فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

The effect of different concentrations of cytokinin and auxin on in vitro culture of *Physalis alkekengi* (L.) using leaf and stem explants

Mona Kashanchi[1], Elaheh Pourfakhraie[2*], Mitra Parsa[3], Amineh Zeinali[4]

[1] Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Sciences (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Email: mona.kashanchi@yahoo.com
[2] Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Sciences (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Email: pourfakhraei@gmail.com
[3] Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Sciences (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Email: mitraprs@gmail.com
[4] Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Sciences (ACECR), Shahid Beheshti University, Tehran, Iran, Email: amineh_zeinali@yahoo.com

Article type:
Research article

Article history
Received: 12.02.2022
Revised: 01.04.2022
Accepted: 15.04.2022
Published:22.02.2023

Keywords
Physalis alkekengi
In vitro culture
Seed
Callus
Regeneration
BAPt

Abstract

Physalis alkekengi is a fruit-bearing plant in Iran. It is very popular due to the nutritional and medicinal properties. The main limitations of its cultivation are short reproductive cycle, fruits susceptibility to pests and limited information about crop management. The use of different micropropagation methods to produce physalis is proposed as practical solution. This study was conducted to evaluate the effect of culture medium and different concentrations of growth regulators on the seeds germination and organogenesis of P. *alkekengi* by using tissue culture technique as well as providing a suitable protocol for in vitro micropropagation of this plant. Seeds were cultured in 1/2 MS and distilled water with three different stabilizers including Plant Agar, Sand and Filter Paper. Direct regeneration (stem) and indirect regeneration (callusing from stem and leaf explants) were used for regeneration of the physalis. Explants were cultured in different hormone combinations of 6-Benzylaminopurine (BAP in 2 and 3 mg/L) and 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (2 mg/L). The best seed germination medium was 1/2 MS contains plant agar as stabilizer (95%). The best explant for callusing was leaf and the best medium was ½ MS containing 2, 4-D (2 mg/ L). The best regeneration medium was BAP (3 mg / L) + GA3 (0.5 mg / L) on MS 1/2. The best hormone for direct organogenesis of stem was BAP at different concentrations. The best medium for micropropagation was ½ MS containing BAP (3 mg / L) + GA3 (0.5 mg / L) (more than 25 seedlings per explant). Rooting was performed using IBA (150 mg / L) followed by transferring seedlings to ½ MS after one week. Finally, seedlings were easily transferred to the soil and more than 95% of them survived in the greenhouse. These results suggest a protocol for commercial micropropagation of physalis plants.

Cite this article as: Kashanchi, M., Pourfakhraie, E., Parsa, M., Zeinali, A. (2022). The effect of different concentrations of cytokinin and auxin on in vitro culture of *Physalis alkekengi* (L.) using leaf and stem explants. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 68(4): 109-122.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Doi: 10.30495/iper.2022.1952442.1772
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.10.9

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۷۶۷۱-۲۴۲۳
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

بررسی اثر غلظت‌های مختلف سایتوکینین و اکسین بر کشت درون‌شیشه‌ای عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi* L.) با استفاده از جداکشت‌های برگی و ساقه

منا کاشانچی[۱]، الهه پورفخرایی[۲*]، میترا پارسا[۳]، امینه زینالی[٤]

[۱]گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: mona.kashanchi@yahoo.com
[۲]گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: pourfakhraei@gmail.com
[۳]گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: mitraprs@gmail.com
[٤]گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، رایانامه: amineh_zeinali@yahoo.com

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱۱/۲۳
تاریخ بازنگری: ۱٤۰۱/۰۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۱/۲٦
تاریخ چاپ: ۱٤۰۱/۱۲/۰۳

واژه‌های کلیدی:
باززایی
بذر
کالوس
کشت درون شیشه
٦- بنزیل‌آمینوپورین
Physalis alkekengi

چکیده

عروسک پشت پرده (Physalis alkekengi) یک گیاه میوه‌دار است که به‌دلیل خواص غذایی و دارویی مورد توجه بسیار قرار گرفته است. چرخه زایشی کوتاه و حساسیت میوه‌ها به آفات از محدودیت‌های اصلی کشت این گیاه است. استفاده از روش‌های ریزازدیادی برای تولید عروسک پشت پرده به عنوان راهکاری کاربردی مطرح است. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف روی جوانه‌زنی بذر و رشد دانه عروسک پشت پرده با استفاده از روش کشت بافت و نیز ارائه پروتکل مناسب برای ریزازدیادی این گیاه انجام شد. برای بررسی بیشترین درصدجوانه‌زنی، بذرها در دو نوع محیط کشت (موراشیگ و اسکوگ تغییر یافته و آب مقطر) و سه بستر نگهدارنده مختلف (آگار گیاهی، ماسه و کاغذ فیلتر) کشت داده شدند. برای اندام‌زایی گیاه عروسک پشت پرده از دو روش باززایی مستقیم (جداکشت ساقه) و باززایی غیرمستقیم (کالوس‌های تولید شده از جداکشت‌های ساقه و برگ) استفاده شد. جداکشت‌ها در ترکیبات مختلف هورمونی 6-Benzylaminopurine (BAP) و 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) کشت شدند. بهترین محیط کشت برای جوانه زنی بذر، محیط کشت MS (۱/۲) حاوی آگار گیاهی به عنوان تثبیت کننده (۹۷درصد) بود. بهترین جداکشت برای تولید کالوس، برگ و بهترین محیط کشت MS (۱/۲) حاوی ۲٬٤-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. بهترین محیط برای باززایی، MS (۱/۲) حاوی GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) بود. بهترین هورمون برای اندام‌زایی مستقیم ساقه، BAP در غلظت‌های مختلف بود. بهترین محیط برای ازدیاد گیاهچه MS (۱/۲) حاوی ٦- بنزیل‌آمینوپورین به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و جیبرلیک اسید به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (بیش از ۲۵ شاخساره از هر نمونه بود. ریشه‌زایی با استفاده از قرار دادن گیاهچه‌ها در ایندول-۳-بوتیریک اسید (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت یک هفته و سپس انتقال آن‌ها به MS (۱/۲) انجام شد. در نهایت گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک منتقل و سازگار شدند و بیش از ۹۵ درصد آن‌ها در گلخانه زنده ماندند. این نتایج پروتکلی را برای ریزازدیادی تجاری گیاهان عروسک پشت پرده پیشنهاد می‌کند.

