ریز ازدیادی گیاه دارویی آب بشقابی (*Centella asiatica* L.)

سعیده قدیری سردرود[۱]، سارا سعادتمند[۱*]، محمد حسن عصاره[۲] و طاهر نژادستاری[۱]

[۱] **ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی**

[۲] **ایران، تهران، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور**

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۵

چکیده

Centella asiatica (L.) از جمله گیاهان دارویی پرمصرف و محبوب در سراسر دنیا است که در خاورمیانه، اروپا و آمریکا دارای محبوبیت فراوانی است. این گیاه دارای خواص ضد باکتری و ضد قارچی بوده و در درمان آسم و برونشیت نیز به کار می‌رود. در سال‌های اخیر به دلیل بهره‌برداری نامحدود و بدون برنامه از این منبع گیاهی، و تلاش‌های ناکارآمد در احیای این گونه گیاهی دارویی ارزشمند، ذخیره گیاهی *Centella asiatica* (L.) در طبیعت به طور چشمگیری کاهش یافته و در معرض خطر نابودی قرار دارد. در همین راستا علاقه به تکنیک‌های کشت *in vitro* از جمله تکنیک ریزازدیادی از طریق کشت بافت جهت تکثیر این گیاه ارزشمند افزایش یافته است. در این پژوهش نیز ریزازدیادی این گیاه از طریق کشت بافت گیاهی برای نخستین بار در ایران توسط ریزنمونه‌های گره‌ای بررسی شد. جهت تکثیر، بخش‌های گره‌ای از نمونه‌های جمع‌آوری شده از عرصه در استان گیلان، پس از سترون‌سازی در محیط کشت MS حاوی mgL^{-1} ۱ BA و mgL^{-1} ۰/۱ IBA مستقر گردیدند. پس از یک ماه، ریزنمونه‌های رشد یافته به منظور دست‌یابی به بهترین تیمار شاخه‌زایی، تحت ۹ تیمار هورمونی مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. با بررسی نتایج، محیط کشت MS حاوی mgL^{-1} ۰/۵ BA و mgL^{-1} ۰/۵ 2ip و mgL^{-1} ۰/۱ NAA به عنوان تیمار برتر شاخه‌زایی معرفی شد. جهت ریشه زایی و سازگاری در گلخانه، بررسی ۱۱ تیمار هورمونی مختلف در محیط کشت MS نشان داد که تیمار حاوی mgL^{-1} ۰/۵ IBA بهترین نتایج را در برداشته است.

واژه های کلیدی: *Centella asiatica* (L.)، ریزازدیادی، کشت بافت گیاهی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۶۵۰۴۰ ، پست الکترونیکی: sadatmandsara@gmail.com

مقدمه

Centella asiatica (L.) از جمله گیاهان دارویی ارزشمند، پرمصرف و محبوب در سراسر دنیا است که در خاورمیانه، اروپا و آمریکا دارای محبوبیت فراوانی است و با نام‌های mandukparni ، Indian pennywort و یا gotu kola نیز شناخته می‌شود. در واقع هزاران سال است که از این گیاه به عنوان یک داروی مفید و موثر در سنت آیورودا هند (Ayurvedic) استفاده می‌شود و از ۲۰۰۰ سال پیش تا کنون در چین نیز به عنوان "Miracle elixirs of life" مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸، ۵، ۲۰). علاوه بر این، نام این گیاه در فارماکوپه گیاهان دارویی هند، همئوپاتی آلمان (GHP)، اروپا و جمهوری چین آورده شده است (۷، ۱۴). همانطور که گفته شد، در پزشکی سنتی هند، از *Centella asiatica* (L.) به عنوان یک تونیک مغذی یاد شده و از آن برای درمان آسم، برونشیت، ورم، پیل پایی، عفونت معده، مشکلات کلیه، جزام، بیماری‌های پوستی و التهاب میزراه استفاده می‌شود. همچنین ذکر شده است که این گیاه دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچی، ضد انعقادی، ضد التهابی، ضد استرس، فعالیت ضد توبولوزیس و بهبود زخم می باشد (۴، ۶، ۹، ۱۲، ۱۳). Centella متعلق به خانواده Umbelliferae (Apiaceae) و دارای ۴۰ گونه در سراسر

جهان است که در این بین، گونه *Centella asiatica* (L.) اغلب در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و مرطوب جهان از ارتفاع صفر تا ۲۰۰۰ متر رویش دارد (۴). پراکنش این گیاه در هر ۲ نیمکره زمین شامل هند، سریلانکا، جنوب غرب آسیا، اغلب نواحی چین، مکزیک، جنوب غرب آمریکا، ونزوئلا و ماداگاسکار می‌باشد (۷، ۲۱).

