Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):441-446

The effect of growth factors on direct micropropagation of Physalis alkekengi L. (Solanaceae) through buds and stems explants to transfer to the greenhouse and flowering phase

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Rezanejad F.*[1] *PhD,*
Hosseini A.[1] *MSc*

How to cite this article
Rezanejad F, Hosseini A. The effect of growth factors on direct micropropagation of Physalis alkekengi L. (Solanaceae) through buds and stems explants to transfer to the greenhouse and flowering phase. 2019;10(3):441-446.

ABSTRACT

Physalis alkekengi L. is planted in gardens and green spaces because of the beautiful and colorful sepals surrounding the fruit. The species is widely used in traditional medicine and treating a range of diseases. Micropropagation of P. alkekengi was evaluated using the node and internode explants. After sterilization and seed germination, sterile seedlings were transformed to basal MS medium to create sterilized seedlings as a source of explants. Regeneration of nodes and internodes explants was studied at various concentrations of growth regulators of 2, 4-D and BAP as well as in medium lacking growth regulators or control (11 various media). The experiment was conducted in a completely randomized design with three replicates. The internodal explants produced shoot on media 2 (0.2mgl-12, 4-D), 3 (0.2mgl-12, 4-D+0/2mgl-1BAP), and 4 (0.5mgl-12, 4-D+0.2mgl-1BAP) and then were rooted on these media. The nodal explants in control and different hormonal treatments generated shoots; interestingly, shoots generated in control medium successfully established roots on the same medium after 7 days (70%). The other regenerated shoots in different media (10) were rooted on ½ MS medium containing 1mgl-1IBA. The rooted plants were transplanted into pots containing sand as well as perlite to be well acclimated before transfer to the greenhouse. They grew well later in the greenhouse at a 100% success This study shows high in vitro regeneration capability of this species as an important medicinal and ornamental plant. Therefore, it is suggested to use this species in molecular and genetic studies, somaclonal variation, and the production of herbal medicine.

Keywords Ground cherry; Growth regulators; Flowering; In vitro culture; Shoot formation

[1]Biology Department, Science Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Correspondence
Address: Biology Department, Science Faculty, Shahid Bahonar University of Kerman, Imam Khomeini Highway, Pajoohsh Square, Kerman, Iran. Postal Code: 7616913439
Phone: +98 (34) 33257432
Fax: +98 (34) 33257432
frezanejad@uk.ac.ir

Article History
Received: September 26, 2017
Accepted: February 3, 2018
ePublished: June 20, 2019

CITATION LINKS

[1] New pharmaceutical plant in the North East of Mandragora turcomanica Mizg [2] Antioxidant potential of Agrobacterium-transformed and non-transformed Physalis ixocarpa plants grown in vitro and ex vitro [3] Preliminary study of phytochemical screening and antibacterial activity of Physalis alkekengi against Staphylococcus aureus [4] Physico-chemical standardization of seeds of Kaknaj (Physalis alkekengi Linn.) [5] Perspectives and possibilities of Indian species of genus Physalis (L.)- A comprehensive Review [6] Physalis alkekengi alcoholic fruit extract on the growth of the placenta in pregnant Wistar rats [7] The effect of Physalis alkekengi extract on the physiologic function of organ tissues: a mini-review [8] Physalin and neophysalin from Physalis alkekengi var. francheti and their differentiation inducing activity [9] In vitro shoot multiplication and plant regeneration of Physalis peruviana L [10] In vitro plant regeneration in Capsicum chinense Jacq [11] Production of anti-cancer compound, Physalin B from callus culture of Physalis minima (Linn.) [12] In vitro prppagation and enhancement of phytoconstituent in Withania cougulans, a rare medicinal plant [13] The effect different concentrations of 2,4-D on meristem tissue culture of potato (Solanum tuberusum L.) [14] In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant Passiflora foetida L [15] In vitro shoot multiplication in different species of banana [16] An efficient protocol for in vitro propagation of Solanum nigrum L [17] In vitro plant regeneration from cotyledonary nodes of Withania somnifera (L.) Dunal and assessment of clonal fidelity using RAPD and ISSR markers [18] Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (Mentha spicata L.) Open Hortic J

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

اثر فاکتورهای رشد بر ریزازدیادی مستقیم عروسک پشت پرده (فیسالیس آلککنگی؛ تیره سیب‌زمینی) از ریزنمونه‌های جوانه و ساقه تا انتقال به گلخانه و فاز گلدهی

فرخنده رضانژاد* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
اسما حسینی MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

