

ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) از طریق اندام‌زایی ساقه

جعفر احمدی^{*}، راضیه محمدی و قاسمعلی گروسی

قزوین، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی قزوین، گروه ژنتیک و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۵

چکیده

پروانش یا پیچ تلگرافی (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) به علت وجود آلكالوئیدهای ارزشمند وین‌بلاستین و وین‌کریستین به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی شده است. لذا توسعه ریزازدیادی پروانش در محیط درون شیشه اهمیت فراوانی دارد. در این تحقیق از دو آزمایش جداگانه برای بهینه‌سازی ساقه‌زایی مستقیم و یک آزمایش ریشه‌زایی استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایش‌های ساقه‌زایی مستقیم، فاکتوریل ۳×۵ (NAA × KN و NAA × BAP) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار بود. آزمایش ریشه‌زایی به صورت فاکتوریل ۳×۵ (NAA × IBA) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت هورمون KN درصد اندام‌زایی و با افزایش غلظت هورمون NAA تعداد ساقه به ازای هر ریزنمونه افزایش یافت. ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر KN با میانگین ۱۳ گیاهچه بالاترین تعداد تولید گیاهچه را دارا بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بهترین مقدار BAP با ۸۷ درصد اندام‌زایی غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و بهترین ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱۰۰ درصد اندام‌زایی بود. در آزمایش ریشه‌زایی ترکیب ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه و طول ریشه را تولید کردند و در مجموع افزایش غلظت هورمون NAA باعث افزایش طول ریشه‌ها گردید.

واژه‌های کلیدی: پروانش، ساقه‌زایی، ریشه‌زایی، ریزازدیادی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۱۲۸۲۷۸، پست الکترونیکی: njahmadi910@yahoo.com

مقدمه

طوری که یک تن برگ خشک پروانش فقط حاوی ۳ گرم وین‌کریستین می‌باشد و ارزش هر گرم آلكالوئید وین-کریستین در حدود ۴۰۰۰ دلار است. کشت وسیع آن برای مصارف دارویی در نواحی مختلفی از جهان مثل آفریقا، هند، تایلند، استرالیا، آمریکا، آلمان، مجارستان، ایتالیا، انگلستان، روسیه و فلسطین اشغالی در سطوح وسیع انجام می‌شود (۳ و ۱۹). از آنجا که تقاضای بسیار برای وین-بلاستین و وین‌کریستین وجود دارد و میزان آنها در مواد خام اولیه استخراج شده از پروانش کم است، اهمیت مطالعه بر روی این گیاه چند برابر می‌شود. کشت اندام‌های

کاتارانتوس روزئوس (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) گیاهی خزنده متعلق به تیره خرزهره (Apocynaceae) و جنس وینکا (Vinca) می‌باشد که در ایران به آن پروانش یا پیچ تلگرافی گفته می‌شود. پروانش به علت وجود آلكالوئیدهای ارزشمند در اندام‌های رویشی و ریشه به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی شده است. این گیاه به علت دارا بودن آلكالوئیدهای مهم وین-بلاستین و وین‌کریستین که هر دو اثر ضد توموری و ضدسرطانی دارند، در صنایع داروسازی اهمیت بسیاری دارد. مقدار این آلكالوئیدها در این گیاه بسیار کم است، به

MS و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی مناسب‌ترین محیط را تشکیل دادند (۸).
 طاها و همکارانش از کشت قطعات نوک ساقه، برگ، ساقه و ریشه پروانش در محیط جامد MS به همراه 2,4-D, BAP, KN, NAA در طی ۳۰ روز کالوس به دست آوردند. نوک ساقه در محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی گرم در لیتر KN بهترین کالوس‌زایی را داشت. همچنین با نسبت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین ساقه‌زایی از اندامها القاء شد. ساقه‌زایی در محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر BAP به علاوه یک میلی گرم در لیتر NAA در نوک ساقه بهترین نتیجه را نشان داد (۲۲). عطایی عظیمی و همکارانش پس از اندازه‌گیری میزان کالوس‌زایی و ریشه‌زایی قطعات برگ در محیط MS جامد حاوی غلظت‌های مختلف NAA و KN پروانش، بهترین محیط را ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر KN به همراه ۵ میلی گرم در لیتر BAP انتخاب کردند (۶). لیو و همکارانش توانستند از بذرهای رسیده چمن ژاپنی در محیط MS حاوی نسبت‌های مختلف BAP به همراه ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D کالوس به دست آورند. سپس کالوسها در محیط حاوی 2,4-D و KN با موفقیت ساقه‌زایی کردند (۱۶).