Centella asiatica (L.) گیاه چند ساله با ساقه‌های خزنده، در محل گره‌ها مولد ریشه، کرکدار، منشعب. برگ‌ها گروهی (دسته‌ای)، به قطر ۱–۵ سانتیمتر، دایره‌ای – کلیوی شکل، ۷–۹ رگبرگی، به طور منظم کنگره‌ای، سینوس قاعده‌ای عمیق و کم و بیش با دهانه باز، دمبرگ‌ها ۲–۱۰ بار بلندتر از پهنک، اصولا در سطح فوقانی کرکدار. دم گل‌آذین ها ۲–۴ تایی در میان برگ‌های گروهی، گل‌های هر کپه ۲–۴ تایی، گل‌ها تقریبا بدون دمگل، قرمز رنگ، گلبرگ‌ها به طور ۱/۵ میلیمتر، پرچم‌ها به اندازه نصف اندازه گلبرگ‌ها. میوه‌ها قهوه‌ای، به طول ۳ میلیمتر، به عرض ۳–۴ میلیمتر، ضخامت ۱ میلیمتر، پره‌دار، با پره‌های جانبی مشبک (۱).

با توجه به محبوبیت این گیاه در میان مردم تقاضا برای این گیاه روز به روز افزایش می‌یابد. در سال‌های اخیر به دلیل بهره‌برداری نامحدود و بدون برنامه از این منبع گیاهی ارزشمند، و به دلیل تقاضای روزافزون صنایع داروسازی و همچنین کشت محدود و نیز تلاش‌های ناکارآمد در احیای این گونه گیاهی دارویی ارزشمند، ذخیره گیاهی *Centella asiatica* (L.) در طبیعت به طور چشمگیری کاهش یافته و در معرض خطر نابودی قرار دارد. به خاطر همین مشکل نام این گیاه در اتحادیه بین المللی حفاظت از طبیعت و منابع ملی (IUCN) به عنوان گونه گیاهی تهدید شده و در معرض خطر به ثبت رسیده است (۱۰). از این رو در سال‌های اخیر، علاقه به تکنیک‌های کشت in vitro جهت تکثیر این گیاه ارزشمند افزایش یافته است. این تکنیک‌ها در حقیقت یک ابزار مناسب برای حفظ و تکثیر ژرم پلاسم گونه های نادر و در معرض خطر می‌باشند. بنابراین بدست آوردن و توسعه تکنیک‌های کارآمد برای تکثیر *Centella asiatica* (L.) مهم و ضروری می‌باشد. یکی از این تکنیک‌ها ریزازدیادی از طریق کشت بافت می‌باشد که در حفظ ژرم پلاسم *Centella asiatica* (L.) بسیار موثر است. لذا در این پژوهش نیز ریزازدیادی این گیاه ارزشمند دارویی از طریق کشت بافت گیاهی برای اولین بار در ایران، در ریزنمونه‌های گره‌ای انجام شده و بهترین روش بهینه گردیده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: رویشگاه گونه *Centella asiatica* (L.)، در استان گیلان، شهرستان رشت، روستای لاکان، توسط بازدیدهای میدانی محققان موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ایستگاه پیلمبره، مکان یابی و جهت نمونه برداری انتخاب شد. گیاه C. asiatica جمع‌آوری گردید و از قطعات گره‌ای به عنوان ریزنمونه برای تکثیر گیاه در شرایط *in vitro* استفاده شد.

محیط کشت: محیط کشت پایه مورد استفاده در این پژوهش، محیط‌کشت MS (۱۱) بود، که در حین کار و در صورت لزوم تغییراتی در ترکیبات و غلظت‌های آن صورت گرفت. همچنین در اغلب موارد یک یا چند تنظیم کننده رشد نیز به آن اضافه شد. در این پژوهش محیط MS تنها به‌صورت نیمه‌جامد به‌کار رفت.

ترکیبات محیط کشت: محیط کشت MS شامل عناصر میکرو مانند ترکیبات آهن‌دار، روی، سدیم و...، عناصر ماکرو مانند نیترات، کلرید کلسیم و ...، آگار gL^{-1} ۶/۵ به عنوان ماده‌ای جهت نیمه‌جامد کردن محیط‌کشت، شکر gL^{-1} ۳۰ به‌عنوان منبع کربن و مجموعه ای از ویتامین ها و اسیدهای آمینه بود، که البته در صورت لزوم و بر اساس نوع هدفی که از ساختن محیط مورد انتظار بود تنظیم‌کننده‌های رشد (هورمون‌های گیاهی) نیز به مواد

فوق‌الذکر اضافه شد. pH محیط نیز با سود یا اسید کلریدریک یک مولار بر روی ۵/۷ تنظیم گردید.

