

اثر غلظت‌های مختلف اکسین و سایتوکینین بر تکثیر درون شیشه‌ای گیاه انسولین (*Chamaecostus cuspidatus* Nak)

هاجر معتمدی شارک^۱، عزیزاله خیری^{۱*}، محسن ثانی‌خانی^۱ و نیر محمدخانی^۲

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه گیاهان دارویی و معطر، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱)

چکیده

گیاه انسولین (*Chamaecostus cuspidatus* Nak) به علت داشتن طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی از جمله خواص ضددیابت، ضدسرطان و ضدالتهابی یک گیاه دارویی مهم است. این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BA بر جداکشت گره در دو آزمایش جداگانه بر ریزازدیادی گیاه می‌پردازد. غلظت‌های هورمونی در آزمایش اول شامل تیمارهای BA (صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر) با NAA (صفر، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) بود که نتایج آزمایش اول منجر به طراحی آزمایش دوم با غلظت‌های بهینه شد. آزمایش دوم شامل BA (صفر، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر) با NAA (صفر، ۱/۲، ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS بود. نتایج آزمایش اول نشان داد بیشترین درصد شاخه‌زایی، تعداد برگ، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی، درصد ریشه‌زایی، وزن تر ریشه، قطر ریشه و رنگیزه‌های فتوسنتزی مربوط به تیمار ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین مقدار مربوط به شاهد است. نتایج آزمایش دوم نشان داد که محیط کشت حاوی ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین تأثیر را بر رشد گیاهچه و رشد اندام هوایی دارد. بیشترین طول ریشه (۲۰/۳۳ سانتی‌متر) در محیط تحت تیمار با ۱/۲ NAA به همراه صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲/۴ میلی‌گرم NAA به همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. همچنین شاخص کلروفیل رابطه مستقیم با رشد اندام هوایی را نشان داد به طوری که با افزایش رشد گیاهچه (۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA) میزان کلروفیل‌ها نیز افزایش یافت. پژوهش حاضر نشان داد گیاه برای افزایش رشد اندام هوایی به مقدار کمی از هورمون BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) نیاز دارد. از سوی دیگر، افزایش مقدار NAA از ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر به ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری در رشد ریشه نداشت و در غلظت ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر گیاه کالوس‌زایی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده رشد گیاه، ریزازدیادی، کشت بافت گیاهی، گیاه دارویی، BA، NAA

مقدمه

کاستاسه (Costaceae) تعلق دارد. گیاه انسولین یک راهکار جادویی برای درمان دیابت شناخته شده است. برگ آن از طریق کاهش سطح قند خون، بهبود پارامترهای کلیوی و

گیاه دارویی انسولین با نام علمی *Chamaecostus cuspidatus*، معمولاً به نام زنجبیل ماریچ شناخته می‌شود و به خانواده

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: kheiry@znu.ac.ir

کبدی، افزایش سطح انسولین، بهبود وضعیت بافتی و آنتی اکسیدانی به بیماران دیابتی کمک می کند (Shinde et al., 2020). به همین دلیل به عنوان "گیاه انسولین" شناخته می شود. گونه های این تیره به طور گسترده در مناطق گرمسیری جهان پراکنش دارند. این گیاه در آمریکا جنوبی و مرکزی رشد می کند و به دلیل ارزش دارویی آن، در هند نیز محبوب شده است (Dacasin et al., 2023). اکنون به عنوان یک داروی مفید برای درمان دیابت به طور گسترده قبول و استفاده می شود. ویژگی های چندمنظوره این گیاه به دلیل ترکیبات فیتوشیمیایی فراوان در آن، از جمله کربوهیدرات ها، ترپنوئیدها، پروتئین ها، آلکالوئیدها، تانن ها و فلاونوئیدها گزارش شده است (Hegde et al., 2014). متابولیت های ثانویه مهم گیاه دارویی انسولین مانند اسید کروزولیک، دیوسژنین، کوئرستین، کاتچین، سیستوسترول و اسید اولئیک فعالیت ضد دیابتی را نشان می دهند (Shinde et al., 2020).

در سال های اخیر، فرایند کشت درون شیشه بافت و سلول گیاهی به عنوان یک ابزار قدرتمند برای ازدیاد گیاهان با مقیاس زیاد به وجود آمده است (Sulakshana and Sabitha Rani, 2016). به علت بهره برداری انبوه صنعت داروسازی و مسائلی چون از بین رفتن قابلیت جوانه زنی، میزان جوانه زنی پایین و سخت ریشه زایی، گیاه انسولین با خطر انقراض روبه رو است (Bakrudeen and Arun, 2009). استفاده از تکنیک کشت بافت امکان افزایش انبوه گیاهان در شرایط محیطی کنترل شده بدون هیچ محدودیت فصلی را فراهم می کند (Ochoa-Villarreal et al., 2016). در همین راستا، برخی پژوهشگران ریزازدیادی و مطالعه فیتوشیمیایی گیاه انسولین را در جنس و گونه هایی از این خانواده گیاهی با استفاده از غلظت های مختلف بنزیل آمینو پورین (BAP)، کینتین (KIN)، ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالین استیک اسید (NAA) بر جداکشت های مختلف مانند برگ، گره و ریزوم گزارش کرده اند (Punyarani and Sharma, 2012; Jariteh et al., 2020). هدف از انجام این پژوهش، ریزازدیادی گیاه دارویی انسولین در شرایط درون شیشه ای با توجه به بومی نبودن این

گیاه و عدم شناخت کافی درباره مشخصات زیست شناختی آن می باشد. مطالعه حاضر در دو آزمایش جداگانه به صورت فاکتوریل که هدف از انجام آزمایش اول تعیین بهترین غلظت هورمونی برای اندام زایی و آزمایش دوم با هدف اندام زایی و افزایش هر چه بیشتر ریشه (رشد ریشه بالا و قوی می تواند به عنوان مواد اولیه برای تکثیر درون شیشه این گیاه مورد استفاده قرار بگیرد) انجام گردید. تا بتوان به طور کارآمد با ازدیاد گیاه از خصوصیات درمانی و دارویی این گیاه در ایران بهره مند شد.

