۳. گروه علوم باغبانی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران. رایانامه: asahraroo@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶

تاریخ انتشار: تابستان ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:

تشکیل کالوس، تنظیم‌کننده‌های رشد، جنین‌زایی، کشت بافت.

چکیده

گیاه آب‌بشقابی (*Centella asiatica* L.) یکی از گیاهان دارویی با ارزش است که تنوع زیستی آن به دلیل محدودیت منطقه‌های پراکنش و کاهش آب‌های سطحی با خطر نابودی در دنیا رو به رو می‌باشد. به‌منظور بررسی جنین‌زایی سوماتیکی آب‌بشقابی، آزمایشی در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان اجرا شد. از برگ این گیاه به‌عنوان ریزنمونه، در محیط کشت جامد MS به همراه ۲و ۴ دیکلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) در غلظت‌های ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین (BAP) در غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر میلی‌گرم در لیتر برای القای کالوس‌های جنین‌زا استفاده شد. سپس برای القای جنین‌های سوماتیکی از کالوس‌های تشکیل‌شده، از تیمار 2,4-D با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ و صفر میلی‌گرم در لیتر و برای جوانه‌زنی جنین‌های تشکیل‌شده از تنظیم کننده رشد BAP در غلظت‌های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمار دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۶/۶۱ درصد)، وزن تر (۳/۹۶ گرم از یک سانتی‌متر مربع برگ) و میانگین قطر کالوس (۳/۵۶ سانتی‌متر) در شرایط تاریکی بود. همچنین تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین میانگین تعداد جنین‌های تشکیل‌شده در مراحل مختلف کروی، قلبی و اژدری شکل بود و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای بیشترین درصد جنین‌زایی (۵۵/۲۷ درصد) بود که با تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد که تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر BAP دارای بیشترین درصد (۵۶/۸ درصد) جوانه‌زنی جنین‌ها و همچنین بیشترین میانگین تعداد (۱۲/۴) گیاهچه تولیدشده بود. بطور کلی استفاده از 2,4-D برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا و BAP برای جوانه‌زنی جنین‌های تشکیل شده رضایت بخش بود.

استناد: حبیبی سیلابی، محمدولی؛ حمیداوغلی، یوسف و صحرارو، امیر (۱۴۰۳). بررسی کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی گیاه دارویی آب‌بشقابی. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۵ (۲)، ۲۱۴-۱۹۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.360103.2110

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.360103.2110

مقدمه

گیاهان دارویی منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در بسیاری از داروها، صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شوند. با وجود این که مصرف گیاهان دارویی در تمام تمدن‌ها رواج داشته ولی در حال حاضر مصرف داروهای شیمیایی بسیار زیاد است. عوارض جانبی و افزایش قیمت داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی را دوباره با اهمیت کرده و باعث روی آوردن دوباره مردم به سمت گیاهان دارویی شده است (Sharma *et al*., 2008).

گیاه آب‌بشقابی با نام علمی Centella asiatica (L.) Urban متعلق به تیره کرفسیان[1]است که با نام‌های پنی ورت[2] و گوتا کولا[3]در هند و اروبن[4]در اروپا شناخته شده است (Sun et al., 2020). آب‌بشقابی یک گیاه چندساله، همیشه‌سبز، رونده و در محل گره‌ها ریشه‌زا است. برگ‌های این گیاه دایره‌ای و کلیوی شکل بوده و دارای گل‌های سفید تا متمایل به صورتی‌رنگ است. این گیاه بومی مناطق با اقلیم گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و مرطوب جهان است که از ارتفاع صفر تا ۲۰۰۰ متر از سطح دریا رویش دارد و در هر دو نیمکره به‌خصوص سریلانکا و جنوب آفریقا، جنوب شرقی آسیا، هند و قسمت‌هایی از چین و جنوب غربی ماداگاسکار، جنوب و جنوب شرقی آمریکا، مکزیک، ونزوئلا و کلمبیا پراکنش دارد (Long et al., 2012). با توجه به منابع موجود، گیاه آب‌بشقابی در ایران از تالاب انزلی گزارش شده است (Jalili & Jamzad, 1999; Taghizadeh et al., 2004).

ترکیبات گیاه آب‌بشقابی شامل فلاونوئیدها (کوئرستین[5] کامپرول)، گلیکوزیدهای مختلف، ترپنوئیدها (آسیاتیاکوزید[6]، سنتللوزید[7]، مادکاسوزید[8]، براهموزید[9] و براهیموزوئید[10]) مادکاسسول[11]اسید آسیاتیک[12]آمینواسیدها، اسیدهای چرب، فیتواسترول[13]و تانن است (Fetrow & Avila., 2001). گیاه آب‌بشقابی در طب سنتی از دیرباز در کشورهای آسیای شرقی، هندوستان و چین به‌طور سنتی (جوشانده، عصاره، پماد، لوسیون) برای درمان بیماری‌های پوستی، روماتیسم، صرع، تسکین‌دهنده سلول‌های عصبی و مغزی، افزایش‌دهنده هوش، به‌عنوان لوسیون صاف کننده مو، داروی ضدبارداری، پیشگیری از نارسایی وریدها (واریس)، کاهش التهاب پوستی و به‌عنوان تحریک سنتز کلاژن در ترمیم پوست استفاده می‌شده است (Ghiulai et al., 2020; Biswas et al., 2021).

به دلیل بهره‌برداری بی‌رویه از منابع طبیعی و همچنین کاهش آب‌های سطحی و افزایش سموم کشاورزی تنوع زیستی این گیاه در کل دنیا در معرض خطر نابودی قرار گرفته است (Pandey et al., 1993). به همین دلیل نام این گیاه در اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت و منابع ملی (IUCN)[14]به عنوان گونه گیاهی تهدید شده و در معرض خطر به ثبت رسیده است (Mercy et al., 2012). آب‌بشقابی را می‌توان به‌وسیله بذر تکثیر کرد ولی قوه نامیه بذر آن بسیار پایین است. همچنین می‌توان از طریق رویشی آن را تکثیر کرد که این روش نیز پرهزینه و وقت‌گیر است (Devkota et al., 2010). ریزازدیادی گیاهان در معرض انقراض، یکی از روش‌های حفظ آن‌هاست (Hesami et al., 2018). در ریزازدیادی نه‌تنها نرخ تکثیر به‌طور

---

1 Apiaceae
2 pennyworth
3 **Gotu Kola**
4 **Urban**
5 Quercetin
6 Asiaticoside
7 Sentuloside
8 Madecassoside
9 Brahmooside
10 Brahimosoid
11 Madecassol
12 Asiatic acid
13 Phytosterol
14 International Union for Conservation of Nature

قابل‌توجهی افزایش می‌یابد بلکه امکان تولید گیاهان عاری از پاتوژن نیز فراهم می‌شود. جنین‌زایی سوماتیکی فرایندی است که در آن یک گیاه یا جنین از یک سلول رویشی ایجاد می شود. گیاهان تولید شده چه به روش مستقیم و یا غیر مستقیم از نظر ژنتیکی مشابه هستند، شوند (Perera et al., 2021).