استناد: کاشانچی، منا؛ پورفخرایی، الهه: پارسا، میترا؛ زینالی، امینه. (۱٤۰۱). بررسی اثر غلظت‌های مختلف سایتوکینین و اکسین بر کشت درون‌شیشه‌ای عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi* L.) با استفاده از جداکشت‌های برگی و ساقه. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ٦۸ (٤)، ۱۲۲-۱۰۹.

Doi: 10.30495/iper.2022.1952442.1772
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.68.10.9

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

میوه گیاه عروسک پشت پرده از نظر خوراکی، دارویی و صنعتی بسیار حائز اهمیت است. این گیاه از خانواده *Solanaceae* است و دارای بافتی همچون گوجه فرنگی و طعمی شبیه آناناس و توت‌فرنگی می‌باشد و از این جهت میوه‌ای منحصر به فرد محسوب می‌شود (Whitson & Manos, 2005). عروسک پشت پرده بومی مکزیک است ولی کلمبیا بیشترین تولید و صادرات آن را دارد (Rout et al., 2006). این گونه به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی از جمله فیتواسترول‌ها، ویتانولیدها، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی، فیسالین‌ها (Puente et al., 2011)، آسکوربیک اسید، ویتامین آ، آهن و فسفر (Velasquez et al., 2007) و همچنین برای فعالیت‌های بیولوژیکی مهم مانند خواص آنتی‌بیوتیکی، آنتی‌اکسیدانتی، ضدسرطان و ضدالتهابی خود، از نظر علمی مورد توجه قرار گرفته است (Muniz et al., 2015).

عروسک پشت پرده را می‌توان هم از روش جنسی از طریق بذرها و هم از روش قلمه تکثیر کرد (Chaves *et al*., 2005). اگرچه تکثیر از طریق بذر به دلیل تعداد زیاد بذر در هر میوه، سرعت جوانه زنی بالا و تنوع ژنتیکی دارای مزیت است ولی کشت بذر در مزرعه به دلیل حساسیت گیاهان به آفات و بیماری‌ها و تولید کمتر متابولیت‌های ثانویه، به عنوان محدودیت‌های مهم در صنعت داروسازی محسوب می‌شود (Carvalho et al., 2013). براساس مطالعات مختلفی که روی عروسک پشت پرده انجام گرفته است، تکنیک کشت بافت روش مناسبی برای تولید نهال در این گیاه می‌باشد (Chaves et al., 2005 ; ; Rodrigues et al., Ramar et al., 2014 .(Yucesan et al., 20152013

تکنیک کشت بافت امکان به دست آوردن تعداد زیادی گیاهچه سالم، همگن با قابلیت‌های ژنتیکی بالا را در یک بازه زمانی کوتاه و در فضای کمتر فراهم می‌کند (Carvalho et al., 2013). این تکنیک را می‌توان توسط اندام‌زایی یا جنین‌زایی، که از طریق دو مسیر مشخص: غیرمستقیم و مستقیم اتفاق می‌افتد، انجام داد (Grattapaglia & Machado, 1998). Rezanejad و Hosseini (۲۰۱۹) اثر فاکتورهای رشد بر ریزازدیادی مستقیم عروسک پشت پرده بر جداکشت‌های جوانه و ساقه و انتقال آن به گلخانه و فاز گلدهی انجام دادند. آن‌ها از دانه رست‌های سترون به عنوان منبع جداکشت استفاده کردند. ریزازدیادی جداکشت‌ها، در ۱۰ محیط کشت با سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد ۲ و ٤ دی کلروفنوکسی استیک اسید و ٦ بنزیل امینوپورین و همچنین محیط MS بدون هورمون (کنترل) در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی بررسی شد. جداکشت‌های میان گره در محیط‌های کشت ۲، D–٤ (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)، ۲، D–٤ (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و ۲، D–٤ (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌ترتیب ۲، ۳ و ٤ شاخساره تولید کردند. نهال‌های ریشه‌دار شده با موفقیت ۱۰۰درصد در محیط‌های حاوی پرلیت و خاک سازگار و سپس در گلخانه رشد و ایجاد گل نمودند (Rezanejad & Hosseini, 2019).

سایتوکینین ٦–بنزیل‌آمینوپورین (BAP) در گونه‌های مختلف برای ازدیاد و القای باززایی در ٦۰درصد از محیط‌های کشت استفاده شده است (Grattapaglia & Machado, 1998). مطالعات انجام شده توسط Chaves و همکاران (۲۰۰۵)، Muniz و همکاران (۲۰۱۵)، Rodrigues و همکاران (۲۰۱۳) و Yucesan و همکاران (۲۰۱۵) تایید می‌کنند که BAP بهترین تنظیم‌کننده رشد برای ریزازدیادی گونه

P. peruviana است، اگرچه همچنان در مورد بهترین غلظت آن اختلاف نظر وجود دارد.

Shah و همکاران (۲۰۱۸) بر روی ریزازدیای گیاه *Physalis peruviana* تحقیقات آزمایشگاهی انجام داد. وی در تحقیقات خود از جداکشت‌های میانگره و برگ استفاده کرد. جداکشت‌ها در محیط کشت MS و در تیمارهای مختلف هورمون رشد BAP، GA3 و ۲، ٤-D قرار گرفتند. بهترین تیمار مربوط به جداکشت گره و میانگره و در ترکیبات هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲، ٤-D حداکثر میزان پرآوری بود (Shah, 2018).