مواد و روشها

جوانه‌زنی بذرها در محیط درون شیشه و تهیه مواد گیاهی: برای تهیه اندامهای درون شیشه‌ای پروانش از بذور *Catharanthus roseus* (L.) G. Don استفاده شد. جهت ضدعفونی، بذرها به مدت ۳ دقیقه در اتانل ۷۰ درصد به آرامی تکان داده شدند، سپس ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد قرار گرفته و در ادامه بذرها در مرحله آبکشی با آب مقطر استریل ۵ مرتبه شستشو داده شدند (۱۵). بذرهای ضدعفونی شده در شیشه‌های حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MS بدون ترکیبات هورمونی کشت شدند. بذرها تا حدود سه هفته در اتاق کشت نگهداری و

گیاهی برای تولید گیاهان درون شیشه که در نهایت به خاک منتقل می‌شوند، تولید متابولیت‌های ثانویه بیشتری نسبت به گیاهان کنترل که از ابتدا در خاک کشت شده‌اند، می‌کند. لذا توسعه ریزازدیادی پروانش در محیط درون شیشه اهمیت فراوانی دارد و شاید راه حل مناسبی برای جمع‌آوری مواد خام جهت بازیافت این آلكالوئیدها باشد. آزمایش‌ها نشان داده است که در بسیاری موارد توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه وابسته به مراحل اندام‌زایی است (۲۰). میورا و همکارانش از کالوسهای حاصل از پروانش مواد مؤثره آن را استخراج کردند، ولی به این دلیل که کالوس منبع پایدار و با ثباتی برای تولید آلكالوئیدها نیست آنها به کشت قطعه‌ای از اندام که تولید مستقیم اندامهای انبوه و فراوان کند، پرداختند. زیرا اندام‌زایی از طریق کالوس هم میزان عملکرد را پایین می‌آورد و هم بسیار زمان‌بر است (۱۸). در آزمایش آنها بذرهای ضد عفونی و در محیط MS جامد کشت شده و گیاهچه‌های ۷ تا ۱۰ روزه به محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر N^6 -Benzylaminopurine (BAP) جهت تولید ساقه منتقل شدند. نتایج نشان داد که استفاده از هورمون BAP با یک اکسین مثل indole-3-acetic acid (IAA) یا naphthaleneacetic acid (NAA) میزان رشد را ۲ تا ۳ برابر سریع‌تر می‌کند (۱۸). یوان و همکارانش اثر ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین را در تولید ساقه در کشت درون شیشه‌ای پروانش بررسی کردند. آزمایش آنها نشان داد که ۷ میلی گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی گرم در لیتر NAA به شدت ساقه‌زایی را تحریک می‌کند (۲۴). هانداپانی و همکارانش برای تولید ساقه از پتیول، نوک ساقه و گره ساقه پروانش در محیط حاوی BAP, 2,4-D, NAA و TDZ استفاده کردند. ۰/۵ میلی گرم در لیتر Thidiazuron (TDZ) با یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP بهترین اندام‌زایی را نشان دادند. این ساقه‌ها در محیط MS و 1/2 MS و غلظت‌های مختلف Indole-3-butyric acid (IBA) ریشه‌زایی کرده و به گیاه کامل تبدیل شدند. غلظت 1/2

گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار و پنج ریزنمونه در هر پتری دیش اجرا گردید. **شرایط محیطی کشتها:** پس از کشت ریزنمونه‌ها در شیشه‌های استریل درب آنها به دقت بسته شده و با پارافیلیم پوشانده شد. شیشه‌ها در اتاق کشت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۸/۱۶ قرار گرفتند. واکشت هر ۱۴ روز یک بار انجام شد و زمانی که ساقه‌های آزمایش‌های ساقه‌زایی به حدود ۵-۶ سانتیمتر رسیدند، برای القا ریشه‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور از بین تیمارهای مختلف هورمونی گیاهچه‌هایی که رشد مناسبی کردند، انتخاب شدند و آنهایی که دارای اندام هوایی متراکم بودند به چند قسمت تقسیم و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند. در آزمایش ریشه‌زایی ابتدا کشتها به مدت ۱۰ روز در محیط تاریکی در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. دمای اتاق کشت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۸/۱۶ بود. در انتقال ریزنمونه‌ها از هر یک از مرحله به مرحله بعدی دقت شد که محیط کشت به همراه بافت به مرحله بعد منتقل نشود. **یادداشت‌برداری و تجزیه آماری:** در آزمایش‌های ساقه‌زایی دو شاخص درصد ساقه‌زایی و تعداد گیاهچه ثبت گردید. در آزمایش ریشه‌زایی، دو هفته پس از انتقال نمونه‌ها به محیط فاقد هورمون یادداشت‌برداری انجام شد و تعداد و طول ریشه‌های رشد یافته به صورت میانگین تعداد و طول ریشه‌ها برای هر شیشه ثبت شد. به منظور نرمال کردن داده‌ها تبدیل داده جهت انجام تجزیه واریانس صورت گرفت. از نرم افزارهای آماری **MSTATC** برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگینها و **Excel** برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

اندام‌زایی:

الف- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین درصد اندام‌زایی و تعداد گیاهچه آزمایش اول ریزازدیادی: با

گیاهان رشد کرده برای آزمایش اندام‌زایی استفاده شدند. نمونه برداری در مرحله ۶-۸ برگی گیاهچه‌ها انجام شد. در یک ظرف پتری استریل با اسکالپل ریشه و برگهای گیاه جدا و ساقه حاوی گره‌های جانبی به قطعات حداقل ۰/۵ سانتیمتری طوری برش خوردند که در هر قطعه حاصل به عنوان ریزنمونه حداقل یک گره وجود داشته باشد (۱۵).