پیش سترون سازی و سترون سازی ریزنمونه‌ها: پس از جدا کردن برگ‌ها و ریشه‌ها، ریزنمونه‌ها طی ۱۱ تیمار با غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت، با استفاده از آب و مایع ظرفشویی، قرار گرفتن در زیر شیر آب جاری و استفاده از الکل ۷۰٪ و قارچ کش بنومیل ۰/۱٪ به همراه حمام آبی ۴۰ درجه سانتیگراد، پیش‌سترون گردیدند. سپس ریزنمونه‌های پیش‌سترون شده، داخل هود مخصوص کشت بافت توسط محلول کلرمرکوریک ۰/۱٪ (W/V)، و پس از سه مرتبه آبشویی سترون و جهت استقرار آماده شدند (جدول ۱). آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها به وسیله تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز گردیده و سپس میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شده و بهترین تیمار پیش‌سترون سازی و سترون سازی انتخاب گردید (جدول ۴).

جدول ۱- تیمارهای پیش سترون و سترون سازی

کد تیمار	غلظت قارچ‌کش بنومیل	قارچ کش + حرارت (دقیقه + درجه سیلسیوس)	الکل ۷۰٪ (ثانیه)	کلرمرکوریک ۰/۱٪ (دقیقه)
S1	-	-	-	۵
S2	-	-	-	۱۰
S3	٪۰/۳	۳۰	-	۵
S4	٪۰/۳	۳۰	-	۱۰
S5	٪۰/۳	۳۰ + ۴۰ ^{oC}	-	۷
S6	٪۰/۳	۳۰	-	۷
S7	٪۰/۱	۳۰ + ۴۰ ^{o} C	۳۰	۷
S8	٪۰/۱	۳۰ + ۴۰ ^{o} C	-	۵
S9	٪۰/۱	۳۰	۳۰	۷
S10	٪۰/۱	۳۰	-	۷
S11	٪۰/۱	۳۰ + ۴۰ ^{oC}	-	۷

تمامی تیمارها به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار گرفتند.

مرحله استقرار: به‌منظور تولید گیاهچه‌های عاری از آلودگی محیط کشت MS پایه همراه با ترکیبی از اکسین و سیتوکینین در نظر گرفته شد. به این منظور ریزنمونه‌های سترون شده در هود مخصوص کشت بافت در ویال‌های حاوی محیط کشت MS با BA ۱ mgL^{-1} و ۰/۱ mgL^{-1} IBA مستقر گردیدند و بازدهی جوانه‌زنی قطعات گره‌ای ثبت شد (جهت کنترل آلودگی هر ریزنمونه داخل یک ویال کاشته شد).

مرحله تکثیر(Proliferation): جهت تکثیر، جوانه‌های حاصل از ریزنمونه‌های گره ای اولیه از ویال خارج شده و درون محیط کشت MS با ۹ تیمار هورمونی مختلف (جدول۲) مستقر گردیدند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شد. یادداشت برداری ۴ هفته پس از کاشت آغاز شد و دو صفت ضریب تکثیر و میانگین طول ریزنمونه در هر تیمار مورد بررسی قرارگرفته و نتایج بدست آمده ثبت شد. داده‌ها به وسیله تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز

گردیده و سپس میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شده و بهترین تیمار تکثیر انتخاب گردید (جدول ۵). سپس تمامی گیاهچه‌ها به منظور افزایش درصد تکثیر به محیط منتخب منتقل شدند.

جدول ۲- تیمارهای شاخه زایی

کد تیمار	BA mgL^{-1}	2ip mgL^{-1}	NAA mgL^{-1}	IBA mgL^{-1}	1/2 NO3
P1	۱	–	۰/۱	-	-
P2	۲	–	۰/۱	-	-
P3	۳	–	۰/۱	-	-
P4	۴	–	۰/۱	-	-
P5	۵	–	۰/۱	-	-
P6	۰/۵	۰/۵	۰/۱	-	-
P7	۰/۵	۰/۵	-	۰/۱	-
P8	۰/۵	۰/۵	-	۰/۱	*
P9	۰/۵	۰/۵	۰/۱	-	*