Romo-Paz و همکاران (۲۰۲۱) تکثیر گیاه *Physalis angulata* را در شرایط آزمایشگاهی انجام دادند. جداکشت‌های مورد استفاده در پژوهش، جوانه‌های جانبی اسپتیکال بودند. جداکشت‌ها در محیط کشت پایه MS همراه با غلظت‌های مختلف Benziladenine (BA)، در ترکیب باغلظت‌های مختلف هورمون کینتین (Kin) کشت داده شدند. القای ریشه با فرو بردن شاخه‌ها در محیط حاوی اکسین ۱-نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت‌های مختلف و یا غلظت‌های متفاوتی از هورمون ایندول استیک اسید (IAA) به دست آمد. بوته‌های سازگار شده و به گلخانه منتقل شدند. در نهایت بهترین تیمار برای مرحله شاخه دهی و ریشه دهی معرفی شد (Jesus Romo Paz et al., 2021).

گیاه عروسک پشت پرده به صورت سنتی از طریق بذر تکثیر می‌شود. در ایران نیز تکثیر و ازدیاد این گیاه از طریق بذرهای وارداتی با قیمت بالا و گاهی نسل‌هایی با پراکندگی بالای ژنتیکی و با کیفیت پایین انجام می‌شود. بنابراین این موضوع تولیدکنندگان را با مشکلات و محدودیت‌های تکثیر گیاه و تولید انبوه مواجه می‌نماید. به همین دلیل روش تکثیر از طریق کشت بافت برای تکثیر سریع این گیاه و تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل بیماری زا می‌تواند گامی برای رفع مشکلات موجود در زمینه تولید و تکثیر و کاهش هزینه اولیه این گیاه شود. بنابراین در این پژوهش درنظر است یک روش مناسب برای ریزازدیادی گیاه عروسک پشت پرده به عنوان یک گیاه دارویی و زینتی مهم از طریق کشت جداکشت‌های ساقه و برگ در محیط کشت MS با هورمون‌های مختلف سایتوکینین BAP، اکسین ۲، ٤-D و GA3 و با غلظت‌های متفاوت ارائه شود.

مواد و روش‌ها

مرحله ضدعفونی بذرها: بذرهای عروسک پشت پرده از شرکت گلس گاردن تهیه شد. دانه‌ها ابتدا به طور کامل شسته شدند تا ذرات گرد و غبار از بین بروند. پس از شستشو با آب جاری، فرآیند ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه سپس شستشو با آب مقطر استریل، ۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد با اضافه کردن ۳ قطره توئین ۸۰ و چهار مرتبه شستشو با آب مقطر استریل به ترتیب به مدت ۵، ۳، ۲ و ۱ دقیقه انجام شد. سپس بذرها با کاغذ صافی استریل خشک و آماده کشت شدند.

مرحله جوانه‌زنی بذرها و تولید گیاه کامل: در مرحله کشت بذرها از ۲ نوع محیط کشت MS ۱/۲ و آب مقطر استریل (۵۰ میلی‌لیتر در هر جار) استفاده شد. آزمایش جوانه‌زنی در ٤ تکرار ۲۵ تایی انجام شد. بذرها در داخل پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری و روی کاغذ صافی، آگار گیاهی ۰/۸درصد و ماسه شسته استریل کشت شدند (جدول ۱). pH محیط کشت ۵/۸ تنظیم گردید. جارهای حاوی محیط کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پتری‌های حاوی بذر به داخل

اتاقک رشد با دمای ۱۶±۲ سانتی‌گراد و تاریکی منتقل شدند. بذرها روزانه بازبینی شده و بذرهایی که ریشه‌چه آنها قابل رویت بود به عنوان بذر جوانه زده شمارش شد. شمارش به مدت ۱۴ روز ادامه یافت. در نهایت درصد جوانه زنی بذر محاسبه شد. بذرهای جوانه زده روی محیط کشت MS ½ در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت نگهداری شدند. در این آزمایش، از دانه رست‌های چهار هفته‌ای برای تهیه ریزنمونه‌های مختلف استفاده شد.

جدول ۱: محیط‌های کشت استفاده شده در مرحله کشت بذر

محیط کشت/نگهدارنده	آگار گیاهی	ماسه شسته	کاغذ صافی
MS (۱/۲)	MSPA	MSS	MSFP
آب مقطر	DWPA	DWS	DWFP

مرحله القای کالوس: در مرحله کالوس‌زایی، جداکشت‌ها (ساقه و برگ) با ابعاد تقریبی ۱ سانتی‌مترمربع از گیاهچه‌های بذری کشت درون‌شیشه ۳۰ روزه در زیر هود لامینارفلو جداسازی شدند و در جارهای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت جامد MS (۱/۲) حاوی سه نوع تیمار هورمونی مختلف BAP در ۲ سطح (۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و ۲، ٤-D در یک سطح (۲ میلی‌گرم در لیتر) (جدول ۲) به همراه ۱۵گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت شدند. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. جداکشت‌ها درون اتاقک رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بالاترین و ۱۵ درجه سانتی‌گراد کمترین دما و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. واکشت جداکشت‌ها هر ۳۰ روز یکبار انجام شد و رشد کالوس هر هفته به مدت ۲ ماه اندازه‌گیری شد و درصد کالوس زایی یادداشت برداری شد.