تهیه محیط کشت: برای تهیه محیط کشت اندام‌زایی، ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن در آب مقطر حل شد. سپس نمک **MS** به میزان ۱/۲ و تیامین به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر به محلول ساکارز افزوده شدند و **pH** محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. در آخرین مرحله آگار به میزان هفت گرم در لیتر به عنوان جامد کننده اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو قرار داده شد. در طول مراحل تهیه محیط کشت، هورمون‌ها که قابل اتوکلاو نیستند، پس از پایین آمدن دمای محیط کشت به آن افزوده شدند. برای تهیه محیط کشت ریشه‌زایی از بیوتین، ریبوفلاوین، فولیک اسید و تیامین به همراه نمک **MS** به میزان ۱/۲ استفاده شد (۸). **آزمایش‌های ساقه‌زایی و ریشه‌زایی:** از دو آزمایش جداگانه برای بهینه‌سازی ساقه‌زایی مستقیم استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایش اول، فاکتوریل ۳×۵ با دو عامل هورمون **BAP** در سه سطح (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و **NAA** در پنج سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار و شش ریزنمونه در هر پتری دیش بود. طرح آماری آزمایش دوم ساقه‌زایی فاکتوریل ۳×۵ با دو عامل هورمون **KN** در سه سطح (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و **NAA** در پنج سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار و شش ریزنمونه در هر پتری دیش بود. آزمایش ریشه‌زایی به صورت فاکتوریل ۳×۵ با دو هورمون **IBA** در سه سطح (۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) و هورمون **NAA** در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار و شش ریزنمونه در هر پتری دیش بود.

بر تعداد گیاهچه تأثیر یکسانی گذاشتند. قانسان و جایابالان (۱۰) در مورد پنبه به نتایجی متناقض با آنچه در این تحقیق به دست آمده رسیدند. تجزیه واریانس تعداد گیاهچه بین غلظت‌های مختلف هورمون NAA در سطح احتمال ($P \leq 0/01$) اختلاف معنی‌داری نشان داد. بهترین غلظت هورمون NAA یک میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۱۲/۲۵ ساقه به ازای هر ریزنمونه و کمترین بازده تعداد گیاهچه مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA با میانگین ۹/۹۱۷ گیاهچه بود. در این تحقیق افزایش غلظت هورمون NAA باعث افزایش تعداد ساقه به ازای هر ریزنمونه گردید. قانسان و جایابالان (۱۰) در مورد پنبه و کیم و همکاران (۱۵) در مورد سرخارگل با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA به نتایج مشابهی دست یافتند. در حالی که سیوانسان و جونگ (۲۱) در مورد زنجبیل با افزایش غلظت هورمون NAA ساقه کمتری به ازای هر ریزنمونه به دست آوردند. اثر متقابل دو هورمون $KN \times NAA$ در سطح ($P \leq 0/01$) معنی‌دار شد و مقایسه میانگینها (جدول ۲) نشان داد که ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر KN با میانگین ۱۳ گیاهچه بالاترین و تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون هورمون KN و تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر KN هر دو با میانگین ۸ پایین‌ترین تعداد تولید گیاهچه را دارا بودند.

ب- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین درصد اندام‌زایی و تعداد گیاهچه آزمایش دوم ریزازدیادی: تجزیه واریانس (جدول ۳) صفت درصد اندام‌زایی برای هورمونهای BAP، NAA و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ($P \leq 0/01$) معنی‌دار شد. مقایسه میانگینها نشان داد که بهترین مقدار BAP با ۸۷ درصد اندام‌زایی غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، بهترین مقادیر NAA یک و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و بهترین ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱۰۰

شمارش تعداد ریزنمونه‌های باززا شده در هر تکرار، درصد اندام‌زایی اندازه‌گیری شد (شکل ۱). تجزیه واریانس صفت اندام‌زایی (جدول ۱) در مورد هورمون KN نشان داد که مقادیر مختلف این هورمون در سطح احتمال ($P \leq 0/01$) اختلاف معنی‌دار دارند. با مقایسه میانگینها (نمودار ۱)، از سه غلظت KN (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) مورد استفاده، غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بالاترین باززایی را نشان داده و مشخص شد که با افزایش غلظت هورمون KN درصد اندام‌زایی افزایش یافته است. هورمون KN به دلیل افزایش اندام‌زایی ساقه از ریزنمونه‌های مختلف مورد توجه بوده و در گیاهان زیادی از جمله باقلا و نخود فرنگی برای اندام‌زایی مستقیم از نوک شاخه و گره استفاده شده است (۵). آهرونی و همکارانش نیز با افزایش غلظت هورمون KN، روی ریزنمونه ساقه گل گچ نتایجی مشابه تحقیق حاضر به دست آوردند (۴). سیوانسان و جونگ مشاهده کردند که با افزایش غلظت هورمون KN از ۲ به ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر درصد اندام‌زایی در گیاه زنجبیل کاهش یافت. اما در غلظتهای پایین‌تر از ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون KN نتایج مشابه تحقیق حاضر بود (۲۱). در مورد هورمون NAA اختلاف معنی‌داری بین مقادیر مختلف آن دیده نشد، اما از بین غلظتهای مختلف هورمون NAA (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین درصد اندام‌زایی مربوط به غلظت یک میلی‌گرم در لیتر با ۹۶/۶ درصد بود. در توافق با این نتایج ایلاح و همکاران (۱۲) و قانسان و جایابالان (۱۰) نیز بیشترین درصد اندام‌زایی را در غلظت یک میلی‌گرم هورمون NAA گزارش دادند. اثر متقابل دو هورمون $KN \times NAA$ در سطح احتمال ($P \leq 0/01$) معنی‌دار شد و بیانگر رفتار متفاوت سطوح یک هورمون در سطوح مختلف هورمون دیگر بود. تجزیه واریانس صفت تعداد گیاهچه (جدول ۱) برای آزمایش اول نشان داد که مقادیر مختلف هورمون KN اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. از این رو غلظتهای مختلف هورمون KN (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)

درصد اندام‌زایی بود. بن موسی و همکاران نیز همین نتایج و همکارانش BAP را مؤثرترین هورمون سیتوکینینی برای اندام‌زایی از گره معرفی کردند (۲۵).