مواد و روش ها

تهیه جداکشت گیاهی: گیاه انسولین به شکل گلدانی از گلخانه محل پرورش این گیاه واقع در کرج تهیه و به آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان منتقل گردید. قطعه گره به عنوان جداکشت انتخاب شد. جهت ضدعفونی، ابتدا جداکشت ها با جریان آب شهری به مدت ۲۰ دقیقه شسته شدند. سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد ۳۰ ثانیه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر، نمونه ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱/۷ درصد ضدعفونی و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل زیر هود لامینار شسته شدند. بعد از ضدعفونی، جداکشت ها روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) تکمیل شده با تیمارهای آزمایش حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۴ گرم در لیتر آگار و اسیدیت ۵/۸ کشت شدند. محیط های کشت قبل از کشت جداکشت ها توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند.

تیمارهای آزمایش و شرایط رشد گیاه: این مطالعه در دو آزمایش جداگانه با غلظت های مختلف هورمون اکسین (NAA) و سایتوکینین (BA) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی بر روی جداکشت گره با سه تکرار و سه جداکشت در هر تکرار انجام شد. غلظت های هورمونی در آزمایش اول شامل تیمارهای BA (صفر، ۲، ۴ و ۶ میلی گرم در لیتر) با NAA (صفر، ۰/۳ و ۰/۶ میلی گرم در لیتر) بود که نتایج آزمایش اول منجر به طراحی آزمایش دوم با غلظت های بهینه

قطر ریشه و رنگیزه‌های فتوستتزی در سطح احتمال ۱ درصد داشتند (جدول ۱ و ۲).

مقایسه میانگین داده‌های آزمایش اول (جدول ۳) نشان داد که بیشترین تعداد شاخه (۲/۲۲) در تیمار ۰/۶ میلی‌گرم NAA با ۴ میلی‌گرم BA و تیمار ۰/۶ میلی‌گرم NAA به همراه ۶ میلی‌گرم BA (۲/۱۱) حاصل شد. بیشترین درصد شاخه‌زایی، تعداد برگ، وزن تر اندام هوایی، درصد ریشه‌زایی، وزن تر ریشه، قطر ریشه در بین تیمارهای مختلف مربوط به تیمار ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA با صفر BA و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود. بالاترین طول ریشه (۱۷ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۳ میلی‌گرم NAA حاصل شد که با افزایش غلظت BA به ۶ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هر دو غلظت ۰/۶ و ۰/۳ NAA طول ریشه کاهش یافته که این نشان می‌دهد مقادیر زیاد سایتوکینین نظیر BA بر میزان ریشه‌زایی و به دنبال آن بر طول ریشه اثر بازدارنده دارد. همچنین بیشترین قطر ساقه در تیمار ۰/۳ میلی‌گرم NAA همراه با ۶ میلی‌گرم BA مشاهده شد. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، ارتفاع اندام هوایی (۱۵ سانتی‌متر) در محیط کشت ترکیبی حاوی ۰/۶ میلی‌گرم NAA بدون BA بیشتر از سایر تیمارها بود.

ریزازدیادی را می‌توان یک روش مؤثر برای تکثیر جوانه‌های انتهایی یا جانبی و تکثیر غیرجنسی درون شیشه‌ای نیز نامید که یک روش تکثیر برای گونه‌ها یا واریته‌ای با ویژگی‌های مطلوب است (Faisal et al., 2018). در این راستا تنظیم‌کننده‌های رشد نقش مهمی ایفا می‌کنند از جمله عوامل دیگری که در ریزازدیادی تأثیرگذار هستند می‌توان به ژنوتیپ، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط محیطی اشاره کرد (Cesar et al., 2017). همچنین عکس‌العمل جداکشت به مقدار بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی و بیرونی بستگی دارد (Jun - jie et al., 2017). بررسی نتایج آزمایش اول بر صفات ریختی نشان داد جداکشت‌هایی که در محیط کشت ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفتند رشد اندام هوایی از جمله تعداد برگ، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه و قطر ریشه قابل توجهی نسبت به سایر تیمارها و شاهد

شد. آزمایش دوم شامل BA (صفر، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر) با NAA (صفر، ۱/۲، ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) بود. محیط‌های کشت حاوی تیمارهای آزمایش پس از استقرار جداکشت به اتاقک رشد با شرایط دمای ۲۵ درجه سلسیوس در روز و ۲۰ درجه سلسیوس در شب، با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: بعد از گذشت ۱۲ هفته از زمان کشت جداکشت گره، صفاتی از قبیل درصد شاخه‌زایی، درصد ریشه‌زایی، تعداد شاخه از هر جداکشت، تعداد برگ، قطر ساقه و قطر ریشه (با استفاده از کولیس)، ارتفاع اندام هوایی و طول ریشه (با استفاده از خط‌کش)، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه و رنگیزه‌های فتوستتزی از جمله کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید کل و کاروتنوئید کل اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوستتزی برگ: اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید کل به روش Lichtenthaler و Wellbum (۱۹۸۳) انجام شد. رنگیزه‌های بافت تر برگی با استون ۸۰ درصد استخراج و جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید کل طبق معادلات زیر محاسبه گردید:

$$a \text{ کلروفیل} = 12.25 A_{663} - 2.798 A_{646}$$

$$b \text{ کلروفیل} = 21.50 A_{646} - 5.1 A_{663}$$

$$\text{کلروفیل} = a + b \text{ کلروفیل}$$

$$\text{کاروتنوئید کل} = (1000 A_{470} - 1.82 \text{Chl } a - 85.02 \text{Chl } b) / 198$$

تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ صورت گرفت. مقایسه میانگین صفات به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش اول: بر اساس نتایج داده‌های حاصل از جدول تجزیه واریانس، هورمون NAA و BA اثر معنی‌داری بر روی صفات مورد بررسی از جمله درصد شاخه‌زایی، تعداد شاخه از هر جداکشت، تعداد برگ، ارتفاع اندام هوایی، طول ریشه، وزن تر اندام هوایی، درصد ریشه‌زایی، وزن تر ریشه، قطر ساقه،

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات ریختی جداکشت گره گیاه انسولین در آزمایش اول

