Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 2, Summer 2020 (287-294)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.269447.1538

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۲۹۴-۲۸۷)

اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی گیاه دارویی پنیرباد (*Withania coagulans*)

آی سن قهرمانی[۱]، ابراهیم گنجی مقدم[۲*]، مریم تاتاری[۳] و سوسن خسرویار[٤]
۱. دانشجوی دکترای، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیروان
۲. دانشیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
۳. استادیار، گروه فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیروان
٤. استادیار، گروه مهندسی نفت، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قوچان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۷)

چکیده

به‌منظور ارائه یک روش سریع و کارآمد برای تکثیر گیاه دارویی پنیرباد (*Withania coagulans*) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی انجام گرفت. در ابتدا بذرهای جمع‌آوری‌شده از رویشگاه طبیعی در استان سیستان و بلوچستان استریل شده و روی محیط کشت MS قرار گرفتند. سپس به‌منظور شاخه‌زایی، ریز نمونه تک گره، روی محیط کشت پایه MS حاوی بنزیل آمینوپورین در پنج سطح صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کشت گردید. در مرحله ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها به محیط کشت MS حاوی ایندول بوتیریک اسید در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر و نفتالین استیک اسید در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر منتقل شدند، همچنین تیمار شاهد (عدم کاربرد هورمون) در نظر گرفته شد. در نهایت، به‌منظور سازگاری، گیاهچه‌های ریشه‌دار به مدت ۳۰ روز در اتاق سازگاری نگهداری گردیدند. بیشترین ضریب تکثیر، تعداد شاخه و تعداد برگ در تیمار بنزیل آمینوپورین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد با ۹۰ درصد ریشه‌زایی، در تیمار ایندول بوتیریک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. در نهایت با انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به خاک، ۸۰ درصد آن‌ها بقاء خود را حفظ نمودند. به‌طور کلی، برای تولید گیاهچه‌های قوی و شاداب، کاربرد بنزیل آمینوپورین و ایندول بوتیریک اسید در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب برای شاخه‌دهی و ریشه‌زایی مطلوب، توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ایندول بوتیریک اسید، بنزیل آمینوپورین، ریز ازدیادی.

Effect of type and concentration of growth regulators on the proliferation and marcotting of *Withania coagulans* medical plant

Aysan Ghahremani[1], Ebrahim Ganji Moghadam[2*], Maryam Tatari[3] and Susan Khosroyar[4]
1. Ph.D. Candidate, Faculty of Agriculture, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran
2. Associate Professor, Department of Crop and Horticultural Science Research, Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Crop Physiology, Faculty of Agriculture, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran
4. Assistant Professor, Department of Chemical and Petroleum Engineering, Faculty of Science, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
(Received: Nov. 29, 2018 - Accepted: Apr. 6, 2019)

ABSTRACT

In order to provide a rapid and useful method for propagation of *Withania coagulans* medical plant under *in-vitro* condition was conducted based on completely randomized design experience in tissue culture laboratory of Agricultural Research Center of Khorasan Razavi Province. At first, sterilized seeds are placed in MS media (collected from natural habitat in Sistan and Baluchistan Province). Then for shoot regeneration internode subculture placed in MS media, including Benzylaminopurine (BAP) in 5 levels (0, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L). In step 2, for root regeneration placed in MS media in including indole-3-butyric acid (IBA) in 4 levels 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L and Naphthaleneacetic acid (NAA) in 0.5, 1, 1.5, 2 mg/L), also, control treatment (non-application of hormone) was considered. Finally, in order to adapt to seedling, they were kept in an adaptive room for 30 days. The highest proliferation index, number of branches, and number of leaf belong to 0.5 mg/L BAP treatment and the best concentration of growth regulators with 90% marcotting was in the treatment of IBA at 0.5 mg/L concentration. Finally, by transfer of regenerated explants to the soil, 80 percent of them survived. In general, for the production of strong and succulent seedlings, the use of BAP and IBA at 0.5 mg/L concentration is recommended for branching and marcotting, respectively.

Keywords: Benzylaminopurine, indole butyric acid, micropropagation.