پیشینه پژوهش

جنین‌زایی سوماتیکی در تعداد زیادی از گیاهان تیره کرفسیان گزارش شده است (Sehgal & Abbas, 1994). در پژوهشی، تشکیل کالوس از ریزنمونه گره آب‌بشقابی در محیط‌های کشت بافتی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. برای القای کالوس و مورفوژنز، بخش‌های گره (۱/۵ تا ۵ سانتی‌متر) روی محیط موراشیک و اسکوگ[1](MS) به همراه سایتوکینین‌ها و اکسین‌های مختلف کشت داده شدند. بیشترین میزان تکثیر کالوس، در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین[2](BAP) به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید[3](NAA) به ترتیب با ۹۵ و ۸۷ درصد پاسخ به دست آمد (Khan et al., 2022). در پژوهشی دیگر تیمار محیط کشت MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مناسب‌ترین تیمار برای القای کالوس‌های جنین‌زا در گیاه آب بشقابی بود. همچنین تیمار دو میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA برای شاخه‌زایی مناسب تشخیص داده شد. گیاهچه‌های تشکیل‌شده با انتقال به محیط کشت MS دارای دو میلی‌گرم بر لیتر NAA ریشه‌دار شدند(Biradar, 2017). در یک بررسی نیز از برگ‌های گیاه آب‌بشقابی برای القای جنین‌زایی استفاده شد. محیط کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر کاینتین[4]به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مناسب‌ترین تیمار برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا در مراحل مختلف نمو جنین (کروی، قلبی، میله‌ای و اژدری شکل) پس از گذشت چهار هفته گزارش شده است. همچنین تیمار محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین به همراه یک میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید[5](GA3) بهترین تیمار برای تبدیل جنین‌ها به گیاه کامل بود (Paramageetham et al., 2004).

در پژوهشی دیگر برای جنین‌زایی آب‌بشقابی از طریق برگ از غلظت‌های مختلف اکسین و سایتوکینین استفاده شد. نتایج نشان داد تیمار محیط کشت MS دارای یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D یا یک میلی‌گرم در لیتر NAA هردو در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین مناسب‌ترین تیمار برای القایی جنین‌زایی بودند. از ۱۰۰ گرم کالوس جنین‌زای منتقل‌شده به محیط کشت نیمه جامد MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین، بطور متوسط تعداد ۳۰۳/۱ جنین تولید شد؛ در حالی که در همین تیمار، از ۱۰۰ گرم کالوس‌های استفاده‌شده از محیط کشت MS دارای یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین، بطور متوسط تعداد ۲۰۴/۳ جنین به‌دست آمد. تیمار ۰/۰۸ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای بیشترین درصد (۸۸/۸درصد) تبدیل جنین به گیاهچه بود (Martin, 2004). با توجه به اهمیت گیاه آب‌بشقابی، هدف از انجام این پژوهش ریزازدیاد انبوه و سریع گیاه دارویی در حال انقراض آب‌بشقابی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی با استفاده از ریزنمونه برگ در تیمارهای مختلف محیط کشت بود که برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گرفت.

1. Murashige and Skoog
2Benzylamino purine
3Naphthalene Acetic acid
4Kinetin
5Gibberellic acid

روش شناسی پژوهش

کالوس‌زایی

به منظور تولید کالوس، از گیاهان جمع‌آوری شده از اطراف تالاب انزلی و کشت شده در گلخانه آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان استفاده گردید. به منظور کنترل آلودگی‌های داخلی و سطحی ابتدا گیاهچه‌های استریل تولید شد. از نوک ساقه رونده به عنوان ریزنمونه استفاده شد. ساقه‌های رونده به طول ۶-۵ سانتی‌متر از گیاه مادری جدا شدند و پس ازشستشو با آب و مایع ظرف‌شویی به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب شهری قرار گرفتند. در مرحله بعد به ترتیب با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه در داخل هود لامینار گندزدایی شدند. در آخر نمونه‌ها برای سه بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر سترون، آبشویی شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS کشت شده و در داخل اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از تبدیل شدن ریزنمونه‌ها به گیاهچه، از برگ‌های تولیدشده در شرایط درون‌شیشه‌ای برای کالوس‌زایی استفاده شد. در این مرحله، از محیط کشت MS دارای 2,4-D در شش سطح (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد BAP در چهار سطح (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) برای القای کالوس‌های جنینی استفاده شد. برای تأمین هیدرات‌کربن موردنیاز ریزنمونه جهت رشد از ساکارز (۳۰ گرم در لیتر) و برای ایجاد محیط کشت جامد از آگار (۸ گرم در لیتر) استفاده شد و pH محیط کشت بر ۵/۸ تنظیم گردید. ریزنمونه‌های برگ روی محیط کشت قرار گرفته و در اتاقک رشد در شرایط تاریکی با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور تازه کردن محیط کشت برای رشد ریزنمونه‌ها، هر سه هفته یک‌بار ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط کشت تازه با همان ترکیب تیماری بازکشت شدند. بعد از پنج هفته ویژگی‌های درصد کالوس‌زایی به‌وسیله رابطه ۱ (Verpoorte et al., 1994)، وزن تر کالوس (به‌وسیله ترازوی دیجیتال حساس در زیر هود لامینار)، و میانگین قطر کالوس (به‌وسیله کولیس دیجیتال با تعیین اندازه قطر بزرگ و قطر کوچک) اندازه‌گیری شدند.

$$\text{درصد کالوس‌زایی} = \frac{\text{تعداد ریز نمونه های کالوس داده}}{\text{تعداد ریز نمونه های کشت شده در شیشه}} \times 100$$

رابطه ۱)

جنین‌زایی

بهترین کالوس‌ها (کالوس‌های سالم با رنگ سفید مایل به خاکستری که آثار جنین‌زایی روی آن‌ها قابل مشاهده بود) برای رشد جنین‌های سوماتیکی به محیط کشت MS دارای تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در چهار سطح (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در داخل پتری‌دیش‌های شفاف یک‌بار مصرف ۱۵سانتی‌متری و شرایط تاریکی منتقل شدند. هر سه هفته یک‌بار ریزنمونه‌ها در محیط کشت تازه بازکشت شدند. بعد از گذشت شش هفته ویژگی‌های تعداد جنین کروی و قلبی شکل با میکروسکوپ بینوکولار شمارش و عکس‌برداری شد. برای توسعه بیشتر جنین‌های تشکیل‌شده در مراحل قبل، کالوس‌های جنینی به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد در داخل ظروف شیشه‌ای کشت و اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. تشکیل مرحله اژدری شکل در زیر میکروسکوپ بینوکولار هر هفته بررسی و یادداشت‌برداری شد.

