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

جعفر احمدی*، راضیه محمدی و قاسمعلی گروسی

قزوین، دانشگاه بین المللی 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 آلکالوئیدهای 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 بهینه سازی **ساقه‌زایی**مستقیم و یک آزمایش ریشه زایی استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایشهای **ساقه‌زایی** مستقیم، فاکتوریل ۵×۳ (NAA × BAP و NAA × KN) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار بود. آزمایش ریشه زایی به صورت فاکتوریل ۵×۳ (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 ازا هر ریزنمونه افزایش یافت. ترکیب هورمونی یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر و بهترین ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی گرم در لیتر NAA با ۱۰۰ درصد اندام‌زایی بود. در آزمایش ریشه‌زایی ترکیب ۰/۴ میلی گرم در لیتر IBA به همراه ۴ میلی گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد ریشه و طول ریشه را تولید کردند و در مجموع افزایش غلظت هورمون NAA باعث افزایش طول ریشه‌ها گردید.

واژه های کلیدی: پروانش، ساقه‌زایی، ریشه‌زایی، ریزازدیادی.

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

مقدمه

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 آلکالوئیدهای ارزشمند در اندامهای رویشی و ریشه به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی شده است. این گیاه به علت دارا بودن آلکالوئیدهای مهم وین-بلاستین و وین‌کریستین که هر دو اثر ضد توموری و ضدسرطانی دارند، در صنایع داروسازی اهمیت بسیاری دارد. مقدار این آلکالوئیدها در این گیاه بسیار کم است، به طوری که یک تن برگ خشک پروانش فقط حاوی ۳ گرم وین‌کریستین می‌باشد و ارزش هر گرم آلکالوئید 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 می شود (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

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 جمع آوری مواد خام جهت بازیافت این آلکالوئیدها باشد. آزمایش نشان داده است که در بسیاری موارد توانایی تولید متابولیتهای ثانویه وابسته به مراحل اندام زایی 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 آلکالوئیدها نیست آنها به کشت قطعه‌ای از اندام که تولید مستقیم اندامهای انبوه و فراوان کند، پرداختند. زیرا اندام زایی از طریق کالوس هم میزان عملکرد را پایین می آورد و هم بسیار زمان بر است (۱۸). در آزمایش آنها بذرها 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 سریع تر می کند (۱۸). یوآن 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 ساقه زایی 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 ساقه ها 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 MS و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی مناسب ترین 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 , NAA , KN , BAP در طی۳۰ 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 اندازه گیری میزان کالوس زایی و ریشه زایی 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 ساقه زایی 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 اتانل۷۰ 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

گیاهان رشد کرده برای آزمایش اندام زایی استفاده شدند. نمونه برداری در مرحله ۶-۸ برگی گیاهچه ها 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 میلی گرم 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 سانتی گراد 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 ساقه زایی و ریشه زایی: از دو آزمایش جداگانه برای بهینه سازی ساقه زایی مستقیم استفاده شد. طرح آماری مورد استفاده در آزمایش اول، فاکتوریل ۵×۳ با دو عامل هورمون BAP در سه سطح (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر) و NAA در پنج سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی گرم 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 ۵×۳ با دو عامل هورمون KN در سه سطح (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر) و NAA در پنج سطح (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار و شش ریزنمونه در هر پتری دیش بود. آزمایش ریشه‌زایی به صورت فاکتوریل ۵×۳ با دو هورمون IBA در سه سطح (۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ میلی گرم در لیتر) و هورمون NAA در پنج سطح (صفر ، ۱ ، ۲، ۳ و ۴ میلی 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 شیشه های استریل درب آنها به دقت بسته شده و با پارافیلم پوشانده شد. شیشه ها در اتاق کشت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد 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 گیاهچه هایی 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 ریشه زایی 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 ساقه-زایی دو شاخص درصد ساقه‌زایی و تعداد گیاهچه ثبت گردید. در آزمایش ریشه‌زایی، دو هفته پس از انتقال نمونه‌ها به محیط فاقد هورمون یادداشت برداری 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 اندام زایی و تعداد گیاهچه آزمایش اول ریزازدیادی: با