* Corresponding author E-mail: eganji@hotmail.com

مقدمه

گیاه پنیرباد (Ashwagandha) *Withania coagulans* متعلق به تیره سیب‌زمینی (Solanaceae) با عدد کروموزومی 2n=48 و بومی نواحی شرقی مدیترانه تا جنوب آسیا است. ویتانیا (*Withania*) دارای ۲۳ گونه‌گیاهی است که دو گونه *W. somnifera* و *W. coagulans* از نظر دارویی و اقتصادی منحصر به فرد می‌باشند. این گیاه در قسمت جنوب شرقی سیستان و بلوچستان یافت می‌شود (Valizade *et al*., 2015). برگ‌های این گیاه چرمی، سخت، نیزه‌ای و سبز رنگ و شاخه‌های این گیاه منشعب و سفید رنگ می‌باشند. این بوته جنگلی در تمام فصول سال سبز و در اوایل تابستان میوه‌های کروی و زردرنگ آن می‌رسد. تاکنون ۱۲ نوع آلکالوئید و بیش از ۳۵ نوع ویتانوئید و تعدادی گلیکوویتانوئید (Glycovitanoida) به نام سیتواویندوزید (Cytvaindoside) از اندام هوایی، ریشه و میوه دو گونه دارویی *W. somnifera* و *W. coagulans* جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. خواص دارویی این گیاه به دلیل حضور گروهی از لاکتون‌های استروئیدی معروف به ویتانولوئیدهای موجود در برگ‌ها و ریشه آن می‌باشد، مهم‌ترین انواع ویتانوئیدهای موجود در این گونه ویتافرین A (Vitaphrin A)، ویتانوئید A(Vitonoid A) و ویتانون (Vitanon) می‌باشد (Gupta *et al*., 1996). ویتافرین A موجود در گیاه پنیرباد عامل ضد تومور است و دارای خواص ضدباکتریایی نیز می‌باشد. همچنین عصاره گیاه پنیرباد روی دو گونه آفات انباری مهم و زیان‌آور مثل شپشک آرد و شپشک برنج خاصیت دورکنندگی و کشندگی دارد (Khan *et al*., 2004). از آنجایی‌که که بذر پودر شده این گیاه دارای خاصیت انعقاد شیر می‌باشد به‌عنوان مایه پنیر توسط بومیان استفاده می‌گردد. با توجه به این ویژگی مهم گیاه پنیرباد و این‌که حجم عمده مایه پنیر مورد استفاده در ایران از نوع حیوانی و وارداتی می‌باشد، می‌توان با تولید انبوه گیاه پنیرباد، آن را جایگزین مایه پنیر حیوانی کرد (Valizade *et al*., 2015).

علم بیوتکنولوژی از طریق کشت سلول، بافت یا اندام در شرایط درون‌شیشه‌ای، رویکردی نوین در راستای توسعه روش‌های ریزازدیادی و تولید درون‌شیشه‌ای بسیاری از ترکیبات دارویی می‌باشد. استفاده از تکنیک کشت بافت و باززائی گیاهان دارویی در محیط درون‌شیشه‌ای به‌عنوان یکی از این ابزارها توانسته است گیاهان دارویی با اهمیت و با کیفیت را در حد گسترده‌ای تکثیر نماید که میزان تکثیر در مقایسه با روش‌های سنتی بسیار قابل توجه می‌باشد (Rahamooz-Haghighi *et al*., 2018). ریزازدیادی گیاهان دارویی متعددی همچون پنیرباد (Sabir *et al*., 2012) و آلوئه‌ورا (Hashemabadi *et al*., 2008) با موفقیت انجام و امکان تکثیر سریع و انبوه این گیاهان فراهم گردیده است.

با توجه به ارزش بالای برخی گیاهان جنس سولانوم (Solanum) از نظر دارویی، مطالعاتی روی کشت درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلفی از جمله *S. virginum* L. (Borgato *et al*., 2007) *S. villosum* L. (Kaykha *et al*., 2012) و برخی دیگر گزارش شده است. مشاهده شده است که کشت و تکثیر در محیط درون‌شیشه‌ای می‌تواند به‌وسیله فاکتورهایی از قبیل تنظیم‌کننده‌های رشد تحت تأثیر قرار گیرد. نتایج تحقیق درون‌شیشه‌ای Nahok (2013) نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA (6-Benzyladenine) همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به‌دست آمد. پژوهشگران تأثیر ساکارز، نور و هورمون را بر ریزازدیادی و کشت درون‌شیشه‌ای گیاه پنیرباد مورد بررسی قرار دادند. در آزمایش Nahok (2013) از محیط موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog: MS) و سطوح مختلف هورمون‌های تیدیازورون (Thidiazuron) و بنزیل آمینوپورین (6-Benzlaminopurine: BAP) استفاده شد. بیشترین میزان شاخه‌زایی در سطح ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون بود (Nathiya *et al*., 2013). در پژوهش Farzana *et al*. (2014)، از محیط کشت MS با بنزیل آمینوپورین یک میلی‌گرم در لیتر و کینتین (Kinetin) یک میلی‌گرم بر لیتر استفاده گردید. استفاده از کینتین سبب افزایش تعداد شاخه در زمان کوتاه‌تری گردید. در پژوهش Supe *et al*. (2006) تأثیر