جدول ۲: ترکیبات هورمونی مرحله کالوس

محیط کشت	ترکیبات هورمونی
Phy 1	٦- بنزیل‌آمینوپورین (۲ میلی‌گم در لیتر)
Phy 2	٦- بنزیل‌آمینوپورین (۳ میلی‌گم در لیتر)
Phy 3	۲٬٤-دی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید (۲ میلی‌گرم در لیتر)

مرحله باززایی مستقیم و غیرمستقیم: برای باززایی غیرمستقیم، کالوس‌های به دست آمده از مرحله قبل و برای باززایی مستقیم، جداکشت‌های ساقه به محیط‌های کشت جامد MS (۱/۲) حاوی غلظت‌های مختلف از هورمون‌های BAP، ۲، ٤-D و GA3 انتقال داده شدند (جدول ۳). جداکشت‌ها از نظر تعداد شاخساره، تجزیه و تحلیل شدند.

جدول۳: ترکیبات هورمونی مرحله باززایی

محیط کشت/هورمون	BAP (mg/L)	2,4-D (mg/L)	GA3 (mg/L)
A	۲	–	–
B	۳	–	–
C	۳	–	۰/۵

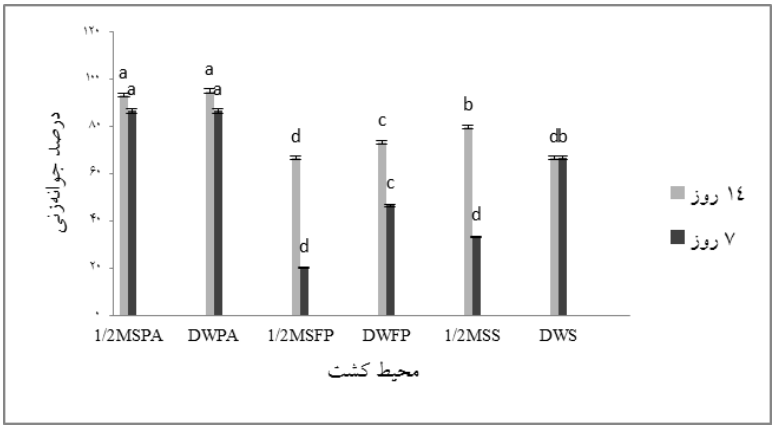
D – ۲ –

مرحله ریشه‌زایی و استقرار گیاهچه‌ها در خاک: گیاهچه‌های باززا شده به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شده و پس از ایجاد ریشه به خاک انتقال داده شدند. برای ریشه‌زایی، از دو روش قرار دادن گیاهچه‌ها در محیط کشت بدون هورمون و قرار دادن گیاهچه‌ها در محیط کشت MS (۱/۲) حاوی تیمار هورمونی IBA به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت یک هفته و سپس انتقال به محیط کشت MS (۱/۲) بدون هورمون استفاده شد. برای انتقال به خاک و سازگار شدن گیاهان به شرایط بیرون، از ترکیب خاک پیت ماس + ورمی‌کولیت + پرلیت به ترتیب به میزان ۱:۱:۲ استفاده شد. طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری: در تمامی مراحل جوانه‌زنی، کالوس‌زایی، اندام‌زایی و ریشه‌زایی، آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (Completely random block design) انجام گرفت. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS شماره ۲۶ استفاده شد. بررسی معنی‌داری اثرات تیماری با استفاده از آزمون ANOVA انجام و برای مقایسه‌های بین تیماری از آزمون تعقیبی دانکن استفاده شد.

نتایج

نتایج مرحله کشت بذرها: جوانه‌زنی بذور بعد از گذشت ۷ روز از زمان کشت اولیه انجام گرفت. بیشترین درصد جوانه‌زنی بذور بعد از ۷ روز (یک هفته) در محیط کشت MS (۱/۲) و آب مقطر استریل حاوی آگار گیاهی هر دو به مقدار مساوی ۸۷ درصد به دست آمد. بیشترین جوانه‌زنی بذور بعد از ۱۴ روز (دوهفته) در آب مقطر حاوی آگار گیاهی به میزان ۹۵درصد انجام گرفت و بعد از آن محیط کشت MS (۱/۲) حاوی آگار گیاهی با میزان ۹۳ درصد در رتبه دوم قرار گرفت (شکل ۱). کمترین میزان جوانه‌زنی بذور بعد از ۷ روز در محیط کشت MS (۱/۲) حاوی کاغذ صافی (۲۰ درصد) و بعد از ۱۴ روز در محیط‌های کشت MS (۱/۲) دارای کاغذصافی و آب مقطر حاوی ماسه شسته هر دو به میزان ۶۷درصد بدست آمد.

همان‌طور که در شکل ۲ قابل مشاهده است، زمانی که از ماسه شسته به عنوان نگهدارنده استفاده می‌شود، بعد از گذشت دو هفته در ۸۰ درصد بذرها جوانه‌زنی اتفاق افتاده است. با توجه به اینکه ماسه شسته نسبت به آگار گیاهی از لحاظ قیمت بسیار ارزانتر است، بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای کشت درون شیشه گیاه عروسک پشت پرده به جای آگار از ماسه به عنوان نگهدارنده استفاده شود.

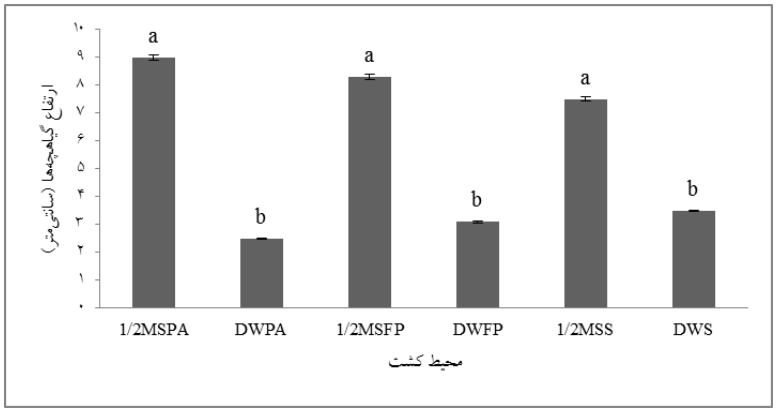


شکل ۱: مقایسه درصد جوانه‌زنی بذرها بعد از ۷ روز و ۱٤ روز (½MSPA: ½ MS +آگار گیاهی، DWPA: آب مقطر+آگار گیاهی، ½ MSFP: ½ MS +کاغذ صافی، DWFP: آب مقطر+کاغذ صافی، ½ MSS: ½ MS +ماسه شسته، DWS: آب مقطر+ماسه شسته).