شمارش تعداد ریزنمونه های باززا شده در هر تکرار، درصد اندام‌زایی اندازه‌گیری شد(شکل ۱). تجزیه واریانس صفت اندام زایی (جدول ۱) در مورد هورمون KN نشان داد که مقادیر مختلف این هورمون در سطح احتمال (۰/۰۱ ≥P) اختلاف معنی‌دار دارند. با مقایسه میانگینها (نمودار ۱)، از سه غلظت KN (صفر، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر) مورد استفاده، غلظت ۰/۲ میلی گرم در لیتر بالاترین بازرایی 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 ریزنمونه های 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 میلی گرم در لیتر درصد اندام زایی در گیاه زنجبیل کاهش یافت. اما در غلظتهای پایین تر از ۲ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر) بیشترین درصد اندام زایی مربوط به غلظت یک میلی گرم 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 میلی گرم هورمون NAA گزارش دادند. اثر متقابل دو هورمون NAA × KN در سطح احتمال (۰/۰۱ ≥P) 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) 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 غلظت های مختلف هورمون NAA در سطح احتمال (۰/۰۱ ≥P) اختلاف معنی‌داری نشان داد. بهترین غلظت هورمون NAA یک میلی گرم در لیتر با میانگین ۱۲/۲۵ ساقه به ازای هر ریزنمونه و کمترین بازده تعداد گیاهچه مربوط به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون NAA با میانگین ۹/۹۱۷ گیاهچه بود. در این تحقیق افزایش غلظت هورمون NAA باعث افزایش تعداد ساقه به ازا هر ریزنمونه گردید. قانسان و جایابالان (۱۰) در مورد پنبه و کیم و همکاران (۱۵) در مورد سرخارگل با غلظت یک میلی گرم 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 NAA × KN در سطح (۰/۰۱ ≥P) معنی‌دار شد و مقایسه میانگینها (جدول ۲) نشان داد که ترکیب هورمونی یک میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر KN با میانگین ۱۳ گیاهچه بالاترین و تیمار ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر NAA بدون هورمون KN و تیمار ۲ میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۲ میلی گرم در لیتر KN هر دو با میانگین ۸ پایین ترین تعداد تولید گیاهچه را دارا بودند.

ب- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین درصد اندام زایی و تعداد گیاهچه آزمایش دوم ریزازدیادی : تجزیه واریانس (جدول ۳) صفت درصد اندام‌زایی برای هورمونهای BAP ، NAA و اثر متقابل آنها در سطح احتمال (۰/۰۱ ≥P) معنی‌دار شد. مقایسه میانگینها نشان داد که بهترین مقدار BAP با ۸۷ درصد اندام‌زایی غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر، بهترین مقادیر NAA یک و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر و بهترین ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی گرم در لیتر NAA با ۱۰۰

درصد اندام‌زایی بود. بن موسی و همکاران نیز همین نتایج را در آزمایشی روی گیاه شویدی مشاهده کردند (۷). ژانگ 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)	
		درصد اندام زایی	تعداد گیاهچه
KN	۲	۷۲۶/۶۶۷**	۴/۵۵۰ ns
NAA	۴	۱۹۰ ns	۱۰/۶۴۲*
KN × NAA	۸	۳۱۰*	۱۲/۷۱۷*
خطا	۴۵	۱۱۷/۷۷۸	۴/۶۷۲
کل	۵۹		

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

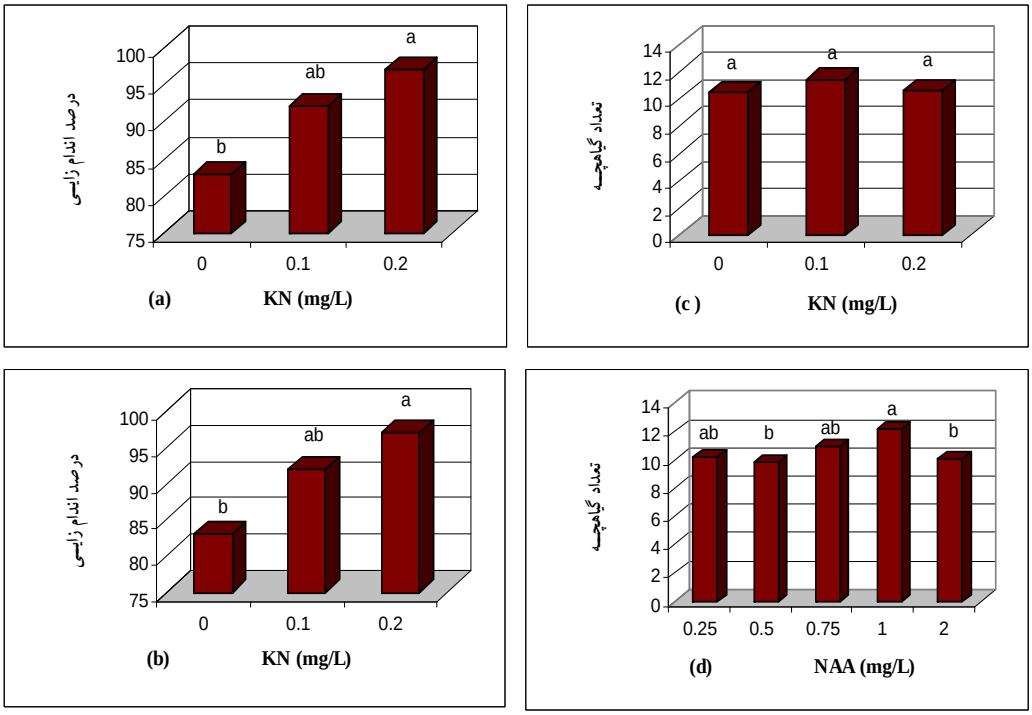
جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA × KN بر درصد اندام‌زایی و تعداد گیاهچه

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

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

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 باززایی نوساقه نابجا در ریزنمونه‌های برگی چغندرقند 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

معنی‌داری در سطح احتمال (P≤ ۰/۰۱) نشان داد و مقایسه میانگینها بهترین سطح هورمون BAP را ۰/۱ میلی گرم در لیتر مشخص کرد.