مرحله ریشه زایی: تمامی گیاهچه‌ها به منظور ریشه‌زایی به محیط کشت MS با ۱۱ تیمار هورمونی مختلف در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار (جدول۳) منتقل گردیدند. یادداشت برداری ۵ هفته پس از کاشت آغاز شده و درصد ریشه‌زایی و همچنین صفاتی همچون شکل ظاهری ریشه، انعطاف‌پذیری و وجود یا عدم وجود تارهای کشنده در هر تیمار بررسی و ثبت شد. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در هر ۱۱ تیمار به منظور بررسی درصد سازگاری در شرایط گلخانه، به گلدان‌های پلاستیکی با ترکیب خاک (کوکوپیت، پرلیت و ورمی کمپوست) با نسبت‌های به ترتیب (۲، ۱، ۰/۵) منتقل شدند و روی گلدان‌ها نیز با کاور نایلونی جهت حفظ رطوبت پوشیده شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای کنترل شده نگهداری شده و پس از ۱ هفته با بازکردن تدریجی پوشش گلدان‌ها، گیاه‌های کشت بافتی سازگار گردیدند. یادداشت‌برداری نیز ۲۰ روز بعد از کاشت در گلدان آغاز شد و درصد سازگاری در هر تیمار محاسبه و در نهایت نتایج حاصل از درصد ریشه‌زایی، همچنین درصد سازگاری به وسیله تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز گردیده و سپس میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شد و بهترین تیمار ریشه‌زایی انتخاب گردید (جدول ۶).

جدول ۳- تیمارهای ریشه زایی

کد تیمار	IBA mgL^{-1}	NAA mgL^{-1}	1/2 NO3	Sucrose $20gL^{-1}$
R1	۰/۵	-	-	-
R2	۰/۵	-	-	*
R3	۰/۵	-	*	*
R4	۰/۵	-	*	-
R5	۰/۱	-	-	-
R6	۰/۱	-	*	-
R7	-	-	-	-
R8	-	-	*	-
R9	۱	-	-	-
R10	-	۰/۵	-	-
R11	-	۱	-	-

نتایج

نتایج بررسی پیش سترون سازی و سترون سازی: بررسی اثر ۱۱ تیمار پیش سترون‌سازی و سترون‌سازی بر روی زنده‌مانی ریزنمونه‌ها (جدول ۴) نشان داد که تیمار S11 (استفاده از آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه، قارچ کش ۱٪ (W/V) و حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و

کلرمرکوریک ۰/۱٪ (W/V) به مدت ۷ دقیقه) با ۷۶/۶۷٪ زنده مانی، بالاترین میانگین را داشته و با سایر تیمارها نیز از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشت.

جدول۴- درصد زنده مانی ریزنمونه ها

کد تیمار	درصد زنده مانی
S1	۱/۱۱±۱/۱۱ a
S2	۱/۱۱±۱/۱۱ a
S3	۶/۶۷±۱/۹۲ ab
S4	۱۳/۳۳±۱/۹۲ c
S5	۱۰±۱/۹۲ bc
S6	۳/۳۳±۱/۹۲ a
S7	۲۰±۱/۹۲ d
S8	۴۰±۱/۹۲ e
S9	۲/۲۲±۱/۱۱ a
S10	۳/۳۳±۱/۹۲ a
S11	۷۶/۶۷±۱/۹۲ f

تیمارها بر اساس جدول ۱ می باشند. هر داده معرف میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می باشد.

نتایج بررسی استقرار: نتایج حاصل از بررسی بازدهی جوانه زنی قطعات گره‌ای نشان دهنده موفقیت ۹۰ درصدی محیط کشت MS حاوی BA ۱ mgL^{-1} و ۰/۱ mgL^{-1} IBA بود.

نتایج بررسی تکثیر: بررسی اثر ۹ تیمار هورمونی در محیط کشت MS (جدول ۲)، بر روی دو صفت طول ریزنمونه و ضریب تکثیر نشان داد که در صفت طول ریزنمونه، تیمار P6 (BA ۰/۵ mgL^{-1} و 2ip ۰/۵ mgL^{-1} و ۰/۱ mgL -1 NAA) بالاترین میانگین را داشته و با سایر تیمارها نیز از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۵). در بررسی ضریب تکثیر نیز از آنجا که همچنان تیمار P6 (BA ۰/۵ mgL^{-1} و 2ip ۰/۵ mgL^{-1} و ۰/۱ mgL^{-1} NAA) در مقایسه با سایر تیمارها، بالاترین میانگین را به خود اختصاص داده بود و از نظر آماری با آن ها در سطح ۵٪ اختلاف معنا دار داشت (جدول ۵) و یا در صورتی که از نظر آماری اختلاف معنادار نداشت، کمترین میزان هورمون های گیاهی در آن مورد استفاده قرار گرفته بود، به عنوان برترین تیمار تکثیر ثبت گردید.