میانگین مربعات											
منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد شاخه‌زایی	تعداد شاخه	تعداد برگ	ارتفاع اندام هوایی	وزن تر اندام هوایی	قطر ساقه	درصد ریشه‌زایی	طول ریشه	وزن تر ریشه	قطر ریشه
NAA	۲	۳۱۷۹/۰۱**	۱/۹۸۵**	۳۲/۱۹۴**	۱۲۹/۲۵۷**	۱۸/۴۶۹**	۸/۳۹۲**	۳۵۷۲/۵۳**	۲۴۰/۰۸۳**	۸/۲۳۹**	۱/۱۳۲**
BA	۳	۶۹۹/۵۹**	۲/۲۵۱**	۲۶/۳۹۸**	۵۶/۱۷۶**	۱۴/۴۰۸**	۵/۹۲۹**	۱۷۷۷/۲۶**	۱۳/۱۸۵**	۱/۵۴۹**	۰/۰۲۳**
NAA × BA	۶	۲۰۲۶/۷۵**	۰/۱۲۴**	۲۴/۴۵۴**	۳۳/۳۵۰**	۷/۹۴۴**	۲/۴۲۲**	۲۲۸۶/۵۲**	۷۵/۴۹۱**	۶/۰۷۳**	۰/۶۱۴**
خطا	۲۴	۹۲/۵۹	۰/۰۳۱	۰/۲۷۸	۰/۲۵۰	۰/۰۲۷	۰/۰۲۲	۱۵/۴۳۲	۰/۲۲۲	۰/۰۷۵	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات		۲۰/۷۸	۱۳/۰۲	۱۱/۶۵	۸/۶۱	۷/۹۸	۴/۹۲	۸/۷۵	۴/۲۸	۱۳/۶۸	۵/۲۳

*: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جداکشت گره گیاه انسولین در آزمایش اول

میانگین مربعات				درجه آزادی	منبع تغییرات
کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید کل		
۴۲۷/۸۸۴**	۱۸/۵۱۹**	۶۱۸/۵۹۷**	۱۱۴/۴۳۶**	۲	NAA
۳۳/۲۲۱**	۱۲/۶۶۸**	۱۳/۸۲۳**	۰/۹۴۰**	۳	BA
۱۴۰/۹۱۵**	۱۵/۷۶۷**	۲۳۴/۸۸۱**	۱۹/۷۲۰**	۶	NAA × BA
۱/۲۰۳	۰/۱۹۴	۰/۶۳۲	۰/۱۴۳	۲۴	خطا
۷/۱۴	۱۴/۲۴	۴/۳۱	۵/۰۸		ضریب تغییرات

*: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

(فاقد تنظیم‌کننده رشد) داشتند. در این پژوهش بالاترین تعداد شاخه در تیمار با غلظت‌های ۴ و ۶ میلی‌گرم BA به همراه ۰/۶ میلی‌گرم NAA به‌دست آمد که می‌تواند به نقش مؤثر سیتوکینین در القای شاخه‌زایی اشاره کند. طبق نتایج به‌دست آمده گیاه انسولین با مقادیر پایین از سایتوکینین بهترین عملکرد را از خود نشان می‌دهد که دلیل آن را به بالا بودن سایتوکینین داخلی و یا پایین بودن نسبی مقدار اکسین در جداکشت‌های گره می‌توان نسبت داد. آزمایش‌های مختلفی با غلظت‌های متعدد اکسین و سایتوکینین به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی انجام شده است. در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی رشد اندام هوایی مشاهده شده که غلظت بالای BA اثر مثبتی رو رشد شاخساره نداشت (Jena et al., 2020). همچنین در

مطالعه انجام‌شده بر روی ریزازدیادی یک گونه از جنس کاستوس، بیشترین رشد و تکثیر اندام هوایی (۴ سانتی‌متر) روی محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد و طول ساقه به‌تدریج با افزایش غلظت BA به ۱ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت (Philip Robinson et al., 2009). این مطالب با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در گزارش دیگری از اثر هورمون‌ها بر ریزازدیادی گیاه *Costus speciosus* بر روی جداکشت گره انجام شده که نشان می‌دهد غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین فراوانی باززایی گیاه را داشته است (Sulakshana and Sabitha Rani, 2016). در مطالعه حاضر نتایج مشابهی مشاهده شد، اثر ترکیبی غلظت‌های ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۶ میلی‌گرم

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد بر صفات ریختی جداکشت گره گیاه انسولین در آزمایش اول

تیمارها	درصد شاخه زایی	تعداد شاخه	تعداد برگ	ارتفاع اندام هوایی (سانتی متر)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	قطر ساقه (میلی متر)	درصد ریشه زایی	طول ریشه (سانتی متر)	وزن تر ریشه (گرم)	قطر ریشه (میلی متر)
NAA0 BA0	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*
NAA0 BA2	۳۳/۳۳ ^d	۱ ^F	۵/۳۳ ^{cd}	۴ ^{ef}	۱/۰۷ ^{fg}	۲/۶۴ ^e	۳۳/۳۳ ^c	۶/۳۳ ^e	۱/۱۹ ^{ef}	۰/۶۳ ^{ef}
NAA0 BA4	۳۳/۳۳ ^d	۱/۳۳ ^{cde}	۴ ^{efg}	۲/۳۳ ^g	۰/۹۹ ^{gh}	۲/۱۳ ^f	۳۳/۳۳ ^c	۶/۶۷ ^e	۰/۹۸ ^f	۰/۶۲ ^f
NAA0 BA6	۴۴/۴۴ ^{cd}	۱/۳۳ ^{cde}	۱/۳۳ ⁱ	۲/۳۳ ^g	۰/۷۱ ^h	۳/۵۰ ^b	۳۳/۳۳ ^c	۱۰/۶۷ ^d	۲/۰۵ ^d	۰/۹۵ ^d
NAA 0.3 BA0	۵۵/۵۵ ^{bc}	۱ ^f	۹/۳۳ ^b	۱۲/۶۶ ^b	۳/۹۷ ^b	۲/۹۰ ^d	۶۶/۶۶ ^b	۱۷ ^a	۲/۷۱ ^c	۰/۶۷ ^{ef}
NAA 0.3 BA2	۶۶/۶۶ ^b	۱/۲۲ ^{def}	۵/۶۷ ^c	۶/۵۰ ^{cd}	۲/۵۵ ^d	۲/۸۳ ^{de}	۶۶/۶۶ ^b	۱۳/۶۷ ^c	۲/۲۹ ^{cd}	۰/۹۵ ^d
NAA 0.3 BA4	۵۵/۵۵ ^{bc}	۱/۸۹ ^b	۳/۳۳ ^g	۴/۳۳ ^e	۱/۵۳ ^e	۳/۶۰ ^b	۶۶/۶۶ ^b	۱۶ ^b	۳/۵۷ ^b	۱/۲۱ ^b
NAA 0.3 BA6	۳۳/۳۳ ^d	۱/۵۶ ^c	۲/۳۳ ^h	۳/۳۳ ^f	۰/۹۰ ^{gh}	۵/۳۲ ^a	۱۶/۶۷ ^d	۴/۳۳ ^f	۰/۸۸ ^f	۰/۵۹ ^f
NAA 0.6 BA0	۱۰۰ ^a	۱/۱۱ ^{ef}	۱۰/۳۳ ^a	۱۵/۳۳ ^a	۷/۱۵ ^a	۳/۱۵ ^c	۱۰۰ ^a	۱۵/۶۷ ^b	۴/۸۳ ^a	۱/۷۳ ^a
NAA 0.6 BA2	۶۶/۶۶ ^b	۱/۴۴ ^{cd}	۴/۶۷ ^{de}	۶/۸۳ ^c	۳/۱۷ ^c	۳/۵۳ ^b	۶۶/۶۶ ^b	۱۵/۳۳ ^b	۲/۶۸ ^c	۱/۱۸ ^b
NAA 0.6 BA4	۳۳/۳۳ ^d	۲/۲۲ ^a	۳/۶۷ ^{fg}	۶/۳۳ ^{cd}	۱/۲۶ ^{ef}	۳/۳۶ ^{bc}	۲۷/۷۸ ^c	۱۳/۳۳ ^c	۱/۲۷ ^{ef}	۰/۷۱ ^e
NAA 0.6 BA6	۳۳/۳۳ ^d	۲/۱۱ ^{ab}	۴/۳۳ ^{ef}	۵/۶۶ ^d	۱ ^{fgh}	۳/۲۰ ^c	۲۷/۷۸ ^c	۱۳ ^c	۱/۵۸ ^e	۱/۰۳ ^c