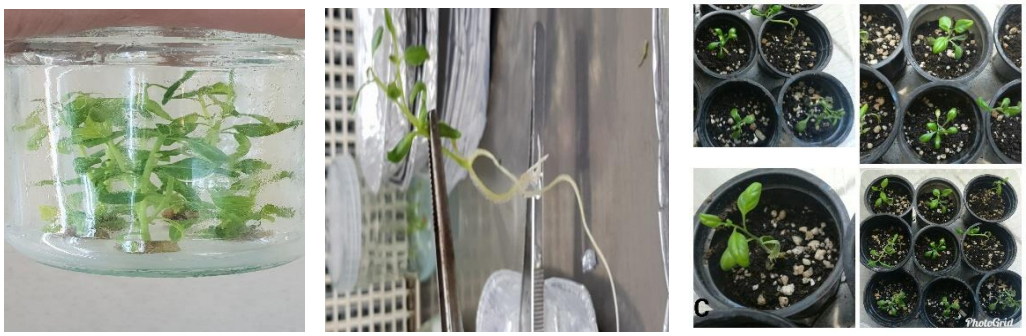
هورمون‌های مختلف را در شاخه‌زایی و ریشه‌زایی بذر پنیرباد مورد بررسی قرار دادند. بنزیل آمینوپورین ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر و ترکیب بنزیل آمینوپورین ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت MS بسیار مؤثر در شاخه‌زایی بود و ۹۰ درصد ریشه‌زایی در محیطی با مقادیر ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر اکسین به دست آمد.

در این پژوهش از تیمارهای هورمونی متفاوت از آنچه که در پژوهش‌های قبلی به‌کاررفته، جهت تعیین مطلوب‌ترین محیط کشت استفاده شده است. با توجه به اهمیت تولید انبوه گیاهان و توسعه کشت این گیاه، این پژوهش با هدف بررسی اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (بنزیل آمینوپورین، نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید) بر پرآوری و ریشه‌زایی پنیرباد و تعیین مطلوب‌ترین محیط کشت هورمونی، انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور تعیین غلظت مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آمینوپورین برای شاخه‌زایی و نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید جهت ریشه‌زایی ریزنمونه‌های گیاه پنیرباد در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی انجام گرفت. نمونه گیاهی اولیه (بذر) از رویشگاه طبیعی این گیاه حوالی زاهدان در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری گردید. به‌منظور ضدعفونی بذور از الکل ۷۰ درصد به مدت پنج دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد (Daryani *et al.*, 2015). سپس در سه مرحله با آب مقطر استریل شستشو و در محیط کشت MS کشت داده شد. پس از آغاز جوانه‌زنی نمونه‌های گیاهی (تک جوانه)، به محیط کشت حاوی بنزیل آمینوپورین در پنج سطح تیماری (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌منظور شاخه‌زایی منتقل گردید. هر تیمار شامل چهار تکرار و در هر تکرار حاوی پنج نمونه گیاهی بود. pH محیط کشت قبل از اتوکلاو روی ۵/۷ تنظیم گردید. انتقال گیاهچه‌ها به محیط کشت جدید هر سه هفته یک‌بار انجام پذیرفت. ظروف کشت در اتاق رشد با ۱۶ ساعت روشنایی در ۲۲ درجه سلسیوس و هشت ساعت تاریکی در ۱۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در مرحله ریشه‌زایی از محیط کشت MS حاوی ایندول بوتیریک اسید (Indole butyric acid: IBA) در چهار غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و نفتالین استیک اسید (Naphthalene acetic acid: NAA) در چهار غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و تیمار شاهد (بدون هورمون) استفاده گردید. پس از ۴۰ روز، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به‌منظور سازگاری به اتاق سازگاری منتقل گردیدند. در این مرحله، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط درون‌شیشه، به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت (۱:۱) منتقل و تحت شرایط رطوبت نسبی ۸۵ درصد، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. در این مرحله، از هفته دوم هوادهی و تغذیه گیاهچه‌ها آغاز شد. در روز اول هوادهی، به مدت پنج دقیقه گیاهچه‌ها را در معرض هوای آزاد قرار گرفتند و به مدت دو هفته هر روز میزان هوادهی افزایش یافت تا این‌که گیاهان به سطحی از سازگاری رسیدند که قابل انتقال به گلخانه بودند. تعدادی از این گیاهان بر اثر خشک‌شدن سریع و پوسیدگی از بین رفتند، با این حال گیاهان با نرخ زنده‌مانی حدود ۸۰ درصد به شرایط محیطی سازگار شدند (شکل ۱). درصد نرخ زنده‌مانی گیاهان از تقسیم تعداد گیاهان زنده به تعداد کل گیاهان انتقال یافته محاسبه گردید.