الف ب ج

شکل ۲: مرحله جوانه‌زنی بذرها در نگهدارنده‌های متفاوت. الف- ماسه شسته، ب- کاغذ صافی، ج- آگار

لازم به ذکر است که بلندترین ارتفاع گیاهچه بعد از گذشت یک ماه از تاریخ کشت و با صرف نظر از درصد جوانه‌زنی دانه‌ها، ۹ سانتی‌متر به دست آمد. این گیاهچه‌ها ٦ برگی بودند و در هر سه محیط کشت MS (۱/۲) حاوی آگار گیاهی، کاغذ صافی و ماسه شسته، تفاوت معنی‌داری در طول گیاهچه مشاهده نشد. ارتفاع گیاهچه‌ها در محیط‌های کشتی که در آن‌ها فقط از آب مقطر استریل (بدون وجود نمک‌های لازم و ساکارز به عنوان منبع کربن) استفاده شده بود، بعد از گذشت یک ماه از تاریخ کشت اولیه، رشد بسیار کمی را نشان داد. شکل ٤ ارتفاع گیاهچه‌ها را بعد از گذشت یک ماه مورد مقایسه قرار داده است. نتایج مرحله کالوس‌زایی: براساس جدول تجزیه واریانس بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (جدول ٤)، اثر متقابل بین تیمارهای داده شده در این آزمایش و جداکشت استفاده شده برای کالوس‌زایی، اختلاف معناداری در سطح یک درصد وجود دارد. بنابراین انتخاب جداکشت مناسب برای کالزایی گیاه عروسک پشت پرده که در این آزمایش جداکشت برگی می‌باشد بسیار مهم است. از طرفی انتخاب نوع هورمون و همچنین استفاده از غلظت مناسب از آن بسیار حائز اهمیت است.



شکل ۳: مقایسه ارتفاع گیاهچه‌ها در محیط‌های کشت مختلف بعد از یک ماه (MSPA ½: MS ½ +آگار گیاهی، DWPA: آب مقطر+آگار گیاهی، MSFP ½: MS ½ +کاغذ صافی، DWFP: آب مقطر+کاغذ صافی، MSS ½: MS ½ +ماسه شسته، DWS: آب مقطر+ماسه شسته)

جدول ٤: جدول تجزیه واریانس مرحله کالوس‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
بلوک	۵	۵۵۰٤/٦٦۷**	۱۵/۵۳۹
تیمار*ریزنمونه	۱	۱۹۰۰/۹۰۳**	۵/۳٦٦
تیمار	۲	۵۸۲۷/۹۸٦	۱٦/٤۵۱
ریزنمونه	۲	۱۰۰۲۷/۷۷۸	۲۸/۳۰٦
خطا	۱	۳۵٤/۲۵۹	

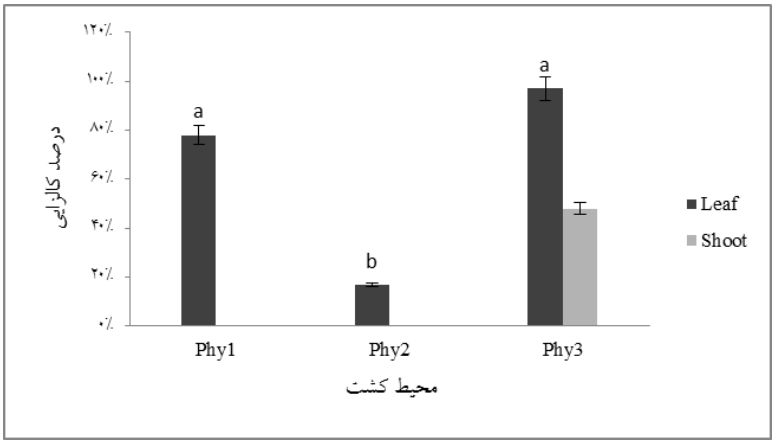
ns غیرمعنی‌دار،**معنی‌دار در سطح ۱درصد، *معنی‌دار در سطح ۵ درصد

بنابراین با استفاده از جدول مقایسه میانگین دانکن، مشاهده شد که در محیط‌های کشت MS (۱/۲) حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و MS (۱/۲) حاوی ۲، D–٤ (۲ میلی‌گرم در لیتر) درصد کالزایی از جداکشت‌های برگ بسیار مشابه بود. بیشترین درصد کالزایی (۹۷ درصد) برای جداکشت برگ در محیط کشت حاوی ۲، ٤ – D با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که در مقایسه با محیط کشتی که دارای BAP با همان غلظت بود، اختلاف چندانی نشان نداد .برای جداکشت‌های ساقه، بیشترین درصد کالزایی (٤۸ درصد) در محیط کشت MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. از آنجایی که در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف BAP در جداکشت‌های ساقه، میزان کالزایی بسیار کم بود، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری گرفت که بهترین هورمون برای کالزایی عروسک پشت پرده ۲، D–٤ و بهترین جداکشت، برگ است.

با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش، بین درصد کالزایی از جداکشت‌های برگی، در غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، اختلاف کاملا معناداری مشاهده شده است، بنابراین استفاده از غلظت مناسب از هورمون در محیط کشت کالزایی، رابطه مستقیمی با عملکرد دارد و در این آزمایش با افزایش غلظت هورمون، عملکرد کالزایی کاهش قابل توجهی پیدا می‌کند. در صورت استفاده از هورمون BAP، بهتر است برای بالا بردن کارایی آزمایش و افزایش کالزایی از غلظت‌های کمتر هورمون BAP استفاده شود.