جدول ۵- مقایسه ۹ تیمار هورمونی مختلف در دو صفت ضریب تکثیر و طول ریزنمونه در مرحله تکثیر

نام تیمار	ضریب تکثیر	طول ریزنمونه
P1	1.93±.05 a	5.20±.19 ab
P2	1.99±.03 a	4.40±.19 c
P3	1.98±.02 a	4.70±.19 bc
P4	1.98±.04 a	3.47±.18 d
P5	2.03±.02 a	3.50±.19 d
P6	2.00±.03 a	5.50±.19 a
P7	1.81±.02 b	3.60±.19 d
P8	1.76±.02 b	3.80±.19 d
P9	1.56±.04 c	3.50±.19 d

تیمارهایی که با حروف متفاوت مشخص شده اند از نظر آماری با یکدیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنادار دارند. هر داده معرف میانگین + انحراف معیار سه تکرار می باشد.

نتایج بررسی ریشه زایی: در مقایسه میانگین ۱۱ تیمار هورمونی مختلف در محیط کشت MS بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن بر روی درصد ریشه‌زایی تنها تیمار R7 (جدول۳) کمترین میانگین درصد ریشه زایی را داشته و با سایر تیمارها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۶). و سایر تیمارها از لحاظ آماری با یکدیگر

اختلاف معناداری نداشتند. مقایسه میانگین درصد سازگاری از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در ۱۱ تیمار هورمونی مختلف در محیط کشت MS (جدول ۶) نیز نشان دادن که کمترین درصد سازگاری در تیمارهای R7، R10 و R11 (جدول۳) بود، اما سایر تیمارها با یکدیگر اختلاف معناداری نداشتند.

شکل۱- استقرار و جوانه زنی ریزنمونه‌های گره ای در ویال هایی با محیط کشت MS بهمراه BA ۱ mgL^{-1} و IBA ۰/۱ mgL^{-1}

لذا از آنجا که استفاده از کمترین میزان تنظیم کننده‌های رشد و همچنین بالاترین درصد ریشه‌زایی و درصد سازگاری مورد نظر بود، و همچنین بر اساس بررسی صفات مشاهده‌ای که از نظر آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار نگرفته اند از جمله وجود تار کشنده در ریشه ها، انعطالف پذیری ریشه ها تراکم ریشه ها و همچنین شادابی گیاهان سازگار شده در گلدان، تیمار R1 حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA به عنوان برترین محیط ریشه‌زایی انتخاب گردید (جدول ۶).

شکل ۲- محیط برتر تکثیر، تیمار P6 (BA ۰/۵ mgL^{-1} و 2ip ۰/۵ mgL و NAA ۰/۱ mgL^{-1})

جدول ۶- مقایسه ۱۱ تیمار هورمونی مختلف در دو صفت درصد ریشه زایی و درصد سازگاری در مرحله ریشه زایی

نام تیمار	درصد ریشه زایی	درصد سازگاری
R1	98.61±1.39 a	91.67±2.86 a
R2	88.89±3.01 b	87.11±3.55 a
R3	94.44±2.52 ab	91.22±3.04 a
R4	94.44±2.52 ab	91.22±3.04 a
R5	90.28±2.96 ab	94.44±4.05 a
R6	90.28±2.96 ab	83.89±4.77 a
R7	43.06±3.39 c	42.61±8.44 c
R8	94.44±2.52 ab	91.67±3.50 a
R9	98.61±1.39 a	87.50±3.03 a
R10	94.44±2.52 ab	59.67±6.34 b
R11	94.44±2.52 ab	43.44±2.31 c

تیمارهایی که با حروف متفاوت مشخص شده اند از نظر آماری با یکدیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنادار دارند. هر داده معرف میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می باشد.

شکل ۳- محیط برتر ریشه‌زایی، تیمار R1 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA

شکل ۴- سازگاری گیاهان ریشه دار شده در شرایط گلخانه

شکل ۵- گیاهان سازگار شده و نگهداری شده در گلخانه

بحث

در این پژوهش پیش‌سترون‌سازی و سترون‌سازی ریزنمونه‌ها با استفاده توام از آب جاری، قارچ کش ۰/۱٪ به همراه حرارت و کلرمرکوریک ۰/۱٪، تا حدی با روش‌های Thangapandian (۱۷) و singh (۱۶) همسو بود، با این تفاوت که Thangapandian (۱۷) علاوه بر