در این مطالعه، در مرحله شاخه‌زایی که تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد بنزیل آمینوپورین بر طول ساقه، تعداد برگ، ضریب تکثیر (پس از انتقال گیاهچه‌های تولید شده به محیط کشت حاوی هورمون به‌منظور شاخه‌زایی و انجام واکشت‌های متوالی، تعداد زیادی شاخه تولید می‌شود که افزایش تعداد شاخه‌ها در هر واکشت محاسبه می‌گردد) و کیفیت گیاهچه‌ها به‌صورت آزمایش کاملاً تصادفی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت گیاهچه‌ها براساس روش پیشنهادی Ganji Moghadam *et al.* (2008) تعیین گردید.



(a) (b) (c)

شکل ۱. مراحل انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده پنیر باد از محیط درون‌شیشه‌ای به بستر خاک به‌منظور سازگاری.
a) تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین، b) تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید، c) مرحله سازگاری.
Figure 1. Transfer steps of rooted explants of *Withania coagulans* from in-vitro to soil for adaptability.
a) treatment 0.5 mg / L benzylaminopurine, b) treatment 0.5 mg/L indole butyric acid, c) adaptability phase.

بدین صورت به لحاظ کیفیت سه گروه مجزا شدند که گروه اول، شامل ریز نمونه‌های قوی‌الرشد، پرآوری شاخه بدون علائم نکروز مریستم انتهایی، زرد شدن برگ و یا شیشه‌ایی شدن بافت می‌باشند. گروه دوم، کمتر از ۱۵ درصد از شاخه‌های پرآوری علائم نکروزشدن مریستم انتهایی، زردشدن برگ و یا شیشه‌ای‌شدن بافت را نشان می‌دهد. گروه سوم، شامل ریزنمونه‌های ضعیف، ۱۵ تا ۳۰ درصد از شاخه‌های پرآوری علائم نکروزه‌شدن مریستم انتهایی، زردشدن برگ و یا شیشه‌ای‌شدن بافت را نشان می‌دهند. به بیان دیگر، هر چه عدد اختصاص‌یافته پایین‌تر باشد، گیاهچه از کیفیت بالایی برخوردار می‌باشد.

در مرحله ریشه‌زایی تأثیر دو تنظیم‌کننده رشد ایندول بوتیریک اسید و نفتالین استیک اسید، هر کدام در چهار غلظت و تیمار شاهد (بدون هورمون) در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار بر صفات درصد ریشه‌زایی، طول ریشه، وزن خشک و تر ریشه و کیفیت گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری IBM SPSS Statistics 20 استفاده شد. همچنین مقایسه میانگین‌ها برای هر کدام از بخش‌های آزمایش با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر بنزیل آمینوپورین بر شاخه‌زایی

با توجه به جدول تجزیه واریانس مشاهده گردید که تأثیر سطوح مختلف بنزیل آمینو پورین بر صفات ضریب تکثیر، تعداد شاخه، تعداد برگ و کیفیت گیاهچه‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بنزیل آمینوپورین به‌عنوان یک سایتوکنین در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی نقش دارد و اضافه‌کردن آن به محیط کشت سبب باززایی می‌شود (Bagheri *et al.*, 2005).

جدول مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان داد مقادیر مختلف بنزیل آمینوپورین سبب تفاوت معنی‌دار ضریب تکثیر گردید. با افزایش غلظت بنزیل آمینوپروین از میزان ضریب تکثیر کاسته شد، به‌طوری ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۷۷/۲ درصدی نشان داد. کمترین میانگین این صفت در تیمار عدم استفاده از هورمون (۱/۲۵) مشاهده شد (جدول ۲).

امروزه تکثیر درون‌شیشه‌ای یکی از جنبه‌های تجاری تکثیر خزانه‌ای بسیاری از گیاهان بوده و روند رو به افزایشی دارد. اولین مرحله برای پیدا کردن روش مناسب کشت بافت، انتخاب ریز نمونه و ترکیب هورمونی مناسب است. در گیاه تاجریزی بالاترین درصد باززایی شاخساره و بیشترین درصد شاخه‌زایی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP مشاهده شد، ولی افزایش سطح هورمون تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر تا حدودی تأثیر منفی روی باززایی شاخساره داشت (Pashmforosh *et al.*, 2016)، که همراستا با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر بنزیل آمینوپورین بر برخی صفات پنیرباد در مرحله شاخه‌زایی

Table 1. Results of variance analysis of BAP on some traits of *Withania coagulans* in proliferation stage