جوانه‌زنی

جهت بررسی جوانه‌زنی بهترین جنین‌های انتخاب‌شده، کالوس‌ها به محیط کشت MS دارای تنظیم‌کننده رشد BAP در چهار سطح (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. بعد از گذشت شش هفته ویژگی‌های تعداد گیاهچه‌های تشکیل‌شده و درصد جنین‌های تبدیل شده به گیاهچه اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار آزمایش به داخل لیوان‌های پلاستیکی شفاف با ترکیب خاک کوکوپیت، پرلیت و ورمی کمپوست به نسبت‌های ۲، ۱ و ۰/۵ منتقل شدند و روی لیوان‌ها یک لیوان دیگر با تعدادی سوراخ جهت حفظ رطوبت قرار داده شد. پس از یک هفته، با برداشتن تدریجی پوشش لیوان‌ها

گیاهان با محیط بیرون سازگار شدند و در نهایت جهت کشت به گلخانه با میانگین دمای ۲ ±۲۵ سلسیوس (روز/ شب) با ۱۲ ساعت روشنایی منتقل شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش کالوس‌زایی به‌صورت فاکتوریل (فاکتور اول تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در شش سطح صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و فاکتور دوم تنظیم‌کننده رشد BAP در چهار سطح صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. هر تیمار شامل سه ظرف شیشه‌ای کشت با حجم ۳۰ میلی لیتر محیط کشت بود و در داخل هر شیشه سه ریزنمونه قرار داده شد. آزمایش جنین‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام گرفت. هر تیمار شامل شش پتری‌دیش و در هر پتری‌دیش ده ریزنمونه (حدودا دو تا سه سانتی‌متر) قرار گرفت. همچنین، آزمایش جوانه‌زنی جنین‌های تشکیل شده به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار بود. هر تیمار شامل پنج ظرف شیشه‌ای و در داخل هر ظرف سه عدد کالوس قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام و مقایسه میانگین داده‌ها درصورت معنی‌دار بودن اختلاف داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد ارزیابی شد. همچنین، برای انجام محاسبات آماری و رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل و برای آزمون نرمال بودن اشتباهات آزمایشی از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

کالوس‌زایی

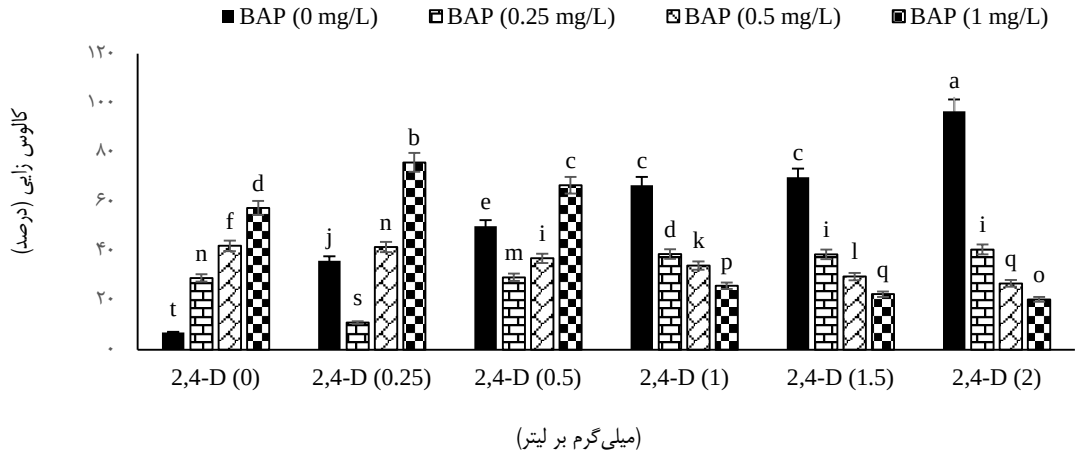
نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP و نیز اثر متقابل این دو فاکتور بر درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس‌های تشکیل‌شده و میانگین قطر کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس صفات کالوس‌زایی از طریق ریزنمونه برگ در کشت درون‌شیشه‌ای آب‌بشقابی

		میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر کالوس	میانگین قطر کالوس	درصد کالوس‌زایی
2,4-D	۵	۱/۱۹۸۲ **	۱/۴۳۰۷ **	۲۳۸/۸۶ **
BAP	۳	۰/۱۵۵۲ **	۲/۰۲۷۵**	۱۹۲۷/۵۱ **
2,4-D×BAP	۱۵	۲/۷۰۴۸**	۲/۱۴۹۱ **	۱۶۵۱/۳۸ **
خطای آزمایش	۴۸	۰/۰۱۸۸	۰/۰۲۲۱	۱۳/۰۵۴
ضریب تغییرات (درصد)	–	۵/۸۱۰۸	۷/۵۹۶۵	۸/۷۲۹

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری دو هورمون 2,4-D و BAP نشان داد که تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D دارای بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۶/۶۱ درصد) بود که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با سایر تیمارها داشت (شکل ۱). کمترین مقدار درصد کالوس‌زایی مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۱).

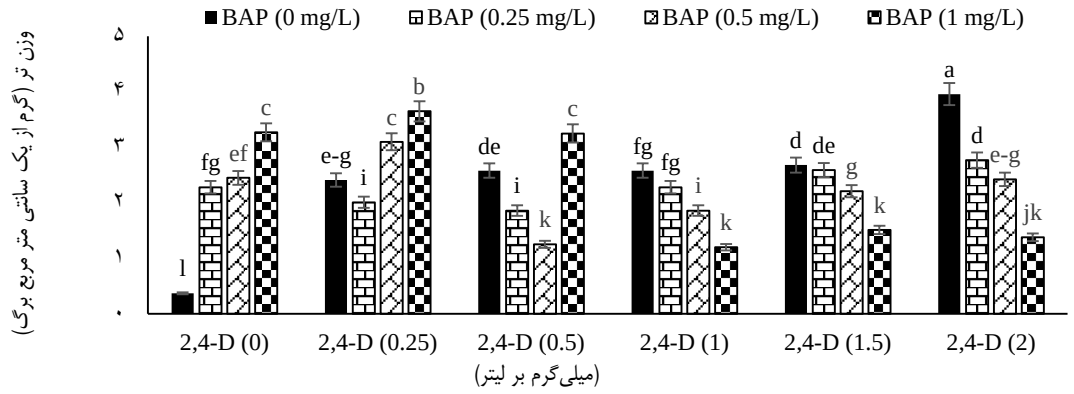


شکل ۱. مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در محیط‌های کشت دارای 2,4-D و BAP در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی آب‌بشقابی. حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، بر اساس آزمون دانکن، می باشد. (منبع: یافته های تحقیق)

مطابق شکل ۱ با افزایش غلظت 2,4-D از غلظت صفر تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر درصد کالوس‌زایی افزایش پیدا کرد. تیمار 2,4-D باعث تشکیل کالوس‌های سفید مایل به خاکستری و جنین‌زا شد که دارای بافت نرمی بودند (شکل ۲ الف). تیمارهای BAP به‌تنهایی موجب تشکیل کالوس‌های سبز و سفت شد (شکل ۲ ب) و در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP آثار تشکیل شاخساره روی کالوس‌ها مشاهده شد (شکل ۲ ج). در تیمارهای ترکیبی که غلظت 2,4-D بیشتر از BAP بود، کالوس‌ها سیاه شدند که اجسام شبه جنین بر روی آن‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۲ د) و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP کالوس‌هایی تشکیل شد که آثار ریشه‌زایی در آن‌ها مشاهده می‌شد (شکل ۲ ه). در تیمارهایی که غلظت BAP بیشتر از 2,4-D بود کالوس‌های تردی تشکیل شد که دارای رنگ زرد مایل به قهوه‌ای بودند و در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D آثار شاخساره روی آن‌ها مشاهده می‌شد (شکل ۲ و).

شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D به‌تنهایی و یا در ترکیب با BAP بر صفات مورفولوژیکی کالوس .(الف) کالوس‌های جنینی‌زای رشد یافته در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D، (ب) کالوس‌های رشد یافته در محیط MS حاوی BAP، (ج) کالوس‌هایی با آثار شاخساره در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، (د) کالوس‌های سیاه با اجسام شبه جنین در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، (ه) کالوس‌های ریشه‌زای رشد یافته در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، (و) کالوس‌هایی با آثار شاخه‌زایی رشد یافته در محیط MS حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP. (منبع: یافته‌های تحقیق).

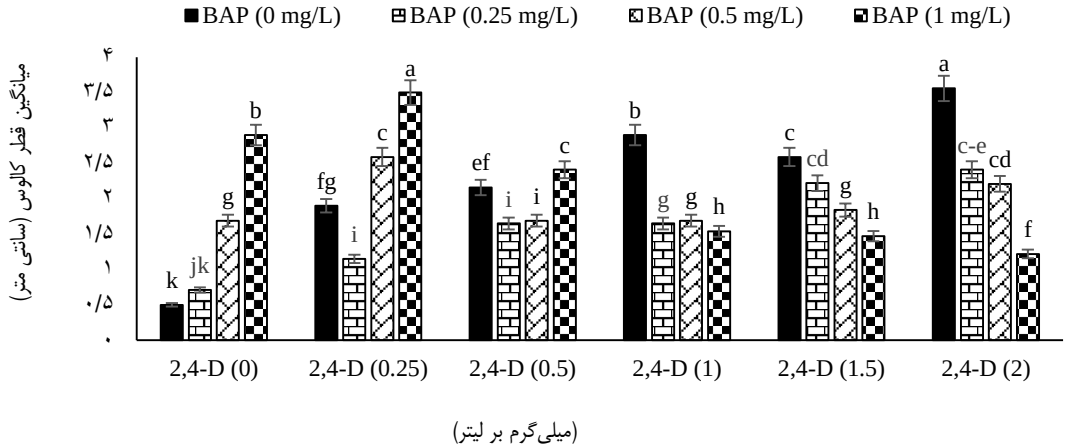
نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری دو هورمون 2,4-D و BAP نشان داد که تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D دارای بیشترین وزن تر کالوس (۳/۹۶ گرم از یک سانتی‌متر مربع برگ) بود که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با سایر تیمارها داشت. کمترین مقدار وزن تر کالوس‌ها از تیمار شاهد به‌دست آمد (شکل ۳).



شکل ۳. میانگین وزن تر کالوس در محیط‌های کشت دارای 2,4-D با BAP در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی آب‌بشقابی. حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، بر اساس آزمون دانکن، می باشد. (منبع: یافته های تحقیق).

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، تیمار 2,4-D از غلظت ۰ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش وزن تر کالوس‌های حاصل از برگ آب‌بشقابی شد. تیمار BAP به تنهایی از غلظت ۰ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش وزن تر کالوس‌ها شد. در تیمارهای که غلظت BAP بیشتر از 2,4-D بود با افزایش میزان BAP وزن تر کالوس نیز افزایش پیدا کرد.

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری دو هورمون D-۲،۴ و BAP نشان داد که تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر D-۲،۴ دارای بیشترین میانگین قطر کالوس (۳/۵۶ سانتی‌متر) بود که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر D-۲،۴ نداشت. کمترین مقدار میانگین قطر کالوس از تیمار شاهد به‌دست آمد. (شکل ۴).



شکل ۴. میانگین قطر کالوس در محیط‌های کشت دارای 2,4-D با BAP در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی آب‌بشقابی. حروف مشابه حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، بر اساس آزمون دانکن، می باشد. (منبع: یافته های تحقیق)

مطابق با شکل ۴، تنظیم‌کننده رشد 2,4-D با افزایش از غلظت صفر تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش میانگین قطر کالوس شد. تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA باعث افزایش میانگین قطر کالوس شد. همچنین افزایش غلظت BAP از صفر تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر به تنهایی، باعث افزایش میانگین قطر کالوس شد. در تیمارهای ترکیبی2,4-D و BAP با افزایش غلظت 2,4-D نسبت به BAP، به‌تدریج قطر کالوس کاهش پیدا کرد. در تمامی تیمارهای اندازه‌گیری شده کمترین میانگین قطر کالوس مربوط به تیمار شاهد بود. نتایج این پژوهش نشان داد که 2,4-D در کالوس‌زایی اهمیت دارد. افزودن سایتوکینین به محیط غنی از اکسین در مطالعه حاضر باعث افزایش کالوس‌زایی و همچنین میانگین قطر کالوس شد

جنین‌زایی

نتایج تجزیه واریانس داده های جنین زایی نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد جنین‌زایی، درصد جنین‌های جوانه زده و تعداد گیاهچه‌های تولید شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

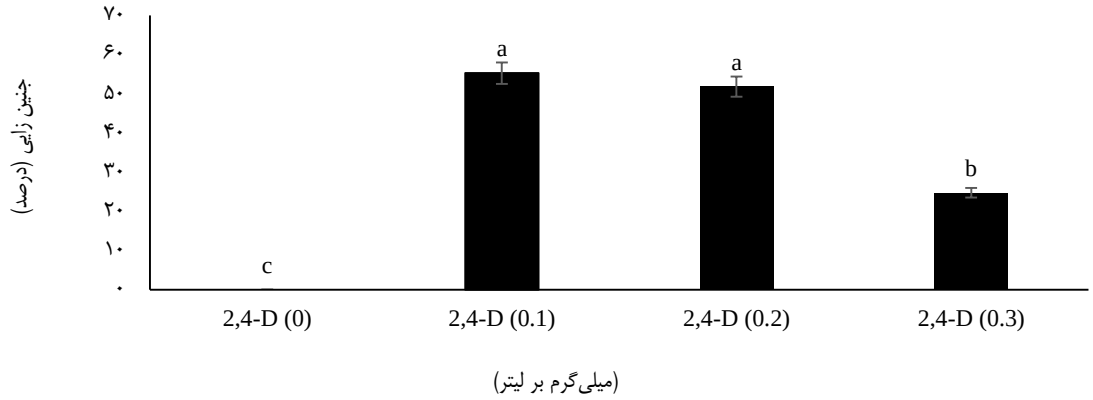
جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس جنین‌زایی از کالوس‌های تشکیل‌شده از ریزنمونه برگ در کشت درون‌شیشه‌ای آب‌بشقابی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد جنین‌زایی	درصد جنین‌های جوانه‌زده	تعداد گیاهچه‌های تولیدشده
BAP	۳	۴۰۱۷/۰۸**	۱۱۸/۹۸**	۲۵۱۲/۸۷**
خطای آزمایش	۲۰	۲۰/۲۶۷	۰/۸۷۵	۵/۱۶۵۶
ضریب تغییرات (درصد)	–	۱۳/۶۵۵	۱۱/۷۶۶	۵/۶۱۸