استفاده از آب جاری و کلرمرکوریک ۰/۱٪ استفاده از دترجنت ۰/۱٪ به مدت ۵ دقیقه را پیشنهاد کرده و singh (۱۶) نیز استفاده از Teepol 10% به مدت ۱۵ دقیقه را به ترکیبات فوق اضافه کرده بود. همچنین در مطالعاتی که توسط Bangaru Naidu (۲) انجام شده استفاده از آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه، Teepol 5% به مدت ۵ دقیقه و کلرمرکوریک ۰/۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه توصیه گردید که این نتایج نیز تا حدودی هم راستا با نتایج بدست آمده در این پژوهش بود. در همین راستا ترکیبی از decon، Certimide 1%، Bavistin 150 mgL^{-1}، Trimethoprime 50 mgL^{-1}، PPM 2% و $HgCl_2$ 0.1% نیز به عنوان ترکیب موثر در پیش‌سترون‌سازی و سترون‌سازی توصیه گردید (۱۵) که در مقایسه با تیمار پیشنهاد شده در این پژوهش (استفاده از آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه، قارچ کش ۱٪ (W/V) و حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و کلرمرکوریک ۰/۱٪ (W/V) به مدت ۷ دقیقه) از ترکیبات بیشتری در آن استفاده شده و تنها در استفاده از کلرمرکوریک تشابه داشت، لذا، از آنجایی که همواره استفاده از کمترین ترکیبات شیمایی و در نتیجه کمترین آسیب به بافت گیاهی مدنظر است، تیمار مورد استفاده در این پژوهش جهت پیش‌سترون‌سازی و سترون‌سازی پیشنهاد می‌گردد.

در اکثر تیمارهای پیشنهاد شده در استقرار، ترکیبی از اکسین و سیتوکینین به خصوص استفاده از BA پیشنهاد می‌شود، از جمله تیمار پیشنهاد شده توسط Tiwari (۱۹) که استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA را جهت مرحله استقرار توصیه کرد. در این پژوهش نیز از ترکیبی از اکسین و سیتوکینین استفاده شد (محیط کشت MS با ۱ mgL^{-1} BA و ۰/۱ mgL^{-1} IBA) که از نظر نوع اکسین و مقدار سیتوکنین مورد استفاده با نتایج Tiwari و Siavash Moghaddam (۱۵و ۱۹) مغایرت داشت.

در تکثیر ریزنمونه‌ها در این پژوهش استفاده از هورمون BA به عنوان سیتوکینین در غلظت‌های پایین به همراه یک سیتوکینین دیگر همچون 2ip و حضور یک اکسین همانند NAA تاثیر بسیار بیشتری نسبت به استفاده از BA در غلظت‌های بالا داشت،که تا حدودی هم راستا با پژوهش‌های Tiwari (۱۸) بود در حالی که محیط کشت پیشنهادی آن‌ها محیط کشت پایه MS همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA برای تکثیر و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای افزایش طول گیاهچه‌ها بود، این در حالی است که در این پژوهش، برای دو صفت تکثیر و افزایش طول ریزنمونه از یک محیط کشت همراه با تیمار هورمونی یکسان استفاده شده و به جای استفاده از هورمون BA در غلظت‌های بالا از این هورمون در غلظت بسیار کمتر استفاده شد و در عوض با استفاده از یک نوع هورمون دیگر از خانواده سیتوکینین‌ها (2ip) و با غلظت کم، اثر سینرژیک آن‌ها افزایش یافت و جایگزین غلظت بالای BA شد. همچنین از هورمون NAA به عنوان اکسین استفاده شده است در حالی که Tiwari (۱۹) IBA را جایگزین NAA کرد. Das R. (۳) و Siavash moghadam (۱۵) نیز، نتایجی مشابه با Tiwari (۱۸) ارائه دادند که در میزان مورد استفاده از دو هورمون BA و NAA با یکدیگر مغایرت داشتند. این در حالی است که Thangapandian (۱۷) و Tiwari (۱۹) استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA همراه با ۱/۵ میلی گرم بر لیتر BA را در تکثیر شاخه موثر دانستند و همچنین برای افزایش طول ریزنمونه‌ها بالا بردن میزان BA تا ۴ میلی گرم بر لیتر و IAA تا ۱ میلی‌گرم بر لیتر را پیشنهاد دادند (۱۷). آزمایشی نیز بر روی استفاده از سیتوکنین‌ها به تنهایی در غلظت‌های مختلف در نکثیر ریزنمونه‌ها انجام شده است، در این آزمایش غلظت‌های بین ۱ تا ۳ میلی گرم بر لیتر از BA و ۰/۵ تا ۳ میلی گرم بر لیتر از Kin مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت استفاده از محیط کشت پایه MS همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵

میلی‌گرم بر لیتر Kin پیشنهاد گردید که با نتایج بدست آمده در این پژوهش و سایر پژوهش‌های انجام شده مغایرت داشت (۱۶) که نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه می‌باشد و نظر می‌رسد که استفاده از کمترین میزان هورمون‌های گیاهی با توجه به نتایج مشابه با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطلوب‌تر و موثرتر باشد.