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد اندام‌زایی و تعداد گیاهچه در آزمایش اول ساقه‌زایی

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
KN	۲	۷۲۶/۶۶۷**
NAA	۴	۱۹۰ ^{ns}
KN × NAA	۸	۳۱۰*
خطا	۴۵	۱۱۷/۷۷۸
کل	۵۹	

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل KN × NAA بر درصد اندام‌زایی و تعداد گیاهچه

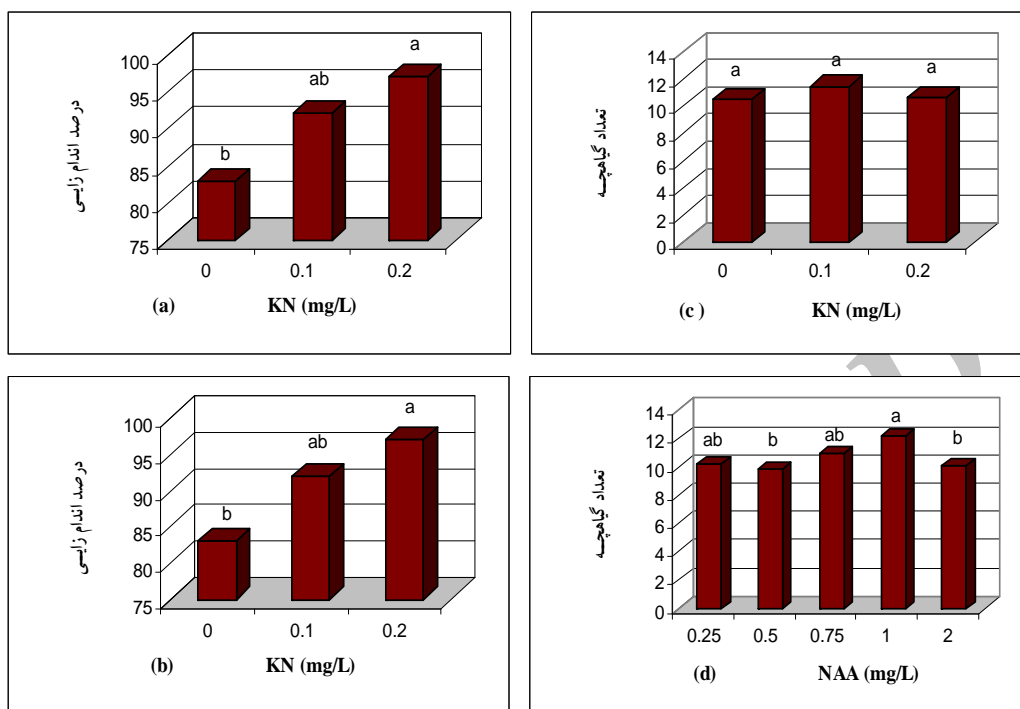
درصد اندام‌زایی	تعداد گیاهچه	NAA (میلی گرم در لیتر)	KN (میلی گرم در لیتر)
۷۰ c*	۸ b*	۰/۲۵	۰
۸۵ abc	۱۱/۵ ab	۰/۵	۰
۱۰۰ a	۱۲/۲۵ a	۰/۷۵	۰
۹۰ ab	۱۱/۲۵ ab	۱	۰
۷۵ bc	۹/۷۵ ab	۲	۰
۹۰ ab	۱۲/۲۵ a	۰/۲۵	۰/۱
۸۵ abc	۸ b	۰/۵	۰/۱
۸۵ abc	۱۱/۲۵ ab	۰/۷۵	۰/۱
۱۰۰ a	۱۳ a	۱	۰/۱
۹۵ a	۱۲/۵ a	۲	۰/۱
۱۰۰ a	۱۱/۲۵ ab	۰/۲۵	۰/۲
۹۵ a	۱۰/۲۵ ab	۰/۵	۰/۲
۹۰ ab	۱۰/۵ ab	۰/۷۵	۰/۲
۱۰۰ a	۱۲/۵ a	۱	۰/۲
۹۵ a	۸/۵ b	۲	۰/۲

*: میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

باززایی نوساقه نابجا در ریزنمونه‌های برگ‌گی چغندر قند را در BAP با غلظت یک میلی گرم در لیتر گزارش کردند. در تجزیه واریانس صفت تعداد گیاهچه در آزمایش دوم اندام‌زایی برای مقادیر مختلف هورمون BAP اختلاف

جنید و همکاران (۱۳)، هانداپانی و همکاران (۸) و ایلاح و همکاران (۱۲) بهترین غلظت هورمون BAP برای صفت درصد اندام‌زایی را ۰/۵ میلی گرم در لیتر بیان کردند. همچنین میرزائی اصل و همکاران (۱) افزایش ظرفیت

لیتر مشخص کرد.