عروسک پشت پرده (*فیسالیس آلککنگی*؛ *Physalis alkekengi L*) با کاسبرگ‌های زیبا و رنگی اطراف میوه در فضاهای سبز کشت می‌شود. همچنین در طب سنتی و درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها، به کار می‌رود. باززایی و ریزازدیادی آن از ریزنمونه‌های گره و میان‌گره با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت در شیشه انجام شد. پس از بهینه‌سازی شرایط ضدعفونی و جوانه‌زنی بذر، دانه‌رست‌های سترون به محیط کشت MS پایه به‌منظور ایجاد گیاه‌چه‌های سترون به‌عنوان منبع ریزنمونه منتقل شدند. ریزازدیادی ریزنمونه‌ها، در ۱۰ محیط کشت با سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد ۲ و ۴ دی‌کلروفنوکسی استیک‌اسید و ۶ بنزیل‌امینوپورین و همچنین محیط MS بدون هورمون (کنترل) در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. ریزنمونه‌های میان‌گره در محیط‌های کشت ۲ (۰/۲mgl^{-1}2, 4-D)، ۳ (۰/۲mgl^{-1}2, 4-D+۰/۲mgl^{-1}BAP) و ۴ (۰/۲mgl^{-1}BAP+۰/۵mgl^{-1}2, 4-D) شاخساره و سپس روی همین محیط‌ها ریشه‌دار شدند. ریزنمونه‌های گره در شاهد و همه تیمارهای هورمونی شاخساره تولید کردند که به‌طور جالب توجه، شاخسارهای تولیدشده از ریزنمونه گره در شاهد، پس از ۷ روز، روی همان محیط ریشه‌دار شدند (۷۰%). سایر شاخسارهای حاصل از گره در محیط ریشه‌زایی MS+۱/۲mgl^{-1}BAP۱ ریشه‌دار شدند. نهال‌های ریشه‌دارشده با موفقیت ۱۰۰% در محیط‌های حاوی پرلیت و خاک سازگار و سپس در گلخانه رشد و ایجاد گل نمودند. مطالعه حاضر قابلیت باززایی بالای گیاه عروسک پشت پرده را به‌عنوان یک گیاه زینتی مهم در شرایط کشت در شیشه نشان می‌دهد. با توجه به کشت در شیشه آسان آن، می‌توان در مطالعات مولکولی و ژنتیکی، تولید گیاهان یکسان و تولید مواد دارویی از این گیاه استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: تنظیم‌کننده رشد، گل‌دهی، شاخسارزایی، عروسک‌پشت‌پرده، کشت در شیشه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴
*نویسنده مسئول: frezanejad@uk.ac.ir

مقدمه

خانواده سیب‌زمینی (*Solanaceae*) با داشتن برگ‌های متناوب، ساده تا لوب‌دار، گل‌های به‌طور معمول دوجنسی و متقارن شناخته می‌شود. گیاهان این خانواده از لحاظ اقتصادی و دارویی و به‌خصوص به‌علت داشتن تروپان آلکالوئیدها و استروئید آلکالوئیدها اهمیت دارند[1]. یکی از گیاهان این خانواده عروسک‌پشت پرده با نام علمی *فیسالیس آلککنگی* (*Physalis alkekengi* L.) است، که نام‌های دیگر آن کاکنج (kakeng)، فانوس چینی یا گیلاس زمینی است. پراکنش آن در آسیا (ایران، هند، ژاپن و چین) و اروپا (اسپانیا، ایتالیا و ترکیه) گزارش شده است، اما در اصل بومی ژاپن و جنوب شرقی اروپا است[2, 3]. جنس فیسالیس با حدود ۹۰ گونه بزرگ‌ترین جنس در میان زیرخانواده سولانوئیده است. به‌دلیل آن که گل‌های این جنس از لحاظ مورفولوژیکی بسیار شبیه‌اند، گیاه‌شناسان اتفاق نظر دارند که تعداد گونه‌ها از ۷۵ تا ۱۲۰ متنوع هست. میوه‌های عروسک پشت پرده سته کروی، قرمز یا نارنجی‌رنگ، براق و آبدار با طعم تلخ تند هستند که دارای تعداد زیادی دانه کلیوی‌شکل و مسطح به رنگ زرد یا قهوه‌ای روشن هستند. این جنس توسط کاسه‌ای که بعد از گلدهی اطراف میوه آن تشکیل می‌شود به‌آسانی شناخته می‌شود. جنس‌های دیگر هم این ویژگی را دارند، اما در شکل جام و جزئیات گل با هم متفاوت هستند[4, 5]. در عصر حاضر با توجه به اثرات درمانی قابل توجه گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی، بررسی اثر این گیاهان در دستور کار محققین قرار گرفته است[6]. عروسک پشت پرده سال‌ها است که به‌عنوان گیاه دارویی شناخته می‌شود و خواص شیمیایی قابل توجهی دارد (برگ، میوه، ریشه و گل). عصاره آن حاوی مواد موثره‌ای از قبیل آلکالوئیدها، لیکوپن، گلوکوکورتیکوئیدها، عوامل الکلی و مقدار زیادی ویتامین c به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت است[7]. آنالیزهای فیتوشیمیایی دیگر نشان داد که عروسک پشت پرده حاوی ترکیباتی نظیر ساپونین، گلایکوزید، فلاونوئید، سیتریک‌اسید و فیزالین است. فیزالین بیشترین ترکیب شیمیایی با خواص دارویی متنوع از قبیل ضدباکتریایی و ضدتومور است. فیزالین به‌ویژه نوع B و F آن دارای بیشترین فعالیت زیست‌شناختی هستند، در نتیجه گیاه سالم دارای خاصیت ضدالتهاب، ضدتب، ضدسرفه و خلط‌آور است. به‌علاوه برای قرن‌ها عروسک پشت پرده به‌عنوان گیاه دارویی در درمان بیماری‌های پوستی (جوش)، سوزاک، ادراری، زخم معده، اختلالات قلبی‌عروقی، کرم‌کش و تصفیه‌کننده خون مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین در مطالعات اخیر فعالیت ضدسرطان گزارش شده است[8-10].