S.O.V	df	Mean squares			
		Proliferation rate	No. branch per plant	No. leaf per plant	Seedling quality
Treatment	4	0.7931**	0.2859**	2.8695**	0.1864**
Error	15	0.0216	0.0228	0.0619	0.0228
C.V (%)	-	7.19	10.25	6.28	10.20

**: Significant at 1% of probability level. **: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر بنزیل آمینوپورین بر برخی از صفات پنیرباد در مرحله شاخه‌زایی

Table 2. Mean comparison effect of BAP on some traits of *Withania coagulans* in prolifertion stage

BAP concentrations (mg/L)	Proliferation rate	No. branch per plant	No. leaf per plant	Seedling quality
0.5	5.50 a	2.66 a	24.00 a	1.00 b
1	5.00 ab	2.49 a	19.25 ab	1.25 b
1.5	3.75 b	1.38 b	15.75 bc	1.75 ab
2	3.75 b	1.40 b	13.25 b	2.25 a
Control (0)	1.25 c	1.02 b	6.75 d	2.50 a

در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشترک‌اند، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن ندارند (α=۰/۰۱).

In each column contains numbers that have the same letters, no significant difference based on Duncan's multiple test (α = 0.01).

پژوهشگران بیان داشتند که بنزیل آمینوپورین به‌عنوان یک از مفیدترین و مؤثرترین انواع سایتوکینین جهت تکثیر شاخه شناخته شده و می‌تواند غالبیت انتهایی را کاهش و باعث جلوگیری از اثر افزایش انتهایی روی جوانه‌های جانبی و تحریک تشکیل شاخساره‌های جانبی از این جوانه‌ها شود (Bohidar *et al*., 2008).

در تحقیق حاضر غلظت کم BAP شاخه‌زایی را تحریک نمود. این یافته‌ها در مورد باززایی ساقه‌ها با تحقیقات Nikolic (1997) مطابقت دارد. همچنین پژوهشگران تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد را بر ریزازدیادی گیاه پنیرباد مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که کاربرد ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین‌پورین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازون (Thiadiazuron: TDZ) سبب افزایش شاخه‌زایی شد (Nathiya *et al*., 2013). پژوهشگران بیان داشتند که بیشترین درصد شاخه‌زایی در ریز نمونه‌های برگی در تیمارهایی بدون حضور نفتالین استیک اسید دیده شد که سطح متوسط از بنزیل آدنین پورین داشتند، به‌طوری‌که تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید بیشترین تعداد شاخه را در ریز نمونه‌های ایجاد گردد (Sanjida *et al*., 2011). استفاده از ۰/۶ میلی گرم بر لیتر بنزیل آدنین‌پورین و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر اکسین سبب افزایش شاخه‌زایی در گیاه پنیرباد می‌شود (Nathiya *et al*., 2013). استفاده از تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین‌پورین در تاجریزی دارویی باعث باززایی شاخساره در ریز نمونه‌های ساقه و برگ شده است. غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین‌پورین بیشترین تأثیر مثبت را در باززایی شاخساره در همین گیاه داشته است (Supe *et al*., 2006). افزایش تعداد ساقه با افزایش غلظت بنزیل آدنین‌پورین در مطالعات صورت گرفته در گیاه *Lippia alba* نیز مشاهده شده است (Gupta *et al*., 2001).

در بررسی میزان تأثیر تیمارهای اعمال شده بر تعداد برگ نمونه‌هایی مورد مطالعه در این پژوهش، مشاهده شد که استفاده از بنزیل آمینوپورین منجر به افزایش تعداد برگ گردید. به‌طوری‌که در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش ۷۱/۸ درصدی در مقایسه با تیمار شاهد داشت (جدول ۲).

براساس نتایج مقایسات میانگین، بهترین کیفیت گیاهچه متعلق به تیمار بنزیل آمینوپورین با غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر بود که دارای پایین‌ترین میانگین اعداد کیفی بودند، به عبارت دیگر کاربرد تیمار بنزیل آمینوپورین با غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم بر لیتر سبب رشد، شادابی و طراوت بیشتر گیاهچه‌ها شده است. با توجه به مطالعات انجام شده، به‌نظر می‌رسد که گیاه پنیرباد دارای سطح بالایی از هورمون سایتوکنین داخلی باشد و احتمالاً به همین دلیل است که بافت میانگره این گیاه در محیط حاوی مقادیر کمتر بنزیل آمینوپورین به سطح اشباع سایتوکنین می‌رسد و قادر به

باززایی شاخساره می‌باشد. هورمون‌های داخلی نه تنها روی باززایی شاخساره تأثیر دارند بلکه غلظت آن‌ها در طول کشت درون‌شیشه‌ای نیز تغییر می‌کند (Husseini *et al*., 2011). فعالیت تنظیم‌کننده‌های رشدی به غلظت آن‌ها، عوامل محیطی و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه بستگی دارد (Mohtadi & Ghaderian, 2012). بر همین اساس، در پژوهش حاضر کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از این محرک رشد نتایج بهتری در مقایسه با سایر سطوح مورد آزمایش نشان داد.