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

سطوح مختلف هورمون NAA نیز با هم در سطح احتمال (P≤ ۰/۰۱) 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 پایین ترین بازده نشان دادند. اثر متقابل هورمونهای BAP × NAA در سطح (P≤ ۰/۰۱) اختلاف معنی‌داری نشان دادند. مقایسه میانگینها (جدول ۴) ثابت کرد که ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA به 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.

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

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

**: 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

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

ریشه‌زایی

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 و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) از نظر صفت تعداد ریشه در سطح احتمال (۰/۰۱ ≥P) اختلاف معنی‌دار نشان داد و از این لحاظ بین غلظت های مختلف این هورمون تفاوت معنی‌داری وجود داشت. 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 ریشه ها 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 می کند. هانداپانی و همکاران (۸) نیز از غلظت ۰/۴۴ میلی گرم در لیتر هورمون IBA بهترین نتیجه ریشه‌زایی را به

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

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

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

**: معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

کاشف حسین و انیس (۱۴) برای ریشه‌زایی ساقه های 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 مناسب ترین 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 و۴ میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ($P\leq$ 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 (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). چویریگارای 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 NAA × IBA 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.

با دقت در جدول ۶ مقایسه میانگین اثر متقابل NAA × IBA، مشاهده می شود که در غلظتهای پایین هورمون NAA هر چه غلظت هورمون IBA افزایش یافته تعداد ریشه‌ها نیز افزایش پیدا کرده است.

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

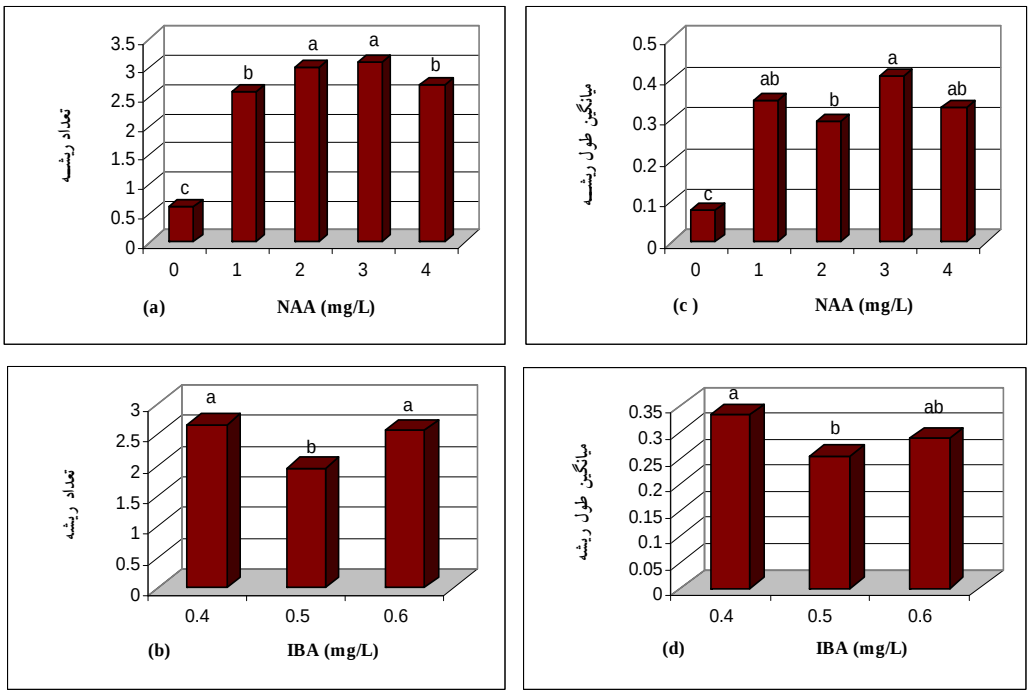
جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA × IBA بر تعداد و طول ریشه

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

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

در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر هورمون NAA غلظت های 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 IBA تعداد ریشه‌ها کاهش یافته است. در جدول (۵) تجزیه واریانس طول ریشه ها نشان داده شده است. در مورد هورمون IBA بین غلظتهای مختلف در سطح احتمال (P≤ ۰/۰۱) 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) بلند ترین طول ریشه ها را برای ریشه‌زایی ساقه های 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 ریشه را گزارش نمودند. هورمون NAA برای صفت طول ریشه‌ها در سطح احتمال (P≤ ۰/۰۱) معنی دار 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.



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

در مجموع افزایش غلظت هورمون NAA باعث افزایش طول ریشه‌ها گردید. چویریگارای 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 گیاهچه-های نیشکر غلظت مناسب هورمون NAA را ۰/۵ میلی گرم در لیتر برای محیط مایع و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر برای محیط جامد گزارش کردند. اثر متقابل هورمونهای IBA ×NAA از لحاظ صفت طول ریشه در سطح احتمال ($P\leq$ ۰/۰۱) 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.

منابع

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 چغندرقند (*Beta Vulgaris* L.) در شرایط درون شیشه‌ای. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲(۴): صفحه ۷۱۹ تا ۷۲۹.

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

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