کشت بافت گیاهی نقش مهم و کلیدی را در انتشار سریع، حفظ بقا و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کند[9]. ریزازدیادی نسبت به تکثیر سنتی گیاهان مزیت‌هایی از قبیل تولید گیاهان جدید یا تراریخت دارد. این تکنیک به‌طور هم‌زمان باعث انتشار ارقام جدید در مقیاس وسیع می‌شود[10]. مطالعاتی روی تکثیر "*در شیشه*" برخی گونه‌های این جنس انجام شده اما هیچ مطالعه منتشرشده‌ای درباره تکثیر این گونه که در ایران استفاده زینتی فراوانی دارد، گزارش نشده است. ازدیاد گونه‌ای از این جنس به نام گیاه *فیسالیس پرووویانا* (*Physalis proviana*) در محیط کشت پایه MS با استفاده از ریزنمونه‌های گره، میان‌گره و برگ، در غلظت‌های مختلف جیبرلین اسید، بنزیل‌آمینوپورین و ۲ و ۴ دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید گزارش شده است[9]. کالوس‌زایی گیاه *فیسالیس مینیما* (*P. minima*) نیز از ریزنمونه‌های برگ، ساقه و ریشه در شرایط *کشت در شیشه* گزارش شده است[11]. تحقیق حاضر با هدف ایجاد یک پروتوکل موثر در بازسازی و ریزازدیادی گیاه *فیسالیس آلککنگی* به‌عنوان یک گیاه دارویی و زینتی مهم از طریق

www.SID.ir

Archive of SID

کشت ریزنمونه‌های گره و میان‌گره در غلظت‌های هورمونی مختلف و نیز در محیط پایه MS، انجام شد.

مواد و روش‌ها

دانه‌های عروسک پشت پرده از روستای سیه‌بنوئیه واقع در شمال شرقی شهرستان رابر (استان کرمان) در فواصل زمانی مرداد تا شهریور جمع‌آوری شدند. دانه‌ها ابتدا به‌خوبی شسته شدند، تا ذرات گرد و خاک موجود روی آنها جدا شود. پس از شست‌وشو با آب جاری، فرآیند ضدعفونی‌کردن با الکل ۷۰% به‌مدت ۷۰ثانیه، سه بار شست‌وشو با آب‌مقطر سترون، ۱۵دقیقه وایتکس ۵% و چهار بار شست‌وشو با آب‌مقطر سترون انجام شد. پس از بهینه‌سازی شرایط رویش (نور، دما و رطوبت) دانه‌ها، بذور جوانه‌زده روی محیط کشت MS در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ساعت تلقیح شدند. در این آزمایش از دانه‌رست‌های سه‌هفته‌ای برای تهیه ریزنمونه‌های مختلف استفاده شد. به‌منظور اثر برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد، ریزنمونه‌های گره و میان‌گره به طول ۳سانتی‌متر در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های متفاوت هورمونی و ۳۰گرم در لیتر ساکارز و ۸گرم در لیتر آگار کشت شدند. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی BAP در ۶ سطح (۰/۲، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵میلی‌گرم بر لیتر)، 2, 4-D در ۳ سطح (۰/۲، ۰/۵ و یک‌میلی‌گرم بر لیتر) برای شاخسارزایی و محیط (mgl^{-1} IBA ۱/۲MS+۱[1]) برای ریشه‌زایی بودند[9]. بنابراین ۱۰ ترکیب هورمونی (۱۰ نوع محیط کشت شامل محیط شاهد بدون هورمون و ۹ ترکیب هورمونی) برای شاخسارزایی و یک محیط کشت برای ریشه‌زایی استفاده شده که ترکیب آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

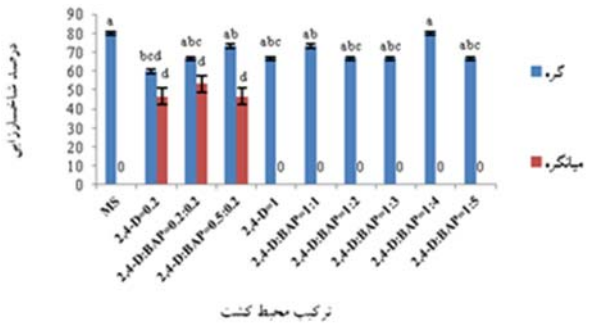
جدول ۱) ترکیبات هورمونی مورد استفاده در محیط MS (۱-۱۰ محیط MS کامل و ۱۱ محیط MS ۱/۲)