معنی‌داری در سطح احتمال ($P \leq 0.01$) نشان داد و مقایسه میانگینها بهترین سطح هورمون BAP را ۰/۱ میلی گرم در

نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد اندام‌زایی (a, b) و تعداد گیاهچه (c, d) در غلظت‌های مختلف هورمونی

علاوه ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP بالاترین تعداد گیاهچه با میانگین ۱۱/۷۵ را تولید کردند. کمترین تعداد گیاهچه متعلق به تیمار هورمونی ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA به همراه صفر میلی گرم در لیتر BAP و ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP هر دو با میانگین ۳ گیاهچه بود.

سطوح مختلف هورمون NAA نیز با هم در سطح احتمال ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی‌داری داشتند و مقایسه میانگینها یک میلی گرم در لیتر NAA را دارای بالاترین بازده و ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA را دارای پایین‌ترین بازده نشان دادند. اثر متقابل هورمونهای BAP \times NAA در سطح ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی‌داری نشان دادند. مقایسه میانگینها (جدول ۴) ثابت کرد که ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA به



شکل ۱- مراحل اندام‌زایی گیاهچه‌ها از گره در محیط درون شیشه‌ای (a) در زمان کشت (b) پس از دو هفته (c) پس از شش هفته

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد اندام‌زایی و تعداد گیاهچه در آزمایش دوم ساقه‌زایی

میانگین مربعات (MS)		درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S.O.V)
تعداد گیاهچه	درصد اندام‌زایی		
۲۸/۰۲**	۹۸۶/۷**	۲	BAP
۲۱/۲**	۱۹۵۶/۷**	۴	NAA
۳۰/۲**	۲۳۳۶/۶**	۸	BAP×NAA
۱/۵۱	۸۶/۶۶۷	۴۵	خطا
		۵۹	کل

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل BAP × NAA بر تعداد گیاهچه

BAP (میلی گرم در لیتر)	NAA (میلی گرم در لیتر)	تعداد گیاهچه
۰	۰/۲۵	۸ a*
۰	۰/۵	۱۱/۵ ab
۰	۰/۷۵	۱۲/۲۵ a
۰	۱	۱۱/۲۵ ab
۰	۲	۹/۷۵ ab
۰/۱	۰/۲۵	۱۲/۲۵ a
۰/۱	۰/۵	۸ b
۰/۱	۰/۷۵	۱۱/۲۵ b
۰/۱	۱	۱۳ a
۰/۱	۲	۱۲/۵ a
۰/۲	۰/۲۵	۱۱/۲۵ ab
۰/۲	۰/۵	۱۰/۲۵ ab
۰/۲	۰/۷۵	۱۰/۲۵ ab
۰/۲	۱	۱۲/۵ a
۰/۲	۲	۸/۵ b

* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند.

ریشه‌زایی

با مقایسه میانگینها (نمودار ۲) بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۰/۴ میلی گرم در لیتر به دست آمد. افزایش میزان این هورمون ابتدا باعث کاهش تعداد ریشه‌ها و در غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر باعث افزایش مجدد تعداد ریشه‌ها شد. نتایج تحقیق جنید و همکاران (۱۳) نیز نشان داد که با افزایش غلظت هورمون IBA تعداد ریشه‌ها کاهش پیدا می‌کند. هانداپانی و همکاران (۸) نیز از غلظت ۰/۴۴ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بهترین نتیجه ریشه‌زایی را به

الف- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفت تعداد و طول ریشه در آزمایش ریشه‌زایی (شکل ۲): تجزیه واریانس صفت تعداد ریشه در جدول (۵) نشان داده شده است. منبع تغییر هورمون IBA (۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) از نظر صفت تعداد ریشه در سطح احتمال (۰/۰۱) $P \leq$ اختلاف معنی‌دار نشان داد و از این لحاظ بین غلظت‌های مختلف این هورمون تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

گزارش کردند.

دست آوردند. ایلاح و همکاران (۱۲) از غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بالاترین درصد ریشه‌زایی را

جدول ۵- تجزیه واریانس صفت تعداد و طول ریشه در آزمایش ریشه‌زایی

میانگین مربعات (MS)		درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S.O.V)
تعداد ریشه	طول ریشه		
۲/۷۸۷**	۰/۰۳۲**	۲	IBA
۱۲/۶۲۵**	۰/۱۸۶**	۴	NAA
۶/۷۸۸**	۰/۱۱۰**	۸	BAP×NAA
۰/۳۴۳	۰/۰۰۶	۴۵	خطا
		۵۹	کل

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

(۲۳) حداکثر ریشه‌زایی در گیاه بادام زمینی را در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هورمون NAA گزارش کردند. آنیتا و پولایا در سال ۲۰۰۲ برای استرکولیا حداکثر ریشه‌زایی را در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هورمون NAA به دست آوردند (۵). چوپریگاری و همکاران (۹) برای تعداد ریشه به ازای هر گیاهچه یک میلی گرم در لیتر هورمون NAA را در اسطوخودوس مناسب تشخیص دادند. ایلاح و همکاران (۱۲) نیز غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هورمون NAA را برای ریشه‌زایی پروانش مناسب‌تر دانستند. در تضاد با نتایج این آزمایش، آنیتا و پولایا (۵) با افزایش غلظت هورمون NAA از ۰/۱ تا ۲ میلی گرم در لیتر تعداد ریشه کمتری در ساقه استرکولیا مشاهده کردند. اثر متقابل دو هورمون IBA × NAA نیز معنی‌دار شد و مقایسه میانگین اثر متقابل (جدول ۶) نشان داد که ترکیب ۰/۴ میلی گرم در لیتر IBA به همراه ۴ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه را تولید کردند و کمترین تعداد ریشه متعلق به ترکیب هورمونی ۰/۴ میلی گرم در لیتر IBA بود.