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

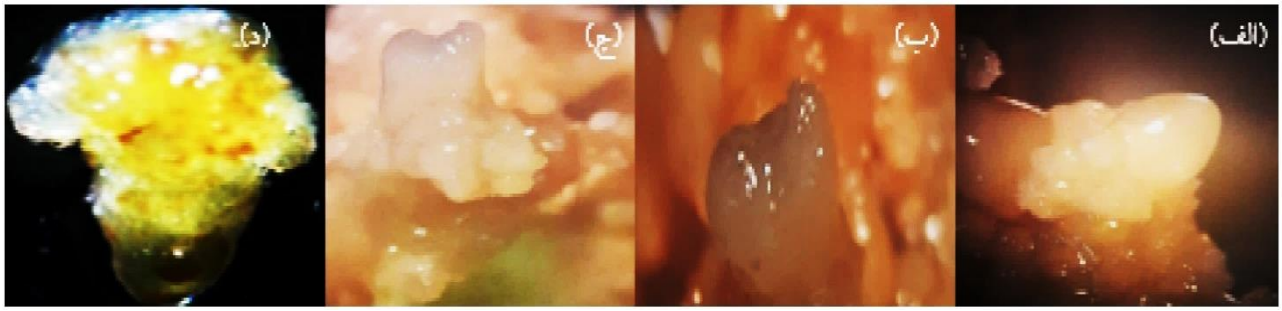
درصد جنین‌زایی

نتایج مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی نشان داد که تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D دارای بیشترین درصد جنین‌زایی (۵۵/۲۷ درصد) بود که با تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نداشت. زمانیکه غلظت 2,4-D افزایش پیدا کرد درصد جنین‌زایی با کاهش روبه رو شد. در تیمار شاهد هیچ گونه جنینی از کالوس‌ها تشکیل نشد (شکل ۵).



شکل ۵. میانگین درصد جنین‌زایی از کالوس‌های ریزنمونه برگ آب‌بشقابی در غلظت‌های مختلف 2,4-D در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی آب‌بشقابی. حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، بر اساس آزمون دانکن، می باشد. (منبع: یافته های تحقیق)

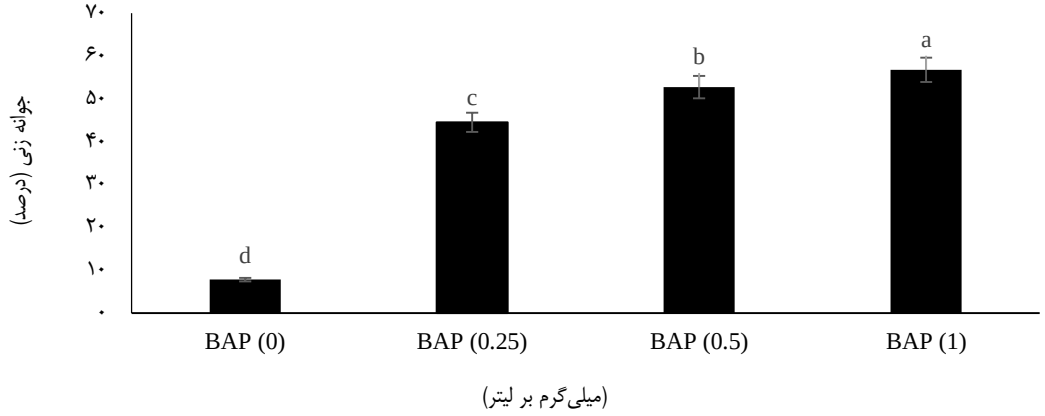
در پژوهش ما با انتقال جنین‌های قلبی شکل حاصل از تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به محیط کشت بدون هورمون جنین اژدری شکل تولید شد. مراحل مختلف جنین‌زایی در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶. مراحل مختلف جنین‌زایی سوماتیکی در محیط کشت در گیاه آب‌بشقابی. (الف) جنین در مرحله کروی شکل در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D . (ب) جنین سوماتیکی در مرحله قلبی شکل در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D . (ج) جنین سوماتیکی در مرحله اژدری شکل در محیط کشت MS. (د) جنین‌سوماتیکی در مرحله کوتیلدونی در محیط کشتMS . (منبع: یافته های تحقیق).

درصد جوانه‌زنی

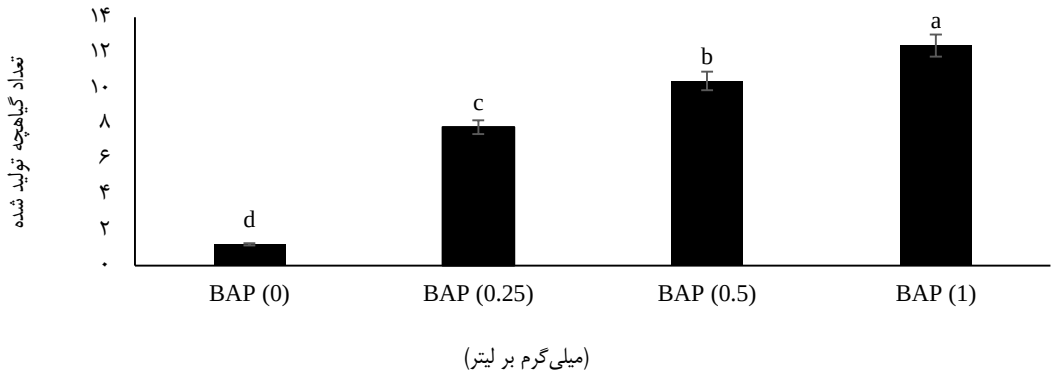
نتایج تجزیه واریانس داده های جوانه‌زنی نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف BAP بر درصد جوانه‌زایی و تعداد گیاهچه‌های تولید شده در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف BAP بر درصد جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی نشان داد (شکل ۷) که تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP تأثیر بهتری بر روی جوانه‌زنی جنین‌ها داشت و دارای بیشترین درصد جوانه‌زنی (۵۸/۸ درصد) از کالوس‌های جنینی بود، همچنین از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با سایر تیمارها داشت. همان‌طور که در شکل ۷ دیده می‌شود با افزایش غلظت BAP از ۰ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر جوانه‌زنی‌به میزان یک درصد افزایش یافته است و کمترین درصد جوانه‌زنی از کالوس‌ها مربوط به تیمار شاهد بود.