شماره محیط	ترکیب هورمونی
۱	محیط شاهد (MS بدون هورمون)
۲	۰/۲میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D
۳	۰/۲میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+۰/۲میلی‌گرم در لیتر BAP
٤	۰/۵میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+۰/۲میلی‌گرم در لیتر BAP
۵	یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D
٦	یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+یک‌میلی‌گرم در لیتر BAP
۷	یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+۲میلی‌گرم در لیتر BAP
۸	یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+۳میلی‌گرم در لیتر BAP
۹	یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+۴میلی‌گرم در لیتر BAP
۱۰	یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D+۵میلی‌گرم در لیتر BAP
۱۱	۱/۲ MS+یک‌میلی‌گرم در لیتر IBA

واکنش ریزنمونه‌ها، از نظر شاخسارزایی و ریشه‌زایی مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. همچنین محیط MS بدون هورمون نیز به‌منظور ریشه‌زایی مورد آزمایش قرار گرفت. سپس، بهینه‌سازی انتقال گیاه‌چه‌های ایجادشده به گلدان برای رشد و گل‌دهی، بررسی و مطالعه شد. به‌منظور انجام مطالعات آماری از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵% انجام شد. برای رسم نمودارها نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ به کار رفت (جدول ۱).

یافته‌ها

دانه‌رست‌های ۲۱روزه سترون که حدود ۶-۸ برگ رویشی تولید کرده بودند برای تهیه ریزنمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. ریزنمونه‌های ساقه (گره) فقط در محیط کشت‌های ۲ (۰/۲میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D)، ۳ (۰/۲میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D+۰/۲میلی‌گرم بر لیتر BAP) و ۴ (۰/۵میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D+۰/۲میلی‌گرم بر لیتر BAP) شاخساره تولید کردند اما ریزنمونه‌های جوانه (گره) به‌طور جالب توجه روی همه انواع محیط کشت، پس از ۱۴ روز شاخسارزایی موفق داشتند (نمودار ۱).

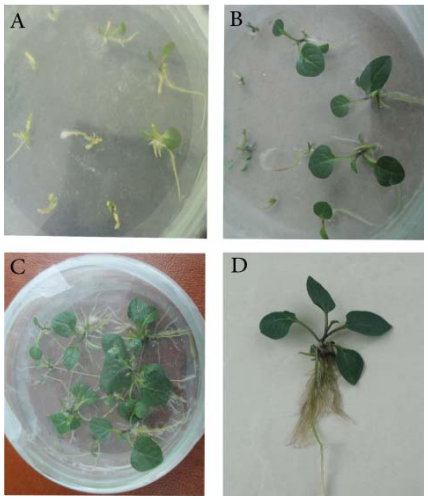


نمودار ۱) درصد شاخسارزایی ریزنمونه‌های گره و میان‌گره در عروسک پشت پرده (*P. alkekengi*) در محیط‌های کشت مختلف. میانگین ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۵% آزمون دانکن ندارند. خطوط عمودی روی هر ستون نشان‌دهنده±خطای استاندارد است.

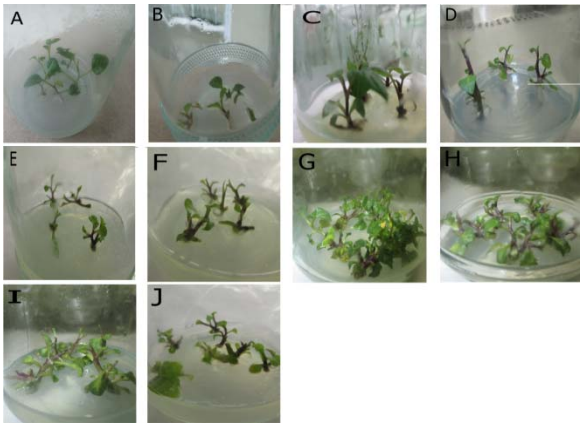
ریزنمونه‌های ساقه‌ای، ۲۱ روز بعد از کشت، روی سه محیط ذکرشده، ساقه‌های در حال رشد کوچکی تولید کردند که میزان شاخسارزایی آنها در این سه ترکیب هورمونی، تفاوت معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۱). شاخسارزایی ایجادشده در ریزنمونه‌های گره و میان‌گره متفاوت بود به‌طوری که ریزنمونه‌های ساقه‌ای (میان‌گره) در سه محیط استفاده‌شده فقط یک شاخساره تولید کردند که با گذشت زمان این تک‌شاخسارها رشد نموده و بزرگ‌تر شدند اما شاخسارهای حاصل از ریزنمونه‌های گره، به استثنا در سه محیط ۲، ۳ و ۴ و محیط MS بدون هورمون (محیط شماره ۱)، در محیط کشت‌های دیگر، به‌ویژه در محیط‌هایی که در آنها از BAP استفاده شده است، بیش از یک شاخساره تولید کردند (شکل‌های ۱ و ۲؛ نمودار ۲). این شاخساره‌ها، به‌دلیل انشعابات متعدد نسبت به نمونه‌های تک‌انشعاب نازک‌تر بوده، که در مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ دیده می‌شود. این روند تولید شاخه‌های متعدد با افزایش غلظت BAP تا ۲میلی‌گرم در لیتر (در غلظت ۳میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری در مقایسه با ۲میلی‌گرم نشان نداد)، افزایش نشان داد اما افزایش بیشتر این هورمون، سبب کاهش تکثیر شاخه‌های جانبی شد. بیشترین تعداد شاخه‌ها (۱۶/۶۶) در محیط حاوی یک‌میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۲میلی‌گرم در لیتر BAP (محیط ۷) به دست آمد (نمودار ۲؛ شکل ۲).