اثر نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید بر ریشه‌زایی

تأثیر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید بر صفات طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن تر ریشه، درصد ریشه‌زایی و کیفیت گیاهچه‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

در بررسی میزان تأثیر تیمارهای اعمال شده بر طول ریشه، مشاهده شد که افزایش غلظت ایندول بوتیریک اسید تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر روند افزایشی بر طول ریشه داشته و سپس، افزایش غلظت منجر به کاهش میانگین این صفت شد به‌طوری‌که بیشترین میانگین طول ریشه (۷/۱۳ سانتی‌متر) متعلق به تیمار ایندول بوتیریک اسید با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بود که افزایش ۳۱/۵ درصدی در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (جدول ۴). در پژوهشی Otroshy *et al.* (2007) گزارش کردند که تأثیر معنی‌داری از کاربرد ایندول بوتیریک اسید در تعداد ریشه و درصد ریشه‌زایی در گیاه فلفل دلمه‌ای مشاهده نگردید لیکن حضور ایندول بوتیریک اسید در محیط کشت افزایش طول ریشه را باعث می‌گردد که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر می‌باشد. با توجه به شاخص طول ریشه، اعمال تیمارهای ایندول بوتیریک اسید ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، سبب افزایش رشد شده است.

افزایش رشد در تکنیک کشت بافت دارای مزایایی می‌باشد که از جمله می‌توان به افزایش ضریب تکثیر، قوی‌ترشدن گیاهچه و استقرار مناسب آن در گلخانه اشاره کرد (Nathiya *et al*., 2013). اعمال تیمارهای نفتالین استیک اسید نه تنها باعث رشد ریشه نشد بلکه حتی در مقایسه با تیمار شاهد، سبب افت میانگین نیز گردید. به‌عبارت دیگر کاربرد تیمارهای نفتالین استیک اسید تأثیر منفی بر رشد ریشه داشت. ریشه‌هایی که در حضور نفتالین استیک اسید به‌وجود آمدند به‌خصوص در غلظت‌های بالا بسیار شکننده بودند و گیاهچه‌ها نیز کیفیت مطلوبی نداشتند که این نتایج با یافته‌های Philip *et al.* (1997) و Caboni *et al.* (2001) که در بررسی ریشه‌زایی بادام در کشت درون‌شیشه‌ای دریافتند IBA باعث ریشه‌دهی بهتر گیاهچه‌ها می‌گردد، همخوانی دارد.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که روند تغییرات وزن خشک ریشه همانند طول ریشه بود به‌طوری‌که در غلظت‌های میانی NAA (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بیشترین میانگین این صفت مشاهده شد که به‌ترتیب افزایش ۴۵/۰۵ و ۵۴/۱ درصدی نشان دادند (جدول ۴).

بیشترین وزن تر ریشه در تیمارهای ایندول بوتیریک اسید با غلظت ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۸۴/۶ درصدی داشتند. کمترین میانگین وزن تر ریشه (۰/۲۰ گرم) در تیمار شاهد بود (جدول ۴).

براساس نتایج حاصل، درصد ریشه‌زایی بر حسب غلظت هورمون متفاوت بود. در بررسی میزان تأثیر تیمارهای اعمال‌شده بر درصد ریشه‌زایی گیاهچه‌ها مشاهده شد که بیشترین درصد ریشه‌زایی با میانگین ۷۱/۲۵ درصد در تیمار ایندول بوتیریک ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش۶۶/۳ درصدی داشت.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید بر برخی از صفات پنیرباد در مرحله ریشه‌زایی

Table 3. Results of variance analysis of NAA and IBA on some traits of *Withania coagulans* in marcotting stage

S.O.V	df	Mean squares				
		Root length	Root dry weight	Root fresh weight	Marcotting percentage	Seedling quality
Treatment	8	1.1156**	0.00001**	0.0022**	0.0619**	0.2076**
Error	27	0.0319	0.000003	0.0001	0.0394	0.0271
C.V (%)	-	8.46	27.7	13.3	5.55	10.23

**: Significant at 1% of probability level. **: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر ایندول بوتیریک اسید و نفتالین استیک اسید بر برخی از صفات پنیرباد در مرحله ریشه‌زایی

Table 4. Mean comparison effect of NAA and IBA on some traits of *Withania coagulans* in marcotting stage