شکل ۷. میانگین درصد جوانه‌زنی جنین‌ها در محیط‌های کشت دارای BAP در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی آب‌بشقابی. حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، بر اساس آزمون دانکن، می باشد. (منبع: یافته های تحقیق)

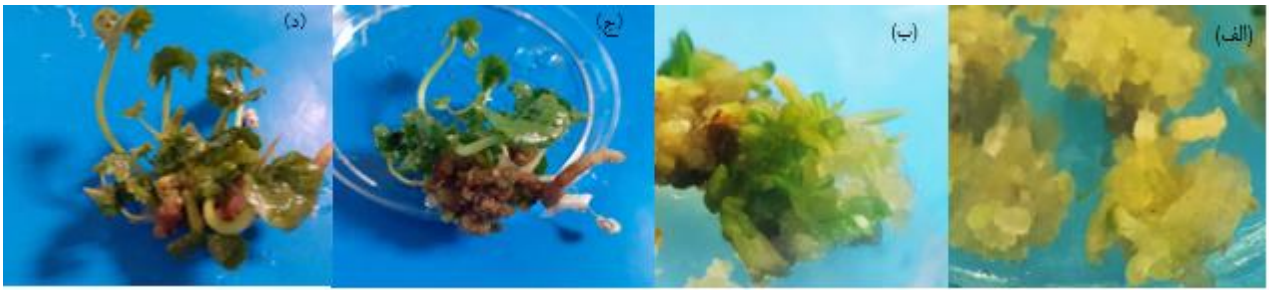
تعداد گیاهچه تولید شده

نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف BAP روی رشد جنین‌های سوماتیکی نشان داد (شکل ۸) که تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP تأثیر بهتری بر روی رشد جنین‌ها داشت و دارای بیشترین میانگین تعداد (۱۲/۴) گیاهچه‌های تولیدشده روی کالوس‌های جنینی بود.



شکل ۸. میانگین تعداد گیاهچه تولید شده در محیط‌های کشت دارای BAP در کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه دارویی آب‌بشقابی. حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، بر اساس آزمون دانکن، می باشد. (منبع: یافته های تحقیق)

جوانه‌های تشکیل شده در تیمار شاهد، تبدیل به گیاهچه‌هایی با برگ‌های سبز روشن شدند که دارای تعداد کمی ریشه بودند و سازگاری خوبی در محیط آزمایشگاهی از خود نشان ندادند. مراحل مختلف جنین‌زایی سوماتیکی در شکل (۹) نشان داده شده است.



شکل ۹. جوانه‌زنی جنین‌های تشکیل شده. (الف) و (ب) جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، (ج) و (د) گیاهچه‌های تولید شده. (منبع: یافته های تحقیق)

شکل ۱۰. مراحل مختلف سازگاری گیاهچه‌های تولید شده از جنین‌های سوماتیکی برگ گیاه آب‌بشقابی. (الف) و (ب) گیاهچه تولید شده. (ج) سازگارسازی گیاهچه‌های تولید شده و (د) انتقال به شرایط گلخانه‌ای. (منبع: یافته های تحقیق)

بحث

در پژوهش حاضر استفاده از اکسین برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا رضایت بخش بود. نتایج پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده است که محیط کشت دارای 2,4-D یکی از مناسب‌ترین محیط‌ها برای القای کالوس جنین‌زا در بسیاری از گونه‌های گیاهی است چون اکسین خارجی باعث افزایش اکسین درونی در گیاهان می‌شود (Michalczuk *et al*, 1992). در یک مطالعه ریزنمونه‌های برگ آب‌بشقابی بعد از سه هفته در محیط کشت MS به همراه غلظت‌های مختلف BAP و NAA تشکیل کالوس‌های سبز و فشرده وجنین‌زا دادند ولی در ترکیب این دو تنظیم‌کننده رشد، کالوس‌زایی ضعیفی مشاهده شد (Bibi *et al*., 2011) با این حال اضافه کردن NAA به محیط کشت MS حاوی کاینتین و یا BAP باعث کاهش تشکیل کالوس گردید (Patra *et al*., 1998). در حالی که بهترین پاسخ ریزنمونه‌های برگ بر روی محیط MS حاوی BAP یا کاینتین همراه با 2,4-D مشاهده شد، اما زمانی که محیط‌ها با BAP و NAA ترکیب شدند، تشکیل کالوس خوبی مشاهده نشد (Martin, 2004). در گزارشی دیگر ترکیب BAP و NAA بعنوان بهترین تیمار برای کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ گیاه آب‌بشقابی پیشنهاد شد (Khan *et al*., 2022). ازآنجایی‌که تنظیم‌کننده رشد BAP باعث فعالیت کمتر آنزیم لیپوکسیژناز[1]شده و از تخریب کلروفیل و دیواره سلولی جلوگیری می‌کند (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2014) به نظر می‌رسد رنگ سبز پینه‌ها و همچنین سفتی بافت کالوس در حضور BAP به همین علت باشد. اکسین سنتتیک باعث افزایش اکسین درونی گیاه می‌شود و این امر سبب می‌شود تا تولید فیتوهورمون اتیلن در گیاه افزایش یابد که آن نیز به‌نوبه خود سبب تولید آبسزیک‌اسید می‌شود (Grossmann, 2000). آبسزیک‌اسید به عنوان مهارکننده رشد گیاه در نظر گرفته می‌شود و معمولاً به‌عنوان مهار کننده رشد در کشت گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sharp *et al*., 2000)، احتمالاً به همین دلیل استفاده از اکسین به‌تنهایی باعث تولید پینه‌های سیاه شد. کاربرد اکسین 2,4-D تأثیر مثبتی روی ایجاد کالوس و حتی وزن‌تر کالوس نشان داد، تاجایی که با افزایش غلظت این اکسین، وزن تر کالوس نیز افزایش یافت. در این رابطه Martin (2004) گزارش نمود بین غلظت‌های صفر تا سه میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، از غلظت صفر تا دو میلی‌گرم در لیتر وزن تر کالوس افزایش یافت و بعد از آن رو به کاهش گذاشت که تا حدودی با پژوهش ما همخوانی دارد. ویژگی مهم دیواره سلول‌های در حال رشد آن است که این سلول‌ها در pH اسیدی در مقایسه با pH خنثی بسیار سریع‌تر توسعه می‌یابند (Rayle & Cleland, 1992)، این پدیده، رشد اسیدی نامیده می‌شود. اکسین با اسیدی کردن دیواره و سست شدن آن به طویل شدن آن کمک می‌کند (Taiz & Zieger, 2010). همچنین، گزارش شده است که 2,4-D یک محرک قوی برای تقسیم سلولی است (Campanoni & Nick, 2005). نتایج نشان داده که سایتوکینین‌ها در محیط‌های دارای اکسین موجب تکثیر سلولی و طویل شدن سلول‌های گیاهی در گیاهان عالی می‌شود (Taiz & Zieger, 2003). نتایج Birader (2017) مطابق با نتایج آزمایش حاضر گزارش شده است که افزایش غلظت 2,4-D از ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش درصد کالوس‌زایی آب‌بشقابی از طریق برگ شد و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D دارای بیشترین درصد جنین‌زایی (۵۵/۲۷ درصد) بود (Birader, 2017). دراین‌باره نتایج Martin (2004) نشان داد که بیشترین درصد جنین‌زایی (۸۸/۲ درصد) با انتقال کالوس‌های برگ آب‌بشقابی تشکیل‌شده از تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کاینتین، به محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین حاصل می‌شود که این نشان می‌دهد که با کاهش میزان تنظیم‌کننده‌های رشد مراحل تکامل رشد جنین‌ها بهبود می‌یابد.