حروف مشترک در هر ستون نمایان گر عدم تفاوت معنی داری است.

T*: داده قابل اندازه گیری مشاهده نشد.

در لیتر NAA باعث افزایش تعداد شاخه در هر جداکشت را نشان داد اما بیشترین درصد شاخه زایی، رشد اندام هوایی و تعداد برگ در عدم کاربرد BA حاصل شد. طبق نتایج به دست آمده این گیاه برای رشد گیاهیچه به مقدار پایین تری از BA نیاز دارد و افزایش غلظت اثر منفی در رشد اندام هوایی داشت. بنزلی آدنین (BA) به عنوان یک عامل مؤثر در تکثیر اندام هوایی سایر گونه ها با غلظت کم نقش مثبت و قابل توجهی داشته است (Mohanty et al., 2011; Abdelmageed et al., 2011). نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد، تیمار هورمونی ۰/۳ میلی گرم NAA به تنهایی (صفر BA) بلندترین طول ریشه رخ داده است. طبق نتایج به دست آمده، هورمون NAA با غلظت ۰/۳ میلی گرم در لیتر با صفر BA باعث رشد طولی در ریشه شد (۱۷ سانتی متر) و افزایش غلظت NAA از ۰/۳ میلی گرم در لیتر به غلظت ۰/۶ میلی گرم در لیتر افزایش درصد ریشه زایی، قطر و وزن تر ریشه را نشان داد (جدول ۳). طبق مطالعه انجام شده توسط Sari و همکاران (۲۰۱۵)، غلظت بالاتر اکسین نسبت به سایتوکینین باعث تحریک رشد ریشه

می شود. هورمون اکسین به راحتی سبب تحریک سلول های دایره ی محیطی در بخش های بالایی تارهای کشنده شده و این تحریک باعث تقسیم سلول های این منطقه و در نهایت منجر به تشکیل ریشه می شود (Faisal et al., 2018).

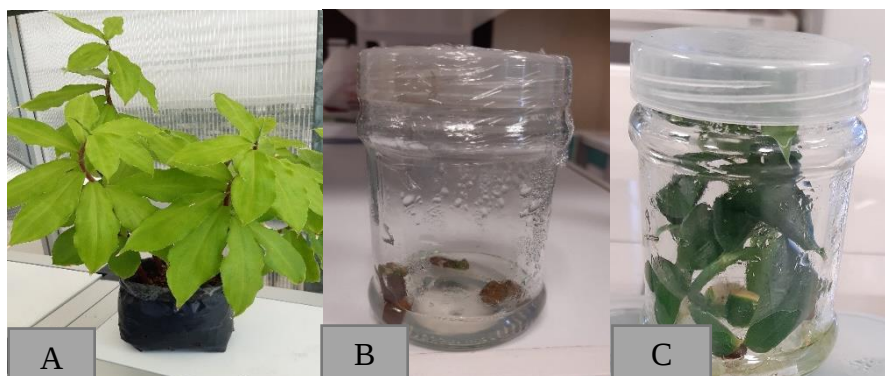
مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده های رشد NAA و BA آزمایش اول بر رنگیزه های فتوسنتزی در جدول ۴ آورده شده است. همانطور که در جدول ۴ ملاحظه می شود، بیشترین میزان رنگیزه های فتوسنتزی از جمله کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید کل مربوط به محیط کشت حاوی ۰/۶ میلی گرم بر لیتر NAA است (شکل ۱- C). بیشترین میزان کلروفیل a به ترتیب در تیمار ۰/۶ NAA، ۰/۶ NAA با ۲ میلی گرم BA و ۰/۶ NAA با ۴ میلی گرم BA مشاهده شد و افزایش غلظت BA از ۴ میلی گرم به ۶ میلی گرم کاهش در مقدار کلروفیل a را نشان داد. نتایج اثر BA و NAA بر روی کاروتنوئید کل نشان می دهد هورمون NAA بیشترین اثر را داشته و کمترین مقدار مربوط به تیمارهای بدون NAA بعد از شاهد است. به طور کلی، گیاهان تولید شده در محیط کشت حاوی ۰/۶ میلی گرم NAA

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جداگشت گره گیاه انسولین در آزمایش اول

تیماها	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید کل
(میلی گرم بر گرم وزن تر)				
T*	T*	T*	T*	T*
NAA0 BA0	۱۲/۳۰ ^f	۲/۰۴ ^d	۱۴/۳۳ ^e	۵/۱۴ ^e
NAA0 BA2	۱۲/۱۹ ^f	۲/۴۵ ^d	۱۴/۶۴ ^e	۵/۳۹ ^e
NAA0 BA4	۱۱/۱۴ ^f	۲/۱۷ ^d	۱۳/۳۱ ^e	۴/۹۹ ^e
NAA0 BA6	۱۲/۰۴ ^f	۴/۵۳ ^b	۱۶/۵۷ ^d	۹/۵۳ ^b
NAA 0.3 BA0	۱۸/۵۲ ^d	۲/۰۹ ^d	۲۰/۶۱ ^c	۷/۶۸ ^c
NAA 0.3 BA2	۱۵/۱۲ ^e	۴/۳۰ ^b	۱۹/۴۳ ^c	۹/۰۶ ^b
NAA 0.3 BA4	۱۹/۹۴ ^{cd}	۳/۸۹ ^{bc}	۲۳/۸۳ ^b	۹/۴۹ ^b
NAA 0.3 BA6	۲۸/۹۳ ^a	۸/۸۷ ^a	۳۷/۸۷ ^a	۱۲/۶۶ ^a
NAA 0.6 BA0	۲۲/۳۹ ^b	۰/۷۱ ^e	۲۳/۱۰ ^b	۹/۵۲ ^b
NAA 0.6 BA2	۲۰/۸۱ ^{bc}	۳/۴۷ ^c	۲۴/۲۹ ^b	۹/۰۸ ^b
NAA 0.6 BA4	۱۰/۷۰ ^f	۲/۵۹ ^d	۱۳/۲۹ ^e	۶/۷۰ ^d
NAA 0.6 BA6				

حروف مشترک در هر ستون نمایانگر عدم تفاوت معنی‌داری است.