Treatments (mg/L)	Root length (cm)	Root dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Marcotting (%)	Seedling quality
NAA (0.5)	1.38 d	0.0032 c	0.05 b	13.5 e	1.21 b
NAA (1)	2.25 cd	0.0091 a	0.06 b	21.00 d	2.48 a
NAA (1.5)	3.00 c	0.0109 a	0.08 b	34.5 c	2.49 a
NAA (2)	1.75 d	0.0034 c	0.08 b	41.25 bc	2.65 a
IBA (0.5)	6.63 ab	0.0066 b	013 a	71.25 a	1.25 b
IBA (1)	7.13 a	0.0069 b	0.13 a	60.75 a	1.20 b
IBA (1.5)	6.00 ab	0.0033 c	0.07b	50.25 b	2.46 a
IBA (2)	5.00 b	0.0033 c	0.07 b	34.5 c	2.68 a
Control (0)	4.88 b	0.0050 bc	0.02 c	24.00 d	2.68 a

در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشترک‌اند، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن ندارند (α=۰/۰۱).

In each column contains numbers that have the same letters, no significant difference based on Duncan's multiple test (α = 0.01).

کمترین میانگین این صفت در کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید مشاهده شد (جدول ۴). در پژوهشی مشابه، از تنظیم‌کننده‌های رشد ایندول بوتیریک اسید ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر و اکسین ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر در گیاه پنیرباد استفاده شده است که سبب بهبود ریشه‌دهی گردیده است (Supe *et al*., 2006). اثر القایی IBA روی تکثیر جوانه‌های جانبی بسیاری از گیاهان دارویی همچون *Ceropegia candelabrum* (Beena *et al*., 2000) و *Aloe chinensis* (Liao *et al*., 2004) نیز گزارش شده است. همچنین Valizade *et al*. (2013) به نتایج مشابهی در این زمینه دست یافتند. بیشترین درصد القای ریشه از شاخساره‌های حاصل از ریزازدیادی (۱۰۰ درصد) در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA و بیشترین تعداد ریشه در هر شاخساره در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. در گیاه به‌لیمو (*Aloysia citrodora*) کاربرد ایندول بوتیریک اسید باعث بهبود ریشه‌زایی شد، برخلاف آن افزایش غلظت نفتالین استیک اسید باعث کاهش ریشه‌زایی شد که یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر را تأیید می‌نمایند (Gupta *et al*., 1996).

در بررسی میزان تأثیر تیمارهای اعمال شده بر کیفیت گیاهچه مشاهده گردید که بهترین کیفیت گیاهچه متعلق به تیمار ایندول بوتیریک اسید با غلظت‌های یک و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بود. همچنین کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید نیز، گیاهچه‌های با کیفیتی تولید کرد. به‌عبارت دیگر کاربرد تیمار ایندول بوتیریک اسید و نفتالین استیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر سبب رشد، شادابی و طراوت بیشتر گیاهچه‌ها شده است (جدول ۴).

نتیجه‌گیری کلی

افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینوپورین از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم بر لیتر، اثر منفی بر صفات مورد مطالعه گذاشته و روند رشد گیاهچه‌ها سیر نزولی پیدا کردند. اعمال تیمارهای ایندول بوتیریک اسید ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نه تنها سبب افزایش طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن تر ریشه و درصد ریشه‌زایی شده، بلکه کیفیت گیاهچه‌ها را نیز بهبود بخشید. درصورتی‌که اعمال تیمارهای نفتالین استیک اسید در مورد برخی از صفات از جمله درصد ریشه‌زایی و طول ریشه اثر کاهنده در مقایسه با تیمار شاهد داشت. برای تولید گیاهچه‌های قوی و شاداب، کاربرد آمینوپورین و ایندول بوتیریک اسید در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب برای شاخه‌دهی و ریشه‌زایی مطلوب، توصیه می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، سعی شد تیماری معرفی شوند که علاوه بر میزان شاخه‌دهی و ریشه‌زایی بالا، مقدار هورمون استفاده‌شده برای آن‌ها نیز، کمتر باشد.

REFERENCES

1. Bagheri, A., Ziaratnia, M. & Hosseini, M. (2005). *In vitro culture of trees*. Ferdowsi University of Mashhad. 245 p. (In Farsi)
2. Beena, M. R., Martin, K. P., Kirti, P. B. & Hariharan, M. (2003). Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(3), 285-289.