اگرچه روند القای جنین از سلول‌ها در کالوس کاملاً درک نشده است، اما امروزه عموماً اعتقاد بر این است که ادامه حضور اکسین، باعث تغییر در بیان ژن و احتمالاً با افزایش دی‌متیلاسیون DNA توده‌های جنینی[2]همراه است. تحت این شرایط توده‌های جنینی درون کالوس‌ها، ژن‌های لازم برای تکمیل مرحله کروی جنین‌زایی را سنتز می‌کنند (LoSchiavo *et al*.,

1Lypoxgenase

2 Proembryogenic mass

1989). در یک پژوهش روی جنین‌زایی سوماتیکی آب‌بشقابی از طریق برگ نشان داده شد که کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D باعث تشکیل کالوس‌های به‌ظاهر جنین‌زا می‌شود که با انتقال این کالوس‌ها به محیط کشتی که میزان 2,4-D آن کاهش یافته (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، مرحله کروی شکل جنین حاصل از کالوس آغاز می‌شود (Joshee *et al*., 2007) که با نتایج پژوهش ما همخوانی دارد. جنین‌زایی اغلب در مقادیر غلظت‌های بالای اکسین آغاز می‌شود و با کاهش غلظت آن یا عدم حضور کامل آن باعث بلوغ می‌شود (Epstein *et al*., 1977). اکسین باعث تشکیل جنین در قسمتی از سلول‌های کالوس یا کشت‌های سوسپانسیونی می‌شود، اما درعین‌حال ممکن است مانع تقسیم سلولی این نوع سلول‌ها نیز شود (Sharp *et al*., 1980). در گزارشی با حضور اکسین در محیط کشت، مرحله اژدری در جنین‌های تشکیل‌شده از کالوس برگ اتفاق نیفتاد ولی با انتقال جنین‌ها در مرحله قلبی شکل به محیط کشت بدون هورمون و روشنایی، مراحل جنینی تکامل پیدا کرد که با نتایج پژوهش ما همخوانی دارد (Joshee *et al*., 2007). گزارش شده است که جنین‌های تشکیل‌شده از کالوس برگ آب‌بشقابی در تاریکی برای تکامل مراحل رشدی خود به روشنایی نیاز دارند (Martin, 2004). گزارش‌ها نشان می‌دهد که 2,4-D به عنوان یک عنصر محرک برای القای جنین‌زایی سوماتیکی عمل می‌کند. گزارش‌های دیگر حاکی از آن است که اکسین در ترکیب با سایتوکینین‌ها نقش حیاتی در القای جنین‌زایی سوماتیک دارد (Yong-Wook *et al*., 2000). جنین‌های سوماتیکی بسیاری از گونه‌ها قابلیت جوانه‌زنی دارند و در محیط القایی خود می‌توانند جوانه بزنند. در موارد اندکی، لازم است که جنین‌ها به محیط کشت تازه که اکسین از آن حذف شده و فقط حاوی سایتوکینین است، منتقل شوند. که در پژوهش ما نیز جوانه‌زنی زمانی صورت پذیرفت که اکسین از محیط کشت حذف شده بود (George & Sherrington, 1984). در پژوهش حاضر، محیط کشت دارای تنظیم‌کننده رشد BAP منجر به جوانه‌زنی شد و تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP دارای بیشترین درصد جوانه‌زنی (۵۸/۸) بود که با یافته‌های Arora *et al*. (1999) مطابقت داشت. در پژوهشی از غلظت‌های مختلف BAP برای جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی آب‌بشقابی استفاده شد و نتایج نشان داد که با افزایش غلظت BAP از ۰ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر میزان جوانه‌زنی (۴۳ درصد) افزایش یافت ولی در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر با کاهش درصد جوانه‌زنی همراه بود (Hanumantharaya, 2009). همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت BAP از ۰ تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر تعداد بیشتری جنین به گیاهچه تبدیل شد. همسو با نتایج پژوهش ما نشان داده شده است که افزایش غلظت BAP از ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تعداد جنین‌های تشکیل‌شده می‌شود (Martin, 2004).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه آب‌بشقابی یک گیاه رونده است، کنترل آلودگی‌های مختلف سطحی و داخلی آن در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای مشکل است. استفاده از نوک ساقه رونده به عنوان ریزنمونه اولیه برای دست‌یابی به گیاهان عاری از آلودگی و بیماری، فوق‌العاده رضایت‌بخش بود و مراحل بعدی کار یعنی استفاده از ریزنمونه برگ جهت کالوس‌زایی را بسیار آسان نمود. استفاده از تنظیم‌کننده 2,4-D به عنوان اکسین در ایجاد کالوس‌های جنین‌زا نتایج خوبی در پی‌داشت. القای جنین‌های سوماتیکی با غلظت‌های کمتر 2,4-D به‌ویژه در مراحل کروی و قلبی شکل کارایی بیشتری داشت ولی در این تیمارها مرحله اژدری شکل تشکیل نشد که با انتقال به محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد و همچنین شرایط روشنایی، مرحله اژدری‌شکل نیز مشاهده شد. برای جوانه‌زنی جنین‌ها، استفاده از تنظیم‌کننده رشد BAP نتیجه‌بخش بود. در این پژوهش جنین‌ها در پی جوانه‌زنی، تشکیل ریشه دادند و برای رشد ریشه‌ها زمان زیادی صرف شد که احتمالاً اگر از تنظیم‌کننده‌های رشد مثل IBA و NAA بعد از جوانه‌زنی استفاده می‌شد مدت‌زمان ریشه‌دهی کوتاه‌تر می‌شد. سازگار کردن گیاهچه‌ها در شرایط آزمایشگاهی روند خوبی در پی داشت ولی در شرایط نور شدید گیاهان دچار آفتاب‌سوختگی شدند که با توجه به طبیعت گیاه آب‌بشقابی که یک گیاه سایه‌پسند است استفاده از پوشش به عنوان سایه‌انداز مشکل آفتاب‌سوختگی را رفع کرد.

منابع

تقی زاده، میترا؛ یاسا، نرگس؛ نقی نژاد، علیرضا و اهوازی، مریم. (۱۳۸۳). بررسی گیاه دارویی آب بشقابی (*Centella asiatica* (L.) Urban). *فصلنامه گیاهان دارویی*، ۳(۱۲)، ۸-۱.