بالا رفتن چشمگیر درصد ریشه‌زایی و سازگاری در حضور IBA ۰/۵ mgL^{-1} در این پژوهش، و حتی بهتر شدن کیفیت ریشه‌ها در این غلظت از IBA با نتایجی که Siavash moghadam (۱۵)، Tiwari (۱۹) در استفاده از IBA ۰/۵ mgL^{-1} اعلام کردند کاملا یکسان بود، همچنین نتایج حاصل شده تا حدودی با نتایج Bangaru Naidu (۲) و Das R. (۳) نیز هم راستا بود البته با کمی تغیر در محیط کشت و یا میزان مورد استفاده از هورمون IBA، به نحوی که استفاده از ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA به همراه محیط کشت MS پایه با نصف میزان نیترات مصرفی (۲) و همچنین استفاده از محیط کشت MS پایه به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA (۳) پیشنهاد گردید. در همین راستا، Tiwari (۱۸) استفاده از ۴ میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را جهت ریشه‌زایی معرفی کرد و یک سال بعد در سال نیز singh (۱۶) استفاده از ۱ میلی گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی گرم بر لیتر IBA را جهت ریشه زایی مناسب دانست، لذا از آنجایی که استفاده از کمترین میزان هورمون های گیاهی مطلوب است و با توجه به نتایج مشابه با نتایج بدست آمده در این پژوهش، به نظر می‌رسد همچنان استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA به تنهایی برای ریشه‌زایی مفید بوده و نتایج رضایت بخشی داشته باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش تکثیر گیاه *Centella asiatica* از طریق ریزازدیادی در شرایط درون شیشه، به واسطه یک پروتوکل کارآمد و مقرون به صرفه مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش حاضر در مقایسه با سایر پژوهش‌های انجام شده، کمترین میزان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در مراحل استقرار، تکثیر و ریشه‌زایی استفاده شد و نتایج بسیار رضایت بخشی را دربرداشت.

تشکر و قدردانی

در پایان، مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از خانم مهندس شکوفه شهرزاد، مدیرعامل محترم شرکت سلول فناور دارو، اعلام می‌داریم. بی تردید بدون کمک و همکاری‌های بی‌دریغ ایشان، انجام این پژوهش میسر نمی‌گشت.

منابع

۱- مظفریان، و. ۱۳۹۱. شناخت گیاهان دارویی و معطر ایران. انتشارات فرهنگ معاصر. ۱۱۶۲-۱۱۶۴ ص.

2- Bangaru Naidu, T., Nageswara Rao, S., Sarada Mani, N., Jagan Mohan, Y.S.Y.V. and Pola, S. (2010) Conservation of an endangered medicinal plant *Centella asiatica* through plant tissue culture. Drug Invention Today 2(1): 17 - 21

3- Das, R., Hasan M.F., Hossain, M.S. and Rahman, M. (2008) Micropropagation of *Centella asiatica* L. an important medicinal herb. Progressive agriculture 19(2): 51-56

4- Gallego, A., Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H.R., Hidalgo, D., Lalaleo, L., Khan Kayani, W. et al. (2014) Biotechnological production of centellosides in cell cultures of *Centella asiatica* (L) urban. Engineering in life science 14(6): 633–642

5- Gohil, K.J., Patel, J.A. and Gajjar, A.K. (2010) Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure-all. Indian Journal of pharmaceutical sciences 72(5): 546–556

6- Gupta, A., Verma, S., Kushwaha, P., Srivastava, S. and Aks, R. (2014) Quantitative estimation of asiatic acid, asiaticoside & madecassoside in two accessions of *Centella asiatica* (L) Urban

for morpho-chemotypic variation. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research 48(3): 75-79

7- James, J.T. and Dubery, I.A. (2009) Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. Molecules 14(10): 3922–3941

8- Jayashree, G., Muraleedhara, K.G., Sudarslal, S. and Jacob, V.B. (2003) Anti-oxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. Fitoterapia 74(5): 431-434