کاشف حسین و انیس (۱۴) برای ریشه‌زایی ساقه‌های کنگر فرنگی بهترین مقدار هورمون IBA را ۰/۱ میلی گرم در لیتر با بالاترین درصد ریشه‌زایی شناسایی کردند. آنها اعلام کردند غلظتهای پایین تر اکسینها نتایج بهتری در ریشه‌زایی دارد. سیوانسان و جونگ (۲۱) برای ریشه‌زایی زنجبیل انواع اکسینها را بررسی کرده و IBA با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر را مناسب‌ترین غلظت معرفی کردند. همچنین یاری و همکاران (۲) ترکیب تیماری IBA و IAA را در القای ریشه رقمهای مختلف گل سرخ مؤثر گزارش کردند. بین پنج غلظت هورمون NAA (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال (P ≤ ۰/۰۱) دیده شد که دلالت بر وابستگی تعداد ریشه‌ها به این هورمون دارد. بهترین غلظت برای تولید تعداد ریشه ۳ میلی گرم در لیتر بود (نمودار ۲) که با غلظت ۲ میلی گرم در لیتر NAA در یک گروه قرار گرفتند. همان گونه که از نمودار مقایسه میانگینها پیداست با افزایش غلظت هورمون NAA تعداد ریشه‌های تولید شده سیر صعودی داشته و در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر روند نزولی نشان داد. در مقایسه با نتایج این تحقیق ونکاتاچالان و جایابالان

NAA هر چه غلظت هورمون IBA افزایش یافته تعداد ریشه‌ها نیز افزایش پیدا کرده است.



با دقت در جدول ۶ مقایسه میانگین اثر متقابل NAA × IBA، مشاهده می‌شود که در غلظتهای پایین هورمون



شکل ۲- نمونه هایی از گیاهچه های ریشه زا شده در محیط کشت

IBA تعداد ریشه‌ها کاهش یافته است. در جدول (۵) تجزیه واریانس طول ریشه‌ها نشان داده شده است. در مورد هورمون IBA بین غلظتهای مختلف در سطح احتمال ($P \leq 0.01$) اختلاف معنی‌دار دیده شد. با توجه به مقایسه میانگین (نمودار ۲) بهترین غلظت هورمون IBA برای صفت طول ریشه ۰/۴ میلی گرم در لیتر بود. کاشف حسین و انیس (۱۴) بلندترین طول ریشه‌ها را برای ریشه‌زایی ساقه‌های کنگر فرنگی در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر هورمون IBA گزارش کردند. جنید و همکاران (۱۳) نیز طول ریشه‌ها را در دو محیط مایع و جامد مقایسه کردند و مشاهده کردند که در محیط مایع ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA و در محیط جامد ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بلندترین ریشه‌ها را تولید می‌کنند.

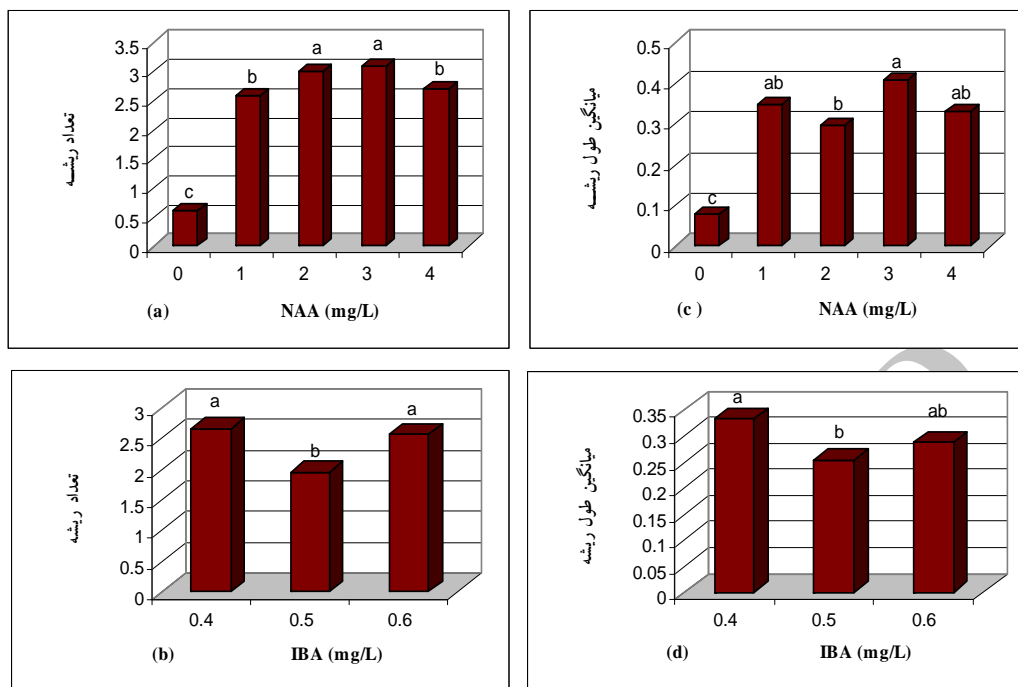
گوپیتا و همکاران (۱۱) نیز در محیط جامد با ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بهترین عملکرد طول ریشه‌ها را گزارش نمودند. هورمون NAA برای صفت طول ریشه‌ها در سطح احتمال ($P \leq 0.01$) معنی‌دار شد که نشان می‌دهد بین غلظتهای مختلف این هورمون تفاوت وجود دارد. با توجه به مقایسه میانگین (نمودار ۲) بهترین غلظت هورمون NAA از لحاظ طول ریشه‌ها ۳ میلی گرم در لیتر بود.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA × IBA بر تعداد و