Arora, D. K., Sun, S. S., Ramawat, K. G., & Merillon, J. M. (1999). Factors affecting somatic embryogenesis in long term callus cultures of 'safed musli' (*Chlorophytum borivilianum*), an endangered wonder herb. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(1), 75-82.

Bajguz, A., & Piotrowska-Niczyporuk, A. (2014). Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, monosaccharide and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80(5), 176-183.

Bibi, Y., Zia, M., Nisa, S., Habib, D., Waheed, A., & Chaudhary, F. M. (2011). Regeneration of *Centella asiatica* plants from non-embryogenic cell lines and evaluation of antibacterial and antifungal properties of regenerated calli and plants. *Journal of Biological Engineering*, 5(1), 1-8.

Biradar, S. 2017. Regeneration of medicinally important plant *Centella asiatica* L. by somatic embryogenesis. *Journal of Medicinal Plants*, 7 (3), 5-6 (Suppl) DOI: 10.4172/2167-0412-C1-012.

Biswas, D., Mandal, S., Chatterjee Saha, S., Tudu, C. K., Nandy, S., Batiha, G. E. S., & Dey, A. (2021). Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology, and toxicity of *Centella asiatica* (L.) Urban: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 35(12), 6624-6654.

Campanoni, P., & Nick, P. (2005). Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology*, 137(3), 939-948.

Devkota, A., Dall'Acqua, S., Comai, S., Innocenti, G., & Jha, P. K. (2010). *Centella asiatica* (L.) urban from Nepal: Quali-quantitative analysis of samples from several sites, and selection of high terpene containing populations for cultivation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(1), 12-22.

Epstein, E., Kochba, J., & Neumann, H. (1977). Metabolism of indoleacetic acid by embryogenic and non-embryogenic callus lines of «Shamouti» orange (*Citrus sinensis* OsB.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 85(3), 263-268.

Fetrow, C. W., & Avila, J. R. (2001). *Professional's Hand Book of Complementary & Alternative Medicines*. Springhouse Corporation.

George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics Ltd., Eversley.

Ghiulai, Roxana, Oana Janina Roşca, Diana Simona Antal, Marius Mioc, Alexandra Mioc, Roxana Racoviceanu, Ioana Macaşoi et al. "Tetracyclic and pentacyclic triterpenes with high therapeutic efficiency in wound healing approaches." *Molecules* 25, no. 23 (2020): 5557.Hanumantharaya, B. G. (2009). *Studies on in vitro regeneration and mutagenesis in Centella asiatica (L.) urban*. [Doctoral dissertation, Bangalore University].

Grossmann, Klaus, and Hauke Hansen. (2001). Ethylene-triggered abscisic acid: a principle in plant growth regulation?. *Physiologia plantarum*, 113(1), 9-14.

Hesami, M., Naderi, R., Yoosefzadeh-Najafabadi, M., & Maleki, M. (2018). In vitro culture as a powerful method for conserving Iranian ornamental geophytes. *Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 99(1),104-120.

Jalili, A., & Jamzad, Z. (1999). Red data book of Iran; a preliminary survey of endemic, rare & endangered plant species in Iran; *Research Institute of Forest & Rangelands Publication*, Tehran, 750pp. (In Persian).

Joshee, N., Biswas, B. K., & Yadav, A. K. (2007). Somatic embryogenesis and plant development in *Centella asiatica* L., a highly prized medicinal plant of the tropics. *HortScience*, 42(3), 633-

637.
Khan, M. A., Khan, H. M., Ganie, I. B., Kumar, S., Shahzad, A., Celik, I., & Shahid, M. (2022). Anti-quorum sensing, antibiofilm, and antibacterial activities of extracts of *Centella asiatica* L. leaves, and in vitro derived leaves-calli through tissue culture: a potential for biofouling-prevention. *Biofouling*, 38(7), 715-728.
Long, H. S., Stander, M. A., & Van Wyk, B. E. (2012). Notes on the occurrence and significance of triterpenoids (asiaticoside and related compounds) and caffeoylquinic acids in *Centella* species. *South African Journal of Botany*, 82, 53-59.
LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Tort G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, ... Terzi M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(12), 325-331.
Martin K. P. (2004). Plant regeneration through somatic embryogenesis In medicinally important *Centella asiatica* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40(4), 586–591.
Mercy, S., Sangeetha, N., & Ganesh, D. (2012). In vitro production of adventitious roots containing asiaticoside from leaf tissues of *Centella asiatica* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48, 200-207.
Michalczuk, L., Ribnicky, D. M., Cooke, T. J., & Cohen, J. D. (1992). Regulation of indole-3-acetic Acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, 100(3), 1346-1353.
Pandey, N. K., Tewari, K. C., Tewari, R. N., Joshi, G. C., Pande, V. N., & Pandey, G. (1993). Medicinal plants of Kumaon Himalaya and strategies for conservation. In U. Dehr (Ed.), *Himalayan Biodiversity: Conservation Strategies* (pp. 293-302). Himavikas Publication, Gyanodaya Prakashan.
Paramageetham, C. H., Prasad babu, G., & Rao, J. V. S. (2004). Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and neutraceutical plant of India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(5), 19-24.
Patra, A., Rai, B., Rout, G. R., & Das, P. (1999). Successful plant regeneration from callus cultures of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. *Plant Growth Regulation*, 24, 13-16.
Perera, P. K., Meedeniya, A. C. B., & Chamikara, N. H. A. (2021). Traditional Medicinal Plants of Sri Lanka and Their Derivatives of Benefit to the Nervous System. In D. C. Agrawal & M. Dehanasekaran (Eds.), *Medicinal Herbs and Fungi*. Springer, Singapore.
Rayle, D. L., & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4), 1271-1274.
Sehgal, C. B., & Abbas, N. S. (1994). Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl tissue of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. *Phytomorphology*, 44(5), 265-271.
Sharma, A., Shanker, C., Tyagi, L. K., Singh, M., & Rao, C. V. (2008). Herbal medicine for market potential in India: an overview. *Academic Journal of Plant Sciences*, 1(2), 26-36.
Sharp, R. E., LeNoble, M. E., Else, M. A., Thorne, E. T., & Gherardi, F. (2000). Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1575-1584.
Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., ... & Liu, T. (2020). Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 11(8), 568032.
Taghizadeh, M., Ahvazi, M., & Naghinegade, A. (2010). Determination of growth and distribution of *Centella asiatica* in the Anzali lagoon. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (Supplement 2), 66-66. (In Persian).
Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Plant physiology fifth edition. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Assosiates inc., puplishers. The second volume. 321 p.
Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Hoge, J. H. C., & Ten Hoopen, H. J. G. (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10-11), 2307-2310.
Yong-Wook, K. (2000). Somatic embryogenesis in Quercus acutissima. In S. M. Jain, P. K. Gupta

& R. J. Newton (Eds.), *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 6(pp. 671-685). Springer-Science + Business Media