9- Maquart, F.X., Chastang, F., Simeon, A., Birembaut, P., Gillery, P. and Wegrowski, Y. (1999) Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. European journal of dermatology 9(4): 289–296

10- Mercy, S., Sangeetha, N. and Ganesh, D. (2012) In vitro production of adventitious roots containing asiaticoside from leaf tissues of *Centella asiatica* L. *In vitro* Cellular and Developmental Biology 48: 200–207

11- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-97

12- Prasad, A., Singh, M., Yadav, N.P., Mathur, A.K. and Mathur, A. (2014) Molecular, chemical and biological stability of plants derived from artificial seeds of *Centella asiatica* (L.) Urban - An industrially important medicinal herb. Industrial crops and products 60: 205–211

13- Rakotondralambo, S., Rodier-Goud, M., Rivallan, R., Lussert, A., Danthu, P., de Lamotte, F. et al. (2013) Insight into the biology, genetics and evolution of the *Centella asiatica* polyploid complex in Madagascar. Industrial crops and products 47: 118-125

14- Schaneberg, B.T., Mikell, J.R., Bedir, E. and Khan, I.A. (2003) An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. Die Pharmazie 58(6): 381–384

15- Siavash Moghaddam, S., Binti Jaafar, H., Abdul Aziz, M., Ibrahim, R., Rahmat, A. and Philip, E. (2011) Optimization of an Efficient Semi-Solid Culture Protocol for Sterilization and Plant Regeneration of *Centella asiatica* (L.) as a Medicinal Herb. Molecules 16: 8981-8991

16- Singh, G., Kaur, B., Sharma, N., Bano. A., Kumar, S., Harcharan, S. and Sharma, V. (2014) In vitro Micropropagation and Cytomorphological Evaluation of *Centella asiatica* (L.) Urban (Mandukparni) from Himachal Pradesh, India an Endemic, Endangered and Threatened Herb. Plant Tissue Culture and biotechnology 24(2): 155-171

17- Thangapandian, R., Suganya Devi, P. and Theresa, V. (2012) Rapid Micro Propagation Techniques for Conserving *Centella asiatica*- A Valuable Medicinal Herb. Research Journal of Pharmacognosy 3(2): 104-10

18- Tiwari, C.H., Bakshi, M. and Vichitra, A. (2013) A rapid two step protocol of in vitro propagation of an important medicinal herb *Centella asiatica* Linn. African Journal of Biotechnolog 12(10): 1084-1090

19- Tiwari, K.N. and Sharma, N.C., Tiwari, V. and Singh, B.D. (2000) Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63(3): 179-185

20- Ven Murthy, MR., Ranjekar, P.K., Ramassamy, C. and Deshpande, M. (2010) scientific basis for the use of Indian ayurvedic medicinal plants in the treatment of neurodegenerative disorders: ashwagandha. Central nervous system agents in medicinal chemistry 10(3): 238–246

21- Zahara, K., Bibi, Y. and Tabassum, S. (2014) Clinical and therapeutic benefits of *Centella asiatica*. Pure and Applied Biology 3(4): 152-159

Micropropagation of *Centella asiatica* L. (A Medicinal Plant)

Ghadiri Sardrood S.[1], Saadatmand S.[1], Assareh M.H.[2] and Nejad Satari T.[1]

[1] Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Centella asiatica (L.) is a popular and highly usable herb in the Middle East, Europe and the United States. It has anti-bacterial and anti-fungal properties, and is also used to treat asthma and bronchitis. In recent years, due to overexploitation, and ineffectual efforts to revitalize this valuable herbal source, the abundance of *C. asiatica* (L.) in nature has suffered significantly, increasing the risk of its extinction. Therefore, interest in micropropagation of this valuable herb through *in vitro* plant tissue culture techniques has grown considerably. In this study also, for the first time, the micropropagation of this valuable medicinal plant was carried out through plant tissue culture by nodal explants. In order to proliferation, nodal explants collected from herbal material in Gilan province, after sterilization were cultured in MS medium supplemented with BA 1 $mgL^{-1}$and IBA 0.1 mgL^{-1}. After 1 month, For studying the *in vitro* shoot proliferation responses, free-contaminated shoot explants were cultured in 9 treatments of modified MS medium, and MS medium supplemented with BA 0.5 mgL^{-1}, 2ip 0.5 mgL^{-1} and NAA 0.1 mgL^{-1} was selected as the best treatment. In the comparison of the effect of 11 different hormonal treatments in MS medium on rooting percentage and acclimatization, the MS medium supplemented with IBA 0.5 mgL^{-1} was chosen as the best treatment.

Key words *Centella asiatica* (L.), Micropropagation, Plant Tissue Culture