www.SID.ir

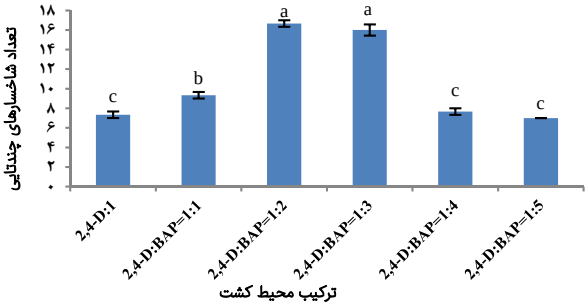
Archive of SID



شکل ۱) شاخسارزایی (منفرد) و ریشه‌زایی ریزنمونه ساقه (گره) عروسک پشت پرده (*P. alkekengi*) در محیط ۴؛ A-C) به‌ترتیب ۳، ۴ و ۶ هفته بعد از کشت، D) شاخساره ریشه‌دارشده در همان محیط (به‌دلیل شباهت شاخسارهای ایجادشده در سه محیط ۲، ۳ و ۴، شکل‌های مربوط به محیط ۴ گذاشته شده است).



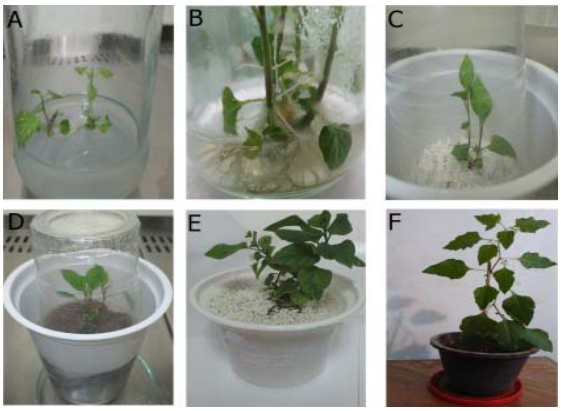
شکل ۲) تولید شاخسارهای منفرد (A-D به‌ترتیب محیط‌های ۴-۱) و چندتایی (۱۰-۵) از ریزنمونه گره در عروسک پشت پرده (*P. alkekengi*) به‌ترتیب در محیط ۱ تا ۱۰ (محیط ۱۱، محیط ریشه‌زایی است)؛ شاخه‌زایی بالاتر در محیط ۷ (G) و ۸ (H) دیده می‌شود



نمودار ۲) تعداد شاخسارهای چندتایی (شاخه‌زایی) تشکیل‌شده در در عروسک پشت پرده (*P. alkekengi*) در غلظت‌های مختلف 2, 4-D و BAP؛ بیشترین تعداد شاخه‌زایی در دو محیط 2, 4-D+BAP با غلظت هورمونی ۱:۱ و ۱:۲ دیده می‌شود. میانگین ستون‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۵% آزمون دانکن ندارند. خطوط عمودی روی هر ستون نشان‌دهنده±خطای استاندارد است.

شاخسارهای تشکیل‌شده از ریزنمونه‌های ساقه در محیط کشت‌های ۲، ۳ و ۴، یک ماه بعد از کشت، وقتی که اندازه شاخسارها ۲-۱ سانتی‌متر بود، تولید ریشه نمودند. این ریشه‌ها روی ریزنمونه‌ها تشکیل اما در امتداد شاخسارهای تشکیل‌شده نبودند اشاره به این که ریزنمونه علاوه بر شاخسارزایی، پتانسیل ریشه‌زایی هم (بدون ارتباط با شاخساره) دارد. به هر حال، با گذشت حدود یک ماه که شاخسارهای منفرد این ریزنمونه‌ها بزرگ‌تر شدند از انتهای آنها در همان محیط اولیه (محیط شاخسارزایی)، ریشه هم تشکیل شد و در نتیجه شاخسارهای ریشه‌دار به وجود آمدند (شکل ۱).