T*: داده قابل اندازه‌گیری مشاهده نشد.



شکل ۲- A: گیاه انسولین، B: شاهد (عدم استفاده از تنظیم‌کننده رشد)، C: جداگشت‌های رشد کرده در تیمار صفر BA و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA آزمایش اول

(Dobrzenski and Drienyovszki, 2014). Nofal و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که بیشترین مقدار کلروفیل کل در تیمار با کایتین (Kin) ثبت شده، درحالی‌که کمترین مقدار مربوط به بنزیل آدنین (BA) بود.

نتایج آزمایش دوم: بر اساس نتایج داده‌های حاصل از

نسبت به سایر تیمارها سبزتر و قوی‌تر بودند و رشد بیشتری داشتند. در بررسی اثر سطوح مختلف سائوکینین بر تغییر دستگاه فتوسنتزی و محتوای رنگدانه برگ‌های سیب در شرایط درون شیشه‌ای، نتایج پژوهش نشان داد نوع و غلظت هورمون در مقدار کلروفیل a و b و نسبت آن‌ها تأثیر می‌گذارد

جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات ریختی جداکشت گره گیاه انسولین در آزمایش دوم

میانگین مربعات											منبع تغییرات	درجه آزادی
قطر ریشه	وزن تر ریشه	طول ریشه	درصد ریشه‌زایی	قطر ساقه	وزن تر اندام هوایی	ارتفاع اندام هوایی	تعداد برگ	تعداد شاخه	درصد شاخه‌زایی			
۱/۳۵۴**	۶/۷۹۶**	۴۰/۴۴۴**	۴۹۷۹/۴۲**	۶/۶۲۳**	۷/۵۸۱**	۲۰۳/۲۵۹**	۷۸/۰۳۷**	۰/۲۳۵**	۲۸۰/۶۴**	۲	NAA	۲
۰/۱۷۱**	۳/۳۸۲**	۴۸/۱۱۱**	۱۱۵۲/۲۶**	۲/۷۹۷**	۷/۸۶۴**	۸۰/۱۴۸**	۸/۰۳۷**	۱/۷۷۸**	۲۲۵۳/۰۸**	۲	BA	۲
۰/۶۳۴**	۰/۳۳۹**	۴۶/۲۲۲**	۴۲۶/۹۵**	۴/۰۹۴**	۱/۸۹۳**	۲۷/۵۹۳**	۲۲/۷۰۴**	۰/۷۹۰**	۹۸۷/۶۵**	۴	NAA × BA	۴
۰/۰۰۳	۰/۰۰۸	۰/۳۳۳	۵۱/۴۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۳۳۳	۰/۲۵۹	۰/۰۰۸	۶۱/۷۳	۱۸	خطا	۱۸
۵/۵۲	۵/۷۷	۳/۷۶	۱۳/۰۵	۳/۷۵	۵/۸۷	۶/۲۳	۹/۶۱	۸/۰۵	۱۳/۶۸		ضریب تغییرات	

*: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جداکشت گره گیاه انسولین در آزمایش دوم

میانگین مربعات				درجه آزادی	منبع تغییرات
کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	کاروتنوئید کل		
۱۴/۶۴۶**	۴۸۲/۲۴۹**	۷۰/۰۴۶**	۱۸۵/۱۳۱**	۲	NAA
۱۰/۲۰**	۱۰۸/۸۳۱**	۱۴/۳۸۳**	۶۶/۴۴۳**	۲	BA
۱۴/۹۳۷**	۲۴۲/۲۵۹**	۲۲/۳۷۷**	۱۲۱/۴۸۱**	۴	NAA × BA
۰/۰۱۶	۰/۰۶۵	۰/۰۱۸	۰/۰۶۸	۱۸	خطا
۲/۳۱	۱/۱۳	۲/۰۷	۱/۶۱		ضریب تغییرات

*: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول تجزیه واریانس، اثر ساده و اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BA بر صفات ارزیابی‌شده از جمله صفات ریختی و رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۵ و ۶).

نتایج مقایسه میانگین آزمایش دوم بر صفات ریختی (جدول ۷) نشان داد که بیشترین تعداد شاخه (۱/۸۹) در تیمار ۱/۲ میلی‌گرم NAA با ۱ میلی‌گرم BA حاصل شد که اختلاف معنی‌داری با عدم کاربرد NAA با ۱ میلی‌گرم BA (۱/۷۸) ندارد. همچنین بیشترین درصد شاخه‌زایی (۷۷ درصد) و ریشه‌زایی (۷۷ درصد) در تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۱/۲ میلی‌گرم NAA حاصل شد. جداکشت‌های قرارگرفته در محیط‌های حاوی ۲/۴ میلی‌گرم NAA به همراه ۱ میلی‌گرم BA دارای بالاترین تعداد برگ، وزن تر اندام هوایی و