طول ریشه		تعداد ریشه	طول ریشه
(میلی گرم در IBA لیتر)	(میلی گرم در NAA لیتر)		
۰/۴	۰	۰/۰۰ f*	۰/۴۵ ab
۰/۴	۱	۲/۲۵ cd	۰/۲۷ cd
۰/۴	۲	۲/۷۵ c	۰/۳۷ bc
۰/۴	۳	۳/۲۵ bc	۰/۵۷ a
۰/۴	۴	۵ a	۰/۱ ef
۰/۵	۰	۰/۷۵ ef	۰/۱۵ def
۰/۵	۱	۱/۵ de	۰/۳۵ bc
۰/۵	۲	۳/۵ bc	۰/۵۷ a
۰/۵	۳	۳/۵ bc	۰/۱ ef
۰/۵	۴	۰/۵ ef	۰/۱۵ def
۰/۶	۰	۱ ef	۰/۴۵ ab
۰/۶	۱	۴ ab	۰/۲۵ cde
۰/۶	۲	۲/۷۵ c	۰/۲۷ cd
۰/۶	۳	۲/۵ cd	۰/۳۲ bc
۰/۶	۴	۲/۳۷ cd	

*: میانگینهای دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هورمون NAA غلظت‌های ۰/۴ میلی گرم در لیتر و ۰/۶ میلی گرم در لیتر IBA عملکرد یکسانی از لحاظ تعداد ریشه دیده شد. اما در غلظتهای بالای هورمون NAA با افزایش غلظت هورمون



نمودار ۲- مقایسه میانگین تعداد ریشه (a, b) و طول ریشه (c, d) در غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA

برای محیط جامد گزارش کردند. اثر متقابل هورمون‌های IBA × NAA از لحاظ صفت طول ریشه در سطح احتمال (P ≤ 0/01) معنی دار شد و بهترین ترکیب‌های هورمونی (جدول ۶) ۰/۴ میلی گرم در لیتر IBA به همراه ۴ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی گرم در لیتر NAA انتخاب شدند. گوپیتا و همکاران (۱۱) نیز برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های نیشکر ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA را گزارش نمودند.

در مجموع افزایش غلظت هورمون NAA باعث افزایش طول ریشه‌ها گردید. چوپریگاری و همکاران (۹) برای طول ریشه ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون NAA را در اسطوخودوس مناسب تشخیص دادند. مدهولاتا و همکاران (۱۷) نیز بهترین محیط القا ریشه موز سبز را ترکیب ۱:۱ هورمون‌های IBA و NAA معرفی کردند و گزارش کردند که با افزایش غلظت NAA طول ریشه‌ها افزایش یافت. گوپیتا و همکاران (۱۱) نیز برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های نیشکر غلظت مناسب هورمون NAA را ۰/۵ میلی گرم در لیتر برای محیط مایع و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر

منابع

۲- یاری، ف. موسوی، الف. مستوفی، ی. سیدی، س.م. زمانی، ذ. لامیر، م. ۱۳۹۲. اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع کلات آهن بر پرآوری و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای سه رقم گل سرخ شاخه بریده. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۶ (۱): صفحه ۹۹ تا ۱۱۰.

3- Abdul Jaleel C., Gopi, R., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., and

۱- میرزائی اصل، الف. معینی، الف. هاتف سلمانیان، ع. و جلالی جواران، م. ۱۳۸۸. بررسی اثر پیش تیمارهای هورمونی و ژنوتیپ در تشکیل نوساقه‌های نابجای مستقیم روی برگهای چغندرقد (*Beta Vulgaris L.*) در شرایط درون شیشه‌ای. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۲(۴): صفحه ۷۱۹ تا ۷۲۹.