شکل ٤: قرار دادن جداکشت‌های ساقه و برگ در محیط کشت کالزایی و ایجاد کالوس

از آنجایی که جداکشت‌های برگ و ساقه در گیاه عروسک پشت پرده بدون نیاز به مرحله کالزایی و مستقیما از طریق باززایی مستقیم جداکشت‌ها قابل ازدیاد هستند، بیشترین مطالعات انجام شده و در حال انجام برروی ازدیاد درون شیشه‌ای این گیاه دارویی ضروری، بر باززایی مستقیم از ساقه و میانگره دلالت دارد.



شکل ٥: شکل مقایسه درصد کالزایی در ریزنمونه و محیط‌های کشت مختلف Phy1: MS (۱/۲) حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر)، Phy2: MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر)، Phy3: ۲، ٤ – D (۲ میلی‌گرم در لیتر)

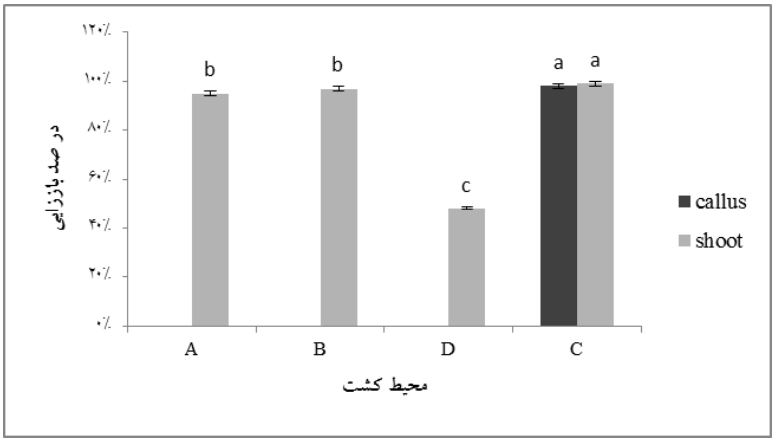
نتایج مرحله باززایی: براساس جدول تجزیه واریانس بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (جدول ٥)، اثر متقابل بین تیمارهای داده شده در این آزمایش و جداکشت استفاده شده برای باززایی، اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد وجود دارد. در این تحقیق، تیمار هورمونی MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، ۹۸ درصد باززایی از کالوس‌های برگی و ساقه‌ای را حاصل کرد، اما به دلیل مشابهت نتایج با روش باززایی مستقیم (۹۹ درصد)، سریع‌ترین روش برای باززایی گیاه عروسک پشت پرده از لحاظ زمانی، روش باززایی مستقیم از طریق جداکشت ساقه است.

بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن، مشاهده شد که بیشترین درصد باززایی برای کالوس (جداکشت ساقه و برگ) در محیط کشت MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید و کالوس‌ها در هیچ کدام از تیمارهای هورمونی دیگر نتوانستند باززا شوند. بنابراین وجود هورمون GA3 برای باززا شدن کالوس‌ها در گیاه عروسک پشت پرده بسیار حیاتی است.

جدول ۵: جدول تجزیه واریانس مرحله باززایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
بلوک	۱	٦٥٣٧/٥٠٠	٥٢٣٠
تیمار	۳	٧٥٧٩/٨٦١	٦٠٦٣/٨٨٩
ریزنمونه	۱	٢٢٨١٦/٦٦٧	١٨٢٥٣/٣٣
تیمار*ریزنمونه	۳	٤٢٤٦/٥٢٨**	٣٣٩٧/٢٢٢
تکرار	٤	٢/٠٨٣	١/٦٦٧
خطا	٢	١/٢٥٠	

ns غیرمعنی‌دار،**معنی‌دار در سطح ۱درصد، *معنی‌دار در سطح ۵ درصد

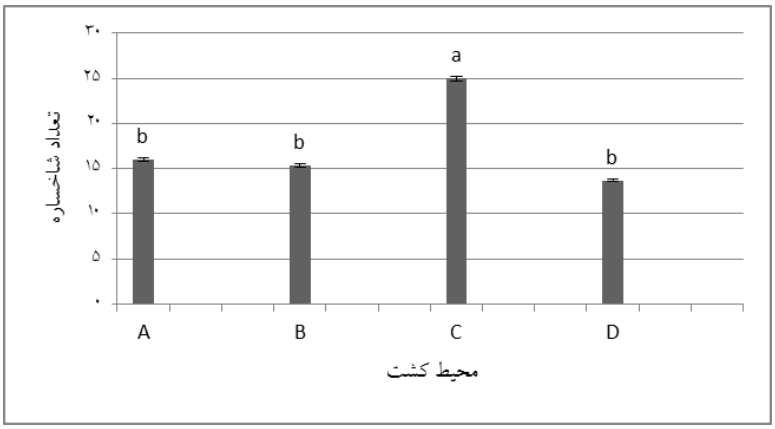


شکل ٦: شکل مقایسه درصد باززایی در ریزنمونه و محیط‌های کشت مختلف A: MS (۱/۲) حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر)، B: MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر)، C: MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، D: MS (۱/۲) حاوی ۲، ٤- D (۲ میلی‌گرم در لیتر)