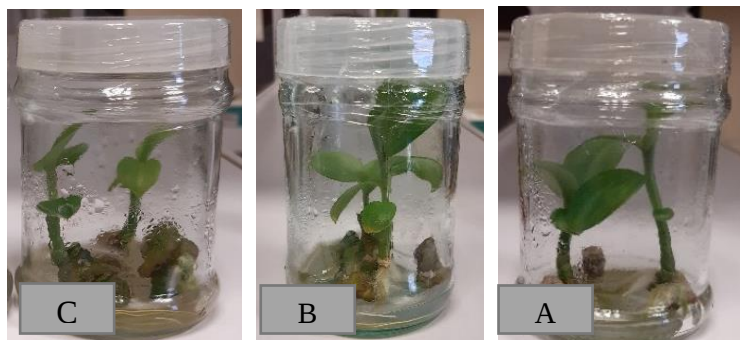
قطر ساقه است (شکل ۲- B). همانطور که در شکل (۲- C) مشاهده می‌شود، افزایش غلظت NAA به ۲/۴ میلی‌گرم به همراه ۲ میلی‌گرم BA باعث کالوس‌زایی در جداکشت شده است. همچنین، بیشترین وزن تر ریشه و قطر ریشه در تیمار ۱/۲ میلی‌گرم NAA با ۱ میلی‌گرم BA مشاهده می‌شود. طبق نتایج مقایسه میانگین، بالاترین طول ریشه (۲۰/۳۳ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۱/۲ میلی‌گرم NAA است که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۱/۲ میلی‌گرم NAA به همراه ۱ میلی‌گرم BA، ۲/۴ میلی‌گرم NAA با همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم BA ندارد. همانطور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، بیشترین ارتفاع اندام هوایی (۱۸ سانتی‌متر) در محیط‌کشت حاوی ۲/۴ میلی‌گرم NAA به همراه ۱ میلی‌گرم BA و بعد در تیمار ۱/۲ میلی‌گرم NAA به همراه ۱ میلی‌گرم BA حاصل شده است.

جدول ۷- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات ریختی جداکشت گره گیاه انسولین در آزمایش دوم

تیماها	درصد شاخه‌زایی	تعداد شاخه	تعداد برگ	ارتفاع اندام هوایی (سانتی‌متر)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	قطر ساقه (میلی‌متر)	درصد ریشه‌زایی	طول ریشه (سانتی‌متر)	وزن تر ریشه (گرم)	قطر ریشه (میلی‌متر)
T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*	T*
NAA0 BA0	۷۲/۲۲ ^{ab}	۱/۷۸ ^a	۲/۶۷ ^e	۶ ^e	۲/۱۲ ^c	۳/۰۲ ^e	۴۴/۴۴ ^c	۱۰/۳۳ ^d	۱/۵۹ ^f	۱/۰۷ ^c
NAA0 BA1	۳۸/۳۳ ^c	۱/۳۳ ^b	۳/۳۳ ^e	۵/۳۳ ^e	۰/۹۸ ^e	۳/۵۰ ^{cd}	۳۸/۸۸ ^c	۱۲/۳۳ ^c	۱/۵۵ ^f	۰/۷۶ ^e
NAA0 BA2	۶۱/۱۱ ^b	۱ ^c	۸/۶۷ ^b	۱۲/۶۶ ^c	۲/۴۷ ^b	۳/۷۲ ^{ab}	۶۱/۱۱ ^b	۲۰/۳۳ ^a	۲/۱۳ ^d	۱/۵۴ ^a
NAA1.2 BA0	۷۷/۷۷ ^a	۱/۸۹ ^a	۵/۳۳ ^c	۱۳/۶۶ ^b	۲/۵۵ ^b	۳/۳۲ ^d	۷۷/۷۷ ^a	۱۹/۶۶ ^a	۳/۱۵ ^a	۱/۶۳ ^a
NAA1.2 BA1	۶۶/۶۶ ^{ab}	۱ ^c	۴/۶۷ ^{cd}	۹ ^d	۱/۴۹ ^d	۳/۴۶ ^{cd}	۶۶/۶۶ ^{ab}	۱۸ ^b	۲/۴۱ ^c	۰/۹۹ ^{cd}
NAA1.2 BA2	۶۶/۶۶ ^{ab}	۱ ^c	۴/۳۳ ^d	۸/۶۶ ^d	۱/۶۰ ^d	۳/۸۱ ^{ab}	۶۶/۶۶ ^{ab}	۱۷/۶۶ ^b	۱/۹۶ ^e	۱/۲۵ ^b
NAA2.4 BA0	۷۲/۲۲ ^{ab}	۱ ^c	۱۰/۶۷ ^a	۱۸/۳۳ ^a	۴/۵۸ ^a	۳/۹۰ ^a	۷۲/۲۲ ^{ab}	۱۹/۶۶ ^a	۲/۸۹ ^b	۰/۷۶ ^e
NAA2.4 BA1	۶۱/۱۱ ^b	۱ ^c	۸ ^b	۹/۶۶ ^d	۲/۳۶ ^b	۳/۶۲ ^b	۶۶/۶۶ ^{ab}	۲۰ ^a	۲/۷۶ ^b	۰/۹۴ ^d
NAA2.4 BA2										

حروف مشترک در هر ستون نمایان‌گر عدم تفاوت معنی‌داری است.

T*: داده قابل اندازه‌گیری مشاهده نشد.



شکل ۲- A: محیط‌کشت حاوی صفر BA و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، B: محیط‌کشت ۱ BA و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، C: محیط‌کشت ۲ BA و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA آزمایش دوم

نشان می‌دهد با افزایش غلظت هورمون NAA از مقدار ۱/۲ به ۲/۴ میلی‌گرم رشد ریشه به همان نسبت افزایش نیافته و رشد ریشه ثابت مانده است. جداکشت‌های تحت تأثیر غلظت بالای اکسین و سایتوکینین کالوس‌زایی را نشان دادند. همچنین نتایج شاخه‌زایی نشان می‌دهد غلظت پایین سایتوکینین اثر معنی‌داری داشته و بیشترین درصد شاخه‌زایی و تعداد شاخه در تیمار ۱ میلی‌گرم BA حاصل شد که تأکیدی بر نقش مؤثر اکسین و

مقایسه میانگین نتایج به‌دست آمده در آزمایش دوم نشان داد NAA با غلظت ۲/۴ میلی‌گرم در ترکیب با ۱ میلی‌گرم BA بیشترین تأثیر را در رشد اندام هوایی از جمله تعداد برگ، ارتفاع، وزن تر و قطر ساقه داشته و بالاترین میزان وزن تر ریشه، قطر ریشه و طول ریشه در محیط‌کشت ۱/۲ میلی‌گرم NAA به همراه ۱ میلی‌گرم BA مشاهده شد که طول ریشه اختلاف معنی‌داری با غلظت ۲/۴ میلی‌گرم NAA ندارد که

جدول ۸- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر رنگیزه‌های فتوسنتزی جداگشت گره گیاه انسولین در آزمایش دوم