Panneerselvam, R. 2008. Antioxidant potentials and ajmalicine accumulation in *Catharanthus*

- roseus* after treatment with giberellic acid. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*. 60: 195-200.
- 4- Ahroni, A., Zuker, A., Rozen, Y., Shejtman, H., and Vainstein, A. 1997. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment Explants of *gypsophila*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 49: 101-106.
 - 5- Anitha, S., and Pullaiah, T. 2002. Shoot regeneration from hypocotyls and shoot tip explants of *Sterculia foetida* L. derived from seedlings. *Taiwania*. 47(1): 62-69.
 - 6- Ataei-Azimi, A., Delnavaz, B., Ebrahimzade, H., and Majd, A. 2008. High *in vitro* production of anti-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. *African Journal of Biotechnology*. 7(16): 2834-2839.
 - 7- Benmoussa, M., Mukhopadhyay, S., and Desjardins, Y. 1996. Optimization of callus culture and shoot multiplication of *Asparagus densifloru*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 47:91-94.
 - 8- Dhandapani, M., Kim, D.H., and Hong, S.B. 2008. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 44:18-25.
 - 9- Echeverrigaray, S., Basso, R. and Andrade, L.B. 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia Plantarum*. 49 (3): 439-442.
 - 10- Ganesan, M., and Jayabalan, N. 2006. Influence of cytokinins, auxins and polyamines on *in vitro* mass multiplication of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2). *Indian Journal of Experimental Biology*. 44:506-513.
 - 11- Gopitha, K., Bhavani, A.L., and Senthilmanickam, J. 2010. Effect of different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 1(3). 62-69.
 - 10- Ilah, A., Mujib, A., Junaid, A., Samar, F., and Zainal Abdin, M. 2009. Somatic embryogenesis and two embryo specific proteins in *Catharanthus roseus*. *Biologia*. 64(2):299-304.
 - 13- Junaid, A., Mujib, A., Bhat, M.A., Sharma, M.P., and Samaj, J. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus*. *Biologia Plantarum*. 51(4): 641-646.
 - 14- Kashif Husain, M., and Anis, M. 2006. Rapid *in vitro* propagation of *Eclipta alba* (L.) through high frequency axillary shoot proliferation. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28(4): 325-330.
 - 15- Kim, J.S., Lee, S.Y., Eom, S.H., and Park, S.U. 2010. Improved shoot organogenesis and plant regeneration of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(7): 587-591.
 - 16- Liu, L., Fan, X., Zhang, J., Yan, M., and Bao, M. 2009. Long-term cultured callus and the effect factor of high frequency plantlet regeneration and somatic embryogenesis maintenance in *Zoysia japonica*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 45:673-680.
 - 17- Madhulatha, P., Kirubakaran, S.I., and Sakthivel, N. 2006. Effects of carbon sources and auxins on *in vitro* propagation of banana. *Biologia Plantarum*. 50 (4): 782-784.
 - 18- Miura, Y., Hirata, K., and Kurano, N. 1987. Isolation of vinblastine in callus culture with differentiated roots of *Catharanthus roseus* (L). *G. Don. Agric. BioL. Chem*. 51 (2): 611 -614.
 - 19- Mujib, A., Ilah, A., Gondotra, N. and Abdin, M. Z. 2003. *In vitro* approaches to improve alkaloid yield in *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Genetic Engineering, Recent Progress in Medicinal Plants*. 4: 415-440.
 - 20- Pietrosiuk, A., Furmanowa, M., and Lata, B. 2007. *Catharanthus roseus*: micropropagation and *in vitro* techniques. *Phytochem Rev*. 6:459-473.
 - 21- Sivanesan, L., and Jeong, B.R. 2007. Direct shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* Linn. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 43:436-441.
 - 22- Taha, H.S., El-Bahr, M.K., and Seif-El-Nasr, M.M. 2008. *In vitro* studies on egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: 1- calli Production, direct shootlets Regeneration and alkaloids determination. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(8):1017-1022.
 - 23- Venkatachalam, P., and Jayabalan, N. 1997. Effect of auxins and cytokinins on efficient plant regeneration and multiple-shoot formation from cotyledons and cotyledonary-node explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) by *in vitro* culture technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 67, 237-248.
 - 24- Yuan, Q., Xu, H., and Hu, Z. 1999. Two Phase culture for enhanced alkaloid synthesis and release in a new airlift reactor by *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Techniques*. 13: 107-109.
 - 25- Zhang, S., Hanna, W., and Ozias-Akins, P. 2007. Comparison of callus induction and plant regeneration from different explants in triploid and tetraploid turf-type bermudagrasses. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*. 90:71-78.

***In vitro* Micropropagation of *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don via shoot multiplication**

Ahmadi J., Mohammadi R. and Garosi Gh.A.

Plant breeding and Jenetics Dept., Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. of Iran

Abstract

Periwinkle (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) is known as an important medicinal plant because it contains vincristine and vinblastine alkaloids. Therefore development of micro-propagation in vitro culture has high importance. The present study describes two shoot induction and one root induction optimization experiments. The experimental designs were 3×5 factorial (BAP × NAA and KN × NAA) for shoot induction trails and 3×5 factorial (IBA × NAA) for root induction trail based on completely randomized design with four replications. The best proliferation of shoot induction percent and shoot per explants was shown on the medium supplemented with high KN and NAA, respectively. In overall, KN (0.1 mg/l) + NAA (1 mg/l) combination proved to be optimal for the production of maximum number of shoots. Mean comparison showed that the highest multiplication rate was obtained with 0.1 mg/l of 6-benzylaminopurine (87%) and with 0.1 mg/l 6-benzylaminopurine + 2 mg/l naphthalene acetic acid (100%). The best condition for rooting (root number and length) was 0.4 mg/l IBA + 4 mg/l naphthalene acetic acid and the maximum root length was observed on medium supplemented with higher NAA concentration.

Key words: *Catharanthus roseus*, Shoot induction, Rooting, Micropropagation