ریزنمونه‌های گره که در تمام تیمارهای هورمونی استفاده شد، ۱۴ روز بعد از کشت شاخساره تولید کردند، به‌طور جالب توجه، شاخسارزایی بالاتر را در محیط MS بدون هورمون با میانگین ۸۰% شاخسارزایی، نشان دادند و پایین‌ترین درصد شاخسارزایی در محیط MS حاوی ۰/۲میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D مشاهده شد که حدود ۷۰% شاخسارزایی نشان داد (نمودار ۱). قابل ذکر است در محیط MS بدون هورمون که در اینجا درصد شاخسارزایی بالاتر آن ذکر شد، همچنان که در بالا نیز اشاره شد روی هر ریزنمونه، فقط یک شاخساره منفرد ایجاد می‌شود. شاخسارهای تولیدشده از گره، به‌جز شاخسارهای حاصل از محیط MS پایه که در همان محیط اولیه، ریشه هم تولید کردند (پس از گذشت ۲۱ روز)، به محیط ریشه‌زایی (۱/۲MS+۱mgl^{-1}IBA؛ محیط ۱۱) منتقل شدند. بعد از گذشت ۱۲ روز قرارگیری در این محیط، تقریباً همه شاخساره‌ها ریشه‌دار شدند. به‌دلیل این که در این تیمار هورمونی ریشه‌زایی با موفقیت انجام شد، از تیمارهای دیگر استفاده نشد. شاخساره‌های ریشه‌دارشده به گلدان‌های حاوی خاک (شن و خاک رس ۱:۱) و پرلیت اتوکلاوشده منتقل شدند. گلدان‌های حاوی پرلیت به‌صورت یک روز در میان با محلول غذایی هوگلند و گلدان‌های حاوی خاک با آب معمولی آبیاری شدند. در هر دو نوع گلدان، شاخسارها ریشه‌دار شدند. شاخسارهای ریشه‌دار منتقل‌شده به گلدان، بعد از گذشت ۱۰ روز از انتقال با شرایط گلخانه سازگار شدند. گیاهان رشدیافته در گلخانه بعد از گذشت دو ماه تولید گل نمودند (شکل ۳).



شکل ۳) ریشه‌دار و سازگارکردن شاخسارهای عروسک پشت پرده (*P. alkekengi*) در محیط ریشه‌زایی و انتقال به گلدان تا فاز زایشی؛ A) انتقال شاخسارها به محیط ریشه‌زایی، B) ریشه‌دارشدن شاخسارها ۱۲ روز بعد از انتقال، C و D) انتقال شاخسارهای ریشه‌دارشده به‌ترتیب به گلدان‌های حاوی پرلیت و خاک (شن: خاک رس: ۱:۱)، E) سازگارشدن گیاه با شرایط گلخانه (فاز رویشی)، F) رشد بیشتر گیاه و رفتن به فاز زایشی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

به‌طور معمول شاخسارزایی، در ریزنمونه‌های گره انجام می‌شود که دارای جوانه جانبی هستند، اما گاهی اوقات ریزنمونه‌های میان‌گره نیز پتانسیل تولید شاخساره را دارند. در این تحقیق، پتانسیل بالای باززایی در هر دو ریزنمونه مورد مطالعه مشاهده شد. ریزنمونه‌های گره در همه محیط کشت‌های استفاده‌شده و حتی محیط بدون هورمون تولید شاخساره نمودند. ریزنمونه‌های ساقه نیز به‌طور جالب توجه در محیط کشت‌های ۴-۲ شاخساره تولید کردند، اما شاخسارهای حاصل از آنها به‌صورت منفرد بوده و چندتایی نشدند. *رامار* و همکاران در مطالعه شاخسارزایی گیاه *فیسالیس پرووویانا*، که گونه دیگری از این جنس است، تولید شاخساره از ساقه را گزارش کردند[9]. آنها نشان دادند که بیشترین تعداد شاخساره از ریزنمونه‌های گره و میان‌گره در محیط با ترکیب هورمونی ۲میلی‌گرم در لیتر BAP، یک‌میلی‌گرم در لیتر GA3 و یک‌میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دیده می‌شود، اما در این مطالعه ریزنمونه‌های گره حتی در محیط MS بدون هورمون نیز شاخساره تولید کردند، که این شاخسارها بعد از ۲۱ روز ریشه هم تشکیل دادند. احتمال می‌دهیم دلیل تشکیل شاخساره و ریشه در محیط MS بدون هورمون بالابودن هورمون‌های درونی یا پتانسیل بالای بازایی گیاه حتی در شرایط معمول محیط کشت باشد. اگرچه در برخی گیاهان خانواده سیب‌زمینی محیط اختصاصی و غنی برای باززایی لازم است، اما گزارشاتی در مورد سهولت باززایی برخی گیاهان این خانواده ذکر شده است. برای مثال، در *ویتانیا کواگولانس* (*Withania coagulans*) خانواده سولاناسه، ریزنمونه‌های گره در محیط MS بدون هورمون شاخسارزایی نشان دادند، که مانند نتایج این مطالعه شاخسارها منفرد بوده و منشعب نشدند[12]. در سیب‌زمینی (*S. tuberosum*) که بازایی آن به نسبت ساده است و تکثیر آن نیز در طبیعت به‌طور غالب از طریق رویشی (کشت غده) انجام می‌شود، با کشت ریزنمونه‌های مریستم در محیط MS بدون هورمون ساقه‌زایی مشاهده شد، اما ریشه‌زایی انجام نشد[13]. اغلب مطالعاتی که در جنس‌های مختلف انجام شده است نشان‌دهنده نیاز ضروری گونه‌ها به هورمون‌های اختصاصی برای باززایی هستند. برای مثال در *پسیفلورا فوتیودا* (*Passiflora foetida*) از خانواده پسیفلوراسه، ریزنمونه‌های گره در محیط MS بدون هورمون حتی ۴۰ روز بعد از تلقیح هیچ نشانه‌ای از شاخسارزایی نشان ندادند، اما با افزودن ترکیبات هورمونی به محیط کشت باززایی در ریزنمونه‌های گره مشاهده شد[14]. در کشت بافت گیاهی تنظیم‌کننده‌های رشد اجزای حیاتی محیط کشت هستند، که مسیر رشدونمو سلول‌های گیاهی را تعیین می‌کنند. سیتوکینین‌ها و به‌ویژه نسبت مناسب اکسین به سیتوکنین‌ها موجب کاهش غالبیت مریستم راسی و القای تشکیل شاخساره و جوانه‌های جانبی از مریستم ریزن‌مونه می‌شوند. با افزایش غلظت سیتوکینین‌ها سرعت تکثیر شاخساره از مریستم گره افزایش می‌یابد، اما این افزایش تا یک میزانی از غلظت سیتوکینین است[15]. برای مثال، در مطالعه باززایی گیاه *سولانوم نیگروم* (*Solanum nigrum*) گزارش شده است، که در محیط MS حاوی غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵میکرومولار BAP، تعداد شاخسارهای تکثیرشده به‌ترتیب برابر ۴۱، ۴۳، ۴۷، ۴۶ و ۴۰ است. این نتایج نشان‌دهنده این است که افزایش غلظت BAP تکثیر شاخساره را افزایش می‌دهد، ولی افزایش بیش از حد آن باعث کاهش تکثیر شاخساره می‌شود[16]. در مطالعه ریزازدیادی گیاه *پسیفلورا فوتیودا* بیشترین تعداد شاخه (۶/۱۳) در محیط MS با ۲میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. افزایش غلظت BAP به ۵میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش تعداد شاخه‌ها (۴/۶۶) شد[14].