تیماها	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید کل
	(میلی گرم بر گرم وزن تر)			
NAA0 BA0	T*	T*	T*	T*
NAA0 BA1	۱۴/۳۶ ^d	۴/۳۹ ^f	۱۸/۷۵ ^g	۶/۳۶ ^b
NAA0 BA2	۱۸/۵۹ ^c	۵/۶۸ ^e	۲۴/۲۷ ^f	۵/۶۵ ^c
NAA1.2 BA0	۱۹/۹۸ ^a	۹/۰۷ ^b	۲۹/۰۵ ^b	۶/۶۰ ^a
NAA1.2 BA1	۱۹/۲۱ ^b	۸/۹۲ ^b	۲۸/۱۴ ^c	۶/۸۱ ^a
NAA1.2 BA2	۱۴/۷۴ ^d	۴/۱۳ ^g	۱۸/۸۷ ^g	۵/۰۲ ^d
NAA2.4 BA0	۱۹/۰۶ ^b	۸/۶۱ ^c	۲۷/۶۶ ^d	۶/۲۵ ^b
NAA2.4 BA1	۱۹/۹۹ ^a	۱۰/۴۹ ^a	۳۰/۴۸ ^a	۵/۸۰ ^c
NAA2.4 BA2	۱۹/۳۹ ^b	۷/۰۷ ^d	۲۶/۴۶ ^e	۶/۷۹ ^a

حروف مشترک در هر ستون نمایانگر عدم تفاوت معنی‌داری است.

T*: داده قابل اندازه‌گیری مشاهده نشد.

سایتوکینین در تحریک تقسیم سلولی دارد و در القای شاخه‌زایی مستقیم و غیرمستقیم بسیار مؤثر است (Jafari, 2009). (Najaf-Abadi and Hamidoghli, 2009).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BA بر رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد (جدول ۸) که بیشترین میزان کلروفیل a, b و کل در محیط‌کشت حاوی ۲/۴ میلی گرم NAA و ۱ میلی گرم BA به‌دست آمده است. همچنین در رابطه با کاروتنوئید کل، بالاترین مقدار در تیمار ۱/۲ میلی گرم NAA به همراه ۱ میلی گرم BA است که اختلاف معنی‌داری به‌ترتیب با تیمارهای حاوی ۱/۲ میلی گرم NAA بدون BA و ۲/۴ میلی گرم NAA با ۲ میلی گرم BA نداشت. بررسی داده‌ها نشان می‌دهد رشد بالاتر و سبزیگی اندام هوایی با شاخص کلروفیل رابطه مستقیم داشته و با افزایش رشد میزان کلروفیل‌ها نیز افزایش می‌یابد. سایتوکینین باعث تقسیم سلولی، حفظ پروتئین‌ها و کلروفیل می‌شود که استفاده از غلظت مناسب می‌تواند تأثیر بهتر و بیشتری بر رشد گیاه داشته باشد، در نتیجه کاربرد بهینه تنظیم‌کننده رشد BA می‌تواند گیاهچه با کیفیت بالا به‌دست آورد. باززایی و رشد گیاه به‌طور معمول تحت تأثیر میزان اکسین و سایتوکینین قرار

می‌گیرد. مطالعات انجام‌شده توسط Siddiqui و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد محیط‌کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم BA همراه با ۰/۱ میلی گرم NAA بهترین تیمار برای القای شاخه از جداگشت گره است. به‌طور کلی اکسین مسئول حمل کربوهیدرات‌ها و سایر مواد مغذی به سمت ریشه‌ها است و این فعالیت باعث تحریک تقسیم و طول‌شدن سلول‌ها و به دنبال آن تولید و تحریک تراکم ریشه‌زایی می‌گردد (Zhang et al., 2010). برای افزایش تکثیر و پرآوری مناسب استفاده از BA با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر به همراه ۲/۴ میلی گرم NAA توانست محیط‌کشت مناسبی برای تکثیر جداگشت گره باشد که این می‌تواند به دلیل تقسیم سلولی مناسب در این ترکیب هورمونی باشد که سبب جذب آب، مواد کربوهیدراتی و معدنی به مقدار لازم شده است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش سعی بر این بود بهترین محیط‌کشت با غلظت‌های مختلف اکسین (NAA) و سایتوکینین (BA) به‌صورت فاکتوریل برای تکثیر گیاه انسولین در ایران تحت شرایط درون شیشه معرفی شود. طبق نتایج به‌دست آمده،

لیتر تغییر نکرد و گیاه وارد مرحله کالوس‌زایی گردید. افزایش رشد ریشه در گیاه انسولین بسیار اهمیت دارد چرا که می‌تواند به‌طور مؤثری برای ریزازدیادی درون شیشه مورد استفاده قرار گیرد و منجر به رشد اندام هوایی گردد. اعمال غلظت‌های پایین‌تر سایتوکینین بر جداکشت گره و اعمال هورمون‌های اکسین بیشتر بر روی ریشه‌زایی جهت تکثیر درون شیشه این گیاه توصیه می‌گردد.

تیمارهای ترکیبی ۲/۴ میلی گرم NAA به همراه ۱ میلی گرم BA (آزمایش دوم)، سپس ۰/۶ میلی گرم NAA به‌تنهایی (آزمایش اول) بیشترین اثر را در درصد شاخه‌زایی، القای رشد اندام هوایی و درصد ریشه‌زایی این گیاه داشت. نتایج تحقیق نشان داد این گیاه به مقدار کمتری از هورمون سایتوکینین (BA) نیاز دارد و غلظت‌های اعمال‌شده در آزمایش اول اثر مثبتی بر رشد گیاهچه نداشت و رشد اندام هوایی کاهش یافت. همچنین رشد ریشه با افزایش غلظت NAA به سطح ۲/۴ میلی گرم در