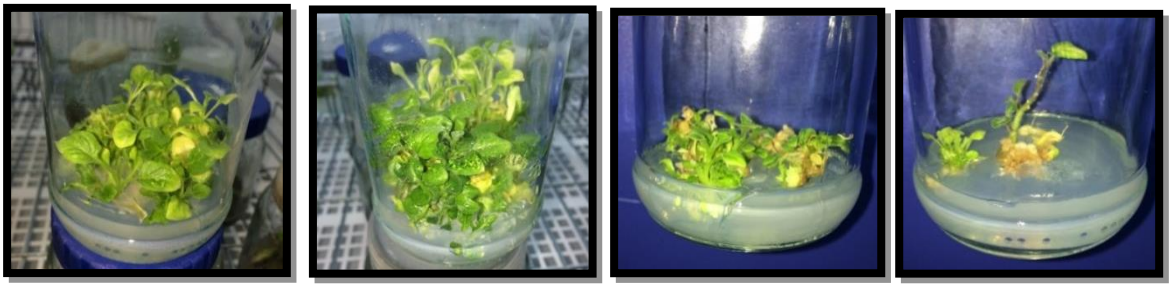
در روش باززایی مستقیم از جداکشت ساقه بهترین نتایج در محیط‌های کشت MS (۱/۲) حاوی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و MS (۱/۲) حاوی BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد، این نتایج بسیار با هم مشابه بودند. از نتایج این آزمایش می‌توان استنباط کرد که تیمار هورمونی D (استفاده از هورمون ۲، ٤ -D) برای باززایی در گیاه عروسک پشت پرده (جداکشت کالوس و ساقه) مناسب نیست. همانطور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، زمانی که از جداکشت ساقه برای باززایی مستقیم گیاه عروسک پشت پرده استفاده شد، در محیط‌های کشت A و B نتایج تقریبا یکسانی مشاهده شد و در هر دو تیمار هورمونی BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) باززایی تقریباً ۹۷ درصد بدست آمد. از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که هورمون BAP در غلظت‌های استفاده شده، موثرترین هورمون برای باززایی در گیاه عروسک پشت پرده است.

برای افزایش تعداد گیاهچه‌ها از محیط کشت C که بیشترین تعداد شاخساره (بیشتر از ۲۵ شاخساره از هر نمونه) در آن مشاهده شده بود، استفاده گردید. لازم به ذکر است که در دیگر تیمارهای هورمونی

مرحله باززایی تعداد کمتری شاخساره در هر نمونه مشاهده شد (شکل ۷).



شکل ۷: شکل تعداد شاخساره‌ها در محیط‌های کشت مختلف (A: ½ MS + BAP (2 mg/L)، B: ½ MS + BAP (3 mg/L)، C: ½ MS + BAP (3 mg/L) + GA3 (0.5 mg/L)، D: ½ MS + 2, 4-D (2 mg/L))



شکل ۸: باززایی گیاهچه‌ها از کالوس و افزایش تعداد گیاهچه‌ها در محیط کشت C

نتایج مرحله ریشه‌زایی و انتقال به خاک: ریشه‌زایی در محیط کشت MS (۱/۲) حاوی تیمار هورمونی IBA به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از گذشت یک هفته مشاهده شد و ۱۰۰ درصد گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در خاک حاوی پیت ماس + ورمی‌کولیت + پرلیت به میزان ۱:۱:۲ سازگار شدند و پس از گذشت یک ماه به گلخانه انتقال داده شدند.

شکل ۹: ریشه‌زایی و استقرار گیاهچه‌ها در خاک

بحث

بر اساس نتایج این مطالعه، بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی گیاه عروسک پشت پرده MS حاوی غلظت نمک‌های نصف شده است. بر اساس تحقیق Rodrigues و همکاران ۲۰۱۳، افزودن سیتوکینین ٦-بنزیلامینپورین (۱/۳ میلی گرم در لیتر) در محیط MS با ۵۰ درصد نمک‌ها برای تکثیر آزمایشگاهی *Physalis peruviana* L. موثر بود (Rodrigues et al., 2013b). حداکثر القای کالوس (۹۷درصد) در جداکشت‌های برگ با استفاده از هورمون‌های ۲، ٤-D و BAP هر دو به مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. Kazemiani و همکاران (۲۰۱۸) حداکثر درصد تشکیل کالوس را در محیط MS حاوی ویتامین‌ها و بدون BAP مشاهده کردند (Kazemiani et al., 2018). Kadirova و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که اندازه جداکشت از ۰/٦ تا ۱ سانتی متر برای ریزازدیادی بهینه است (Kadirova et al., 2019).

در این مطالعه پتانسیل زادآوری بالایی در جداکشت‌های ساقه و در محیط کشت BAP (۳ میلی‌گرم در لیتر) و GA3 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. نتایج حاصل از تحقیق Romo-Paz و همکاران (۲۰۲۱)، یک تکثیر کارآمد را با تعداد شاخه‌های ۰/٤٦ ± ٦/٥٧ با ٤/٤٣ میکرومولار BA در ترکیب با ۲/۳۲ میکرومولار Kin نشان داد (Jesus Romo-Paz et al., 2021). Kazemiani و همکاران (۲۰۱۸)، بیشترین تعداد شاخساره جانبی در محیط کشت MS حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر نیکوتینیک اسید، ۵۰ میلی گرم در لیتر – ۱ پیریدوکسین – HCl، 10 میلی گرم در لیتر – تیامین – HCl و ٤ میلی گرم در لیتر اسید نیکوتینیک مشاهده کردند (Kazemiani et al., 2018). Ramar و همکاران (۲۰۱٤) تولید شاخساره را در *Physalis proviana*، که گونه دیگری از این جنس است گزارش کرده‌اند (Ramar et al., 2014). آنها بیشترین تعداد شاخساره را از جداکشت‌های گره و میانگره در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، 1 میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲، D–٤ مشاهده کردند. Mascarenhas و همکاران (۲۰۱۹) با هدف ارزیابی اثرات ٦-بنزیلامینپورین (BAP) و جداکشت‌ها بر پتانسیل مورفوژنتیکی *P. peruviana* و همچنین ایجاد پروتکلی برای تکثیر این گونه از طریق اندام‌زایی مستقیم، مطالعه انجام دادند. بهترین نتیجه برای تولید ساقه مستقیم با ۱۲/۵ میکرومولار BAP به دست آمد (Mascarenhas et al., 2019). Jahirhussain و همکاران (۲۰۱٦) تعداد زیادی شاخساره را در غلظت‌های مختلف BAP و KIN القاء کردند. در مقایسه با KIN، BAP تعداد ساقه‌های بیشتری در ریزنمونه‌های گرهی ایجاد کرد. بیشترین فراوانی ۱۰۰ درصد القای شاخساره در محیط کشت پایه MS همراه با ۸ میکرومولار BAP و ۱۰ میکرومولار KIN مشاهده شد (Jahirhussain et al., 2016).