مطالعات مشابهی در مورد ریشه‌دارشدن *فیسالیس پرووویانا* گزارش شده است. این گونه نیز مشابه گونه مورد مطالعه، آمادگی و پتانسیل بالا برای ریشه‌زایی را نشان می‌دهد. به‌طوری که *رامار* و همکاران در مطالعه روی باززایی از ریزنمونه‌های برگ، گره و میان‌گره *فیسالیس پرووویانا*، شاخسارهای ریشه‌دار را در محیط mgl^{-1} IBA+۱/۲MS به دست آوردند[9]. شاخسارهای ریشه‌دارشده را به گلدان‌های حاوی کود گاوی، ماسه و خاک رس به نسبت ۱:۱:۱ منتقل کردند. شاخساره‌ها با موفقیت سازگار شدند. در *ویتانیا کواگولانس* گیاهان باززایی‌شده در محیط ۱/۲MS حاوی یک‌میلی‌گرم در لیتر IBA حداکثر ریشه‌زایی (۹۵/۲%) را داشتند، که گیاهچه‌ها با موفقیت در خاک سازگار شدند[17]. مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که محیط موراشیگ و اسگوگ با غلظت نیم (۱/۲MS) ریشه‌زایی را تحریک می‌کند[18]. این اولین مطالعه‌ای است که در مورد شاخسارزایی و ریشه‌زایی این گونه حتی ریشه‌زایی آن در ترکیب هورمونی اولیه و بدون واکشت به محیط ریشه‌زایی انجام شده است. احتمال می‌دهیم دلیل پتانسیل بالای باززایی گیاه مورد مطالعه، بالابودن هورمون‌های درونی گیاه به‌ویژه اکسین باشد، که نیاز به آنالیز و بررسی هورمون‌های درونی گیاه در مطالعات بعدی دارد. با توجه به باززایی بالا و سریع گیاه و نیاز هورمونی پایین آن، تکثیر این گیاه زینتی زیبا از طریق کشت در شیشه کم‌هزینه و مقرون‌به‌صرفه است، که با صرف وقت و هزینه کمتری می‌توان تعداد زیادی گیاه‌چه‌های یکسان تولید نمود. این گیاه و انجام این مطالعه، روزنه‌ای برای محققین در انجام مطالعات ژنتیکی، تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید گیاهان سوماکلونال و غیره ایجاد می‌نماید زیرا به نظر می‌رسد این گیاه یک پروتوکل سریع و کارآمد برای این قبیل مطالعات فراهم کند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، نبود امکانات کافی برای اندازه‌گیری تنظیم‌های رشد درون‌زاد بود که این تنظیم‌کننده‌ها به‌صورت اگزوژن یا برون‌زاد نیز استفاده شدند. به‌علاوه، مواد و تجهیزات مولکولی لازم برای شناسایی ژنوم کامل گیاه مورد مطالعه و مقایسه آن با گیاهان دیگر این خانواده و به‌ویژه گیاهان مدل دارای ارزش و اهمیت است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی پتانسیل شاخسارزایی و ریشه‌زایی در گیاه مورد مطالعه بالا است. به‌طوری که شاخسارهای باززایی‌شده از ساقه در سه محیط

www.SID.ir

Archive of SID

۲، ۳ و ٤ در شرایط بدون هورمون و در محیط اولیه ریشه تولید کردند. به‌علاوه شاخسارهای مختلف حاصل از گره که به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند، در یک محیط ریشه‌زایی واحد با موفقیت ریشه‌دار شدند.