منابع

- Abdelmageed, A. H. A., Faridah, Q. Z., Norhana, F. M. A., Julia, A. A., & Kadir, M. A. (2011). Micropropagation of *Eltingera elatior* by using axillary bud explants. *Journal of Medical Plants Research*, 5, 4465-4469.
- Bakrudeen, A. A. A. & Arun, K. R. (2009). In vitro propagation of monocot (*Costus pictus* D. don)-an antidiabetic medicinal plant. *Journal of Agricultural Technology*, 5, 361-369.
- Cesar, P., Silverio Garcia, L., & Janet, A. (2017). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products*, 105(1), 225-230. doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.014
- Dacasin, B., Liquido, H., Maglaqui, B., Origenes, M., Santiago, A., & Devanadera, B. (2023). Evaluation of ipil-ipil (*Leucaena leucocephala*) seed gum as co-encapsulating agent for targeted and controlled delivery of powdered insulin plant (*Chamaecostus cuspidatus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(4), e6149. doi: <https://doi.org/10.55251/jmbfs.6149>
- Dobranszki, J. & Drienyovszki, N. M. (2014). Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(16), 1472-1478. doi: 10.1016/j.jplph.2014.06.015
- Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A., & Gahtan, A. (2018). Auxin -cytokinin synergism in vitro for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 273-277. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.09.009
- Hegde, P. K., Rao, H. A., & Rao, P. N. (2014). A review on Insulin plant (*Costus igneus* Nak). *Pharmacognosy Review*, 8(15), 67-72. doi: 10.4103/0973-7847.125536
- Jafari Najaf-Abadi, A. & Hamidoghli, Y. (2009). Micropropagation of thronless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Australian Journal of Crop Science*, 3(4), 191-194.
- Jariteh, M., Vatankhah, E., Hosseini, A., & Vafadar, M. (2020). The optimization of tissue culture and phytochemical study of insulin plant (*Costus pictus* D. Don). *Iranian Journal of Plant Biology*, 12(1), 23-36. doi:10.22108/IJPB.2020.119122.1173
- Jena, S., Ray, A., Sahoo, A., Sahoo, S., Dash, B., Kar, B., & Nayak, S. (2020). Rapid plant regeneration in industrially important *Curcuma zedoaria* revealing genetic and biochemical fidelity of the regenerants. *3 Biotech*, 10, 17. doi: 10.1007/s13205-019-2009-9
- Jun -jie, Z., Yue -sheng, Y., Meng -fei, I., Shuqi, L., Yi, T., & Hanbin, C. (2017). An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera*). *Industrial Crops and Products*, 103, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.028>
- Lichtenthaler, H. K. & Wellbum, A. R. (1983). Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemistry Society Transcends*, 11, 591-592. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0110591>
- Mohanty, S., Panda, M. K., Sahoo, S., & Nayak, S. (2011). Micropropagation of *Zingiber rubens* and assessment of genetic stability through RAPD and ISSR markers. *Biologia Plantarum*, 55(1), 16-20. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0002-1>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nofal, E. M. S., Sayed, S. S., & Hassan, H. H. M. (2022). Protocol for in vitro mass production of *Nephrolepis exaltata* Schott. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(4), 3021-3032. doi:10.15666/aeer/2004_30213032
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M. O., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. (2016). Plant cell culture strategies for the production of natural products. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 49(3), 149-158. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.264
- Philip Robinson, J., John Britto, S., & Balakrishnsn, V. (2009). Micropropagation of *Costus speciosus* (Koem.ex.retz) Sm., an antidiabetic plant by using explants of pseudostems. *Botany Research International*, 2(3), 182-185.

- Punyarani, K. & Sharma, J. G. (2012). Micropropagation and microrhizome induction in *Costus pictus* D. Don using in vitro and ex vitro nodal segments as explant. *Notulae Scientia Biologicae*, 4, 72-78. doi: <https://doi.org/10.15835/nsb427303>
- Sari, D. I., Suwirmen, S., & Nasir, N. (2015). Pengaruh konsentrasi thidiazuron (TDZ) dan arang aktif pada sub kultur tunas pisang kepok hijau (*Musa paradisiaca* L.). *Journal of Science and Technology*, 4(3), 280-289. <https://doi.org/10.22487/25411969.2015.v4.i3.5133>
- Shinde, S., Surwade, S., & Sharma, R. (2020). *Costus ignus*: Insulin plant and it's preparations as remedial approach for diabetes mellitus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 13(4), 1551-58. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.13(4).1551-58
- Siddiqui, S., Thomas, T., & Khan, Sh. (2019). Standardization of an efficient protocol for in vitro micropropagation of *Centella asiatica* L. an important medicinal plant. *Pharmaceutical and Bioscience Journal*, 7(4), 22-26. <https://doi.org/10.20510/ukjpb/7/i4/185561>
- Sulakshana, G. & Sabitha Rani, A. (2016). Standardization of micropropagation from nodal segments of *Costus pictus* an anti-diabetic plant. *International Journal of Current Research*, 8(8), 36680-36684.
- Zhang, L., Jiarong, L., Hogan, S., Chung, H., Gregorg, E., & Zhou, W. K. (2010). Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 11(9), 592-599. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.063

The effect of different concentrations of auxin and cytokinin on the *in-vitro* propagation of Insulin plant (*Chamaecostus cuspidatus* Nak)

Hajar Motamedi Sharak¹, Azizollah Kheiry^{1*}, Mohsen Sanikhani¹, Nayer Mohammadkhani²

¹ Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

² Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2024/04/30, Accepted: 2024/07/22)

Abstract

The anti-diabetic medicinal plant of *Chamaecostus cuspidatus* Nak is an important medicinal plant due to having an extensive range of bioactivities, including anti-diabetes, anti-cancer and anti-inflammatory. This research investigates the effects of different concentrations of growth regulators, namely NAA and BA, on nodal explants in two separate experiments on plant micropropagation. This experiment was conducted using a factorial in a completely randomized design (CRD). The Hormonal concentrations in the first experiment include treatments of BA (0, 2, 4 and 6 mg/L⁻¹) with NAA (0, 0.3 and 0.6 mg/L). The results of the first experiment led to the design of the second experiment with optimal concentrations. The second experiment included BA (0, 1, 2 mg/L⁻¹) with NAA (0, 1.2, 2.4 mg/L⁻¹) in MS culture medium. The results of the first experiment showed that the highest Percentage of shoot induction, number of leaves, plant height, shoot fresh weight, Percentage of root induction, root fresh weight, root diameter and photosynthetic pigments among different treatments related to zero BA treatment with 0.6 mg/L NAA and The lowest value corresponds to the control. The results of the second experiment showed that the culture medium containing 2.4 mg/L of NAA along with 1 mg/L of BA had the greatest effect on seedling growth and shoot growth. The highest root length (20.33 cm) was obtained in the medium under treatment with 1.2 mg/L of NAA with zero and 1 mg/L BA and 2.4 mg/L of NAA with 1 and 2 mg/L BA. Additionally, the index of chlorophylls showed a direct relationship with the growth of aerial organs and proper propagation, so that the amount of chlorophylls increased with the growth of the plant (1 mg/L BA with 2.4 mg/L NAA). The present study demonstrated that the plant requires a small amount of the hormone BA (1 mg/L) for enhanced shoot growth. On the other hand, increasing the amount of NAA from 1.2 mg/L to 2.4 mg/L did not show a significant difference in root growth, and at a concentration of 2.4 mg/L, the plant exhibited callus formation.

Keywords: BA, Medicinal plant, Micropropagation, NAA, Plant growth regulator, Plant tissue culture

Corresponding author, Email: kheiry@znu.ac.ir