3. Bohidar, S., Thirunavokkarasu, M. & Rao, T. V. (2008). Effect of plant growth regulators on in vitro micro propagation of garden rue (*Ruta graveogens* L.). *International Journal of Integrative Biology*, 3(1), 36-43.
4. Borgato, L., Pisani, F. & Furini, A. (2007). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88(3), 247-252.
5. Caboni, E., Tonelli, M. G., Lauri, P., Iacovacci, P., Kevers, C., Damiano, C. & Gaspar, T. (1997). Biochemical aspects of almond micro cuttings related to *in vitro* rooting ability. *Biologia Plantarum*, 39(1), 91-97.
6. Daryani, P., Zareh, N., Chamani, E., Sheykhzad Mosadegh, P. & Javadimajd, D. (2015). The effect of silver nano-particles on microbial contamination and *in vitro* growth of apical and auxiliary buds of hazelnut cultivars. *Agriculturral Biotechnology*, 14(1), 21-31.
7. Ganji, M. E., Bolandi, A. & Anahid, S. (2008). Micropropagation of four selected Dwarf Mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) genotypes. *Pajouhesh & Sazandegi*. 79, 54-61. (In Farsi)
8. Gupta, A. P. (1996). Quantitative determination of withaferin-A in different plant parts of *Withania somnifera* by TLC densitometry. *Journal of Medicinal and. Aromatic Plant Science*, 18, 788-790.
9. Gupta, S. K., Khanuja, S. P. S. & Kumar, S. (2001). In vitro micropropagation of *Lippia alba*. *Current Science-Bangalore*, 81(2), 206-209.
10. Hashemabadi, D. & Kaviani, B. (2007). Rapid micropropagation of *Aloe vera* L. *via* shoot multiplication. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3(2-3), 131-138. (in Farsi)
11. Hussein, E. A. & Aqlan, E. M. (2011). Regeneration of *Solanum villosum* Mill. via direct organogenesis in vitro: A novel study. *International Journal of Botany*, 7, 177-182.
12. Kaykha, Z., Valizadeh, M., Valizadeh, J. & Taheri, K. H. (2012). Studying the quantity and quality of fatty acids in the seeds of *Withania coagulans* (Stocks) Dun. and *Withania somnifera* (L.) Dun. collected from different habitats of Sistan and Baluchestan. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33, 730-740. (in Farsi)
13. Khan, N., Alam, M. S. & Nath, U. K. (2004). In vitro regeneration of garlic through callus culture. *Journal of Biological Sciences*, 4(2), 189-191.
14. Khosh-Khui, M. (1999). *Plant propagation, principles, and practices* (translate). Third volume. Shiraz Publication 1003-1062. (in Farsi)
15. Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X. & Tang, K. (2004). Micropropagation of endangered. *Chinese aloe*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 83-86.
16. Mohtadi, A. M. & Ghaderian, S. M. (2012) Evaluation of auxin (IAA) and kinetin effects on lead uptake and accumulation in *Matthiola flavida* Bioss. *Journal of Cell and Tissue*, 3(2), 161-169. (in Farsi)
17. Nahok, A. (2013). *Tissue culture and Micropropagation of Withania Somnifera*. Ph.D. Thesis. Faculty of Agriculture Zabol University, Iran. (in Farsi)
18. Nathiya, S., Pradeepa, D., Devasena, T. & Senthil, K. (2013). Studies on the effect of sucrose, light, and hormones on micropropagation and in vitro flowering of *Withania somnifera* var. Jawahar-20. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(5), 1391-7.
19. Nikolic, R., Mitić, N. & Nešković, M. (1997). Evaluation of agronomic traits in tissue culture–derived progeny of bird's-foot trefoil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(1), 67-69.
20. Otroshy, M., Moradi, K., Nekouei, M. K. & Struik, P. C. (2011). Micropropagation of pepper (*Capsicum annuum* L.) through in vitro direct organogenesis. *Asian Journal of Biotechnology*, 3, 38-45.
21. Pashmforosh, N. & Ahmadabadi, M. (2016). In vitro regeneration of red nightshade from different explants and evaluation of gene transfer using a biolistic gun. *Genetic and Biomechanical Engineering*, 5(2), 167-177. (in Farsi)
22. Rahamooz-Haghighi, S., Bagheri, K. & Sharafi, A. (2018). Tissue culture and in vitro regeneration of *Plantago major*. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, 4, 37-43. (in Farsi)
23. Sabir, F., Sangwan, R. S., Kumar, R. & Sangwan, N. S. (2012). Salt stress-induced responses in growth and metabolism in callus cultures and differentiating in vitro shoots of Indian Ginseng (*Withania somnifera* Dunal). *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 537-548.
24. Supe, U., Dhote, F. & Roymon, M. G. (2006). In vitro plant regeneration of *Withania somnifera*. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 16(2), 111-115.
25. Valizadeh, M., Bagheri, A., Valizadeh, J., Mirjalili, M. H. & Moshtaghi, N. (2015). Phytochemical investigation of *Withania coagulans* (Stocks) Dunal in natural habits of Sistan and Baluchistan Province of Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(3), 406-417. (in Farsi)