تشکر و قدردانی: این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد سلولی تکوینی گیاهی دانشگاه شهید باهنر کرمان است که از بنیان‌گذاران دانشگاه مرحوم مهندس *افضلی‌پور* و خانم دکتر *صبا* و نیز حمایت‌های مختلف دانشگاه برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه‌اخلاقی: طی انجام کار سعی شد کلیه نکات اخلاقی و زیست‌محیطی لازم رعایت شود.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فرخنده رضانژاد (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (٦٠%)؛ اسما حسینی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (٤٠%)

منابع مالی: پژوهش حاضر و مقاله مستخرج از آن تحت حمایت مالی دانشگاه شهید باهنر کرمان بوده است.

منابع

1- Mohager E. New pharmaceutical plant in the North East of Mandragora turcomanica Mizg. J Phytopathol Promot. 2007;1(1):37-41. [Persian]
2- Bergier K, Kuźniak E, Skłodowska M. Antioxidant potential of Agrobacterium-transformed and non-transformed Physalis ixocarpa plants grown in vitro and ex vitro. Postepy Hig Med Dosw (online). 2012;66:976-82.
3- Estakhr J, Javdan N. Preliminary study of phytochemical screening and antibacterial activity of Physalis alkekengi against Staphylococcus aureus. Pharmacol online. 2011;3:97-103.
4- Ahmad W, Khan NA, Ahmad G, Ahmad S. Physico-chemical standardization of seeds of Kaknaj (Physalis alkekengi Linn.). Hamdard Med. 2010;53(3):77-82.
5- Sharma N, Bano A, Dhaliwal HS, Sharma V. Perspectives and possibilities of Indian species of genus Physalis (L.)-A comprehensive Review. Europ J Pharm Medi Res. 2015;2(2):326-53.
6- Nasimi M, Heidari Nasrabadi M, Shiravi A. Physalis alkekengi alcoholic fruit extract on the growth of the placenta in pregnant Wistar rats. J Anim Biol. 2009;1(2):51-60. [Persian]
7- Zarei A, Shariati M, Shekarforoosh S, Changizi Ashtiyani S, Rasekh F. The effect of Physalis alkekengi extract on the physiologic function of organ tissues: a mini-review. J Arak Univ Med Sci. 2012;15(7):94-104. [Persian]
8- Sunayama R, Kuroyanagi M, Umehara K, Ueno A. Physalin and neophysalin from Physalis alkekengi var. francheti and their differentiation inducing activity. Phytochemistry. 1993;34(2):529-33.
9- Ramar K, Ayyadurai V, Arulprakash T. In vitro shoot multiplication and plant regeneration of Physalis peruviana L. an important medicinal plant. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(3):456-64.
10- Rahula P, Raj VD, Glint K. In vitro plant regeneration in Capsicum chinense Jacq. J Appl Biol Biotechnol. 2015;3(1):030-3.
11- Jualang-Azlan GI, Marziah M. Production of anti-cancer compound, Physalin B from callus culture of Physalis minima (Linn.). J Adv Res Des. 2015;6(1):21-36.
12- Purushotam PM, Thottukara-madama A, Duraisamy P, Senthil K. In vitro prppagation and enhancement of phytoconstituent in Withania cougulans, a rare medicinal plant. Bull Environ Pharmacol Life Sci. 2015;4(7):122-31.
13- Rostami R, Abrishamchi P, lahouti M. The effect different concentrations of 2,4-D on meristem tissue culture of potato (Solanum tuberusum L.). J Sci Shahid Chamran Univ Ahvaz. 2009;1(22):117-22. [Persian]
14- Shekhawat MS, Kannan N, Manokari M, Ravindran CP. In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant Passiflora foetida L. through nodal segment cultures. J Genet Eng Biotechnol. 2015;13(2):209-14.
15- Bhosale UP, Dubhashi SV, Mali NS, Rathod HP. In vitro shoot multiplication in different species of banana. Asian J Plant Sci Res. 2011;1:23-7.
16- Padmapriya H, Karthikeyan AVP, Jahir Hussain G, Karthi C, Velayutham P. An efficient protocol for in vitro propagation of Solanum nigrum L. from nodal explants. J Agric Technol. 2011;7(4):1063-73.
17- Nayak S, Kumar S, Satapathy K, Moharana A, Behera B, Barik D, Acharya L, Mohapatra P, Jena P, Naik S. In vitro plant regeneration from cotyledonary nodes of Withania somnifera (L.) Dunal and assessment of clonal fidelity using RAPD and ISSR markers. Acta Physiol Plant. 2013;35(1):195-203.
18- Fadel D, Kintzios S, Economou SA, Moschopoulou G, Constantinidou HA. Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (Mentha spicata L.) Open Hortic J. 2010;3(1):31-5.

www.SID.ir