IBA با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت یک هفته باعث ریشه زایی در نهال‌های عروسک پشت پرده می‌شود، به‌طوری‌که همه نهال‌ها پس از یک هفته ریشه دار شدند. بر اساس نتایج Romo-Paz و همکاران (۲۰۲۱)، ریشه‌زایی کارآمد با ۱/۰۷ میکرومولار NAA با میانگین ۳۰/۵۱ ± ۰/۹٤ ریشه به دست آمد (Jesus Romo-Paz et al., 2021). Kazemiani و همکاران (۲۰۱۸) حداکثر درصد تشکیل ریشه را در محیط MS حاوی ویتامین‌ها و بدون BAP مشاهده کردند (Kazemiani et al., 2018). Mascarenhas و همکاران (۲۰۱۹) شاخه‌های بدست آمده در شرایط درون شیشه را با موفقیت در محیط آزمایشگاهی بدون زغال فعال ریشه‌دار کردند و گیاهچه‌های سازگار شده در زمین اصلی پس از ۹۰ روز سازگاری به ۱۰۰ درصد بقای خود دست یافتند

(Mascarenhas et al., 2019). Jahirhussain و همکاران (۲۰۱٦) بیشترین تعداد ریشه را در ۳۰ روز در محیط کشت پایه MS حاوی ۱۰ میکرومولار IBA و ٦ میکرومولار NAA به‌دست آوردند (Jahirhussain et al., 2016).

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی هورمون‌ها نقش بسزایی در ساقه و ریشه‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه مورد مطالعه دارند. نتایج تقریبا مشابهی در هر سه محیط کشت مشاهده شد. شاخه‌های باززا شده از ساقه ریشه تولید کردند. علاوه بر این، شاخه‌های گره‌دار مختلف، بعد از انتقال به محیط ریشه‌زایی، با موفقیت ریشه‌دار شده و به خاک انتقال داده شدند. کشت بافت یک جایگزین مناسب برای تکثیر *Physalis alkekengi* است. کیفیت گیاهچه‌های تولیدشده در شرایط آزمایشگاهی *P. alkekengi* هم تحت تأثیر نوع جداکشت و هم غلظت BAP است. بهترین جداکشت‌ها برای اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم این گیاه به ترتیب ساقه و برگ‌ها هستند. هزینه تولید نهال *P. alkekengi* ریزازدیادی را می‌توان با استفاده از محیط رقیق شده MS و استفاده از ماسه به جای آگار گیاهی کاهش داد. گیاهچه‌های *P. alkekengi* بقای بالایی را پس از سازگاری نشان می‌دهند تا جایی که ممکن است در شرایط گلخانه چندین سال محصول تولید کنند. مطالعه حاضر قابلیت باززایی بالای گیاه عروسک پشت پرده را به عنوان یک گیاه دارویی مهم در شرایط کشت درون شیشه نشان می‌دهد.

References

Chaves, A.D.C., Schuch, M.W., and Erig, A.C. (2005). Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. Ciência e Agrotecnologia, 29(6):1281-1287 .

De Carvalho, A., Tombolato, A., Rodrigues, A.D.J., and Silva, F.D. (2013). Panorama da cultura de tecidos no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais. Embrapa Agroindústria Tropical-Capítulo em livro científico

De Jesús Romo-Paz, F., Folgado, R., Delgado-Aceves, L., Zamora-Natera, J.F., and Portillo, L. (2021). Tissue culture of *Physalis angulata* L.(Solanaceae): techniques for micropropagation and germplasm long-term preservation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 144(1):73-78.

Grattapaglia, D., and Machado, M.A. (1998). micropropagação. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas, 1:183-260 .

Jahirhussain, G., Parvathi, S., Tamilselvan, V., Muniappan, V., Deepa, K., and Veerappan, R. (2016). In vitro Shoot multiplication of Physalis minima L.-an important Medicinal Herb. Journal of Advanced Applied Scientific Research, 1(3):49-88 .

Kadirova, Z., Shokhista, T., Dilbar, D., Rano, M., and Gulchehra, S. (2019). Micropropagation of the medicinal plant *Physalis alkekengi*. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology, 9(8):809-812 .

Kazemiani ,S., Motallebi-Azar, A.R., Panahandeh, J., Mokhtarzadeh, S., and Ozdemir, F.A. (2018). Shoot proliferation from potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria) under different concentration of MS include vitamins and BAP medium. Progress in Nutrition, 20(1):160-166 .

Mascarenhas, L.M.S., Santana, J.R.F.D., and Brito, A.L. (2019). Micropropagation of Physalis peruviana L. Pesquisa Agropecuária Tropical, 49 .

Muniz, J., Marchi, T., Coldebella, M. C., Rufato, L., and Kretzschmar, A.A. (2015). Crescimento vegetativo e potencial produtivo de fisális. Revista de Ciências Agroveterinárias, 14(1):15-23 .

Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S., and Cortés, M. (2011). Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International, 44(7):1733-1740 .

Ramar, K., Ayyadurai, V., and Arulprakash, T. (2014). In vitro shoot multiplication and plant regeneration of Physalis peruviana L. an important medicinal plant. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(3):456-464 .

Rezanejad, F., and Hosseini, A. (2019). 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. Modares Journal of Biotechnology, 10(3)

Rodrigues, F.A., Dos Santos Penoni, E., Soares, J.D.R., and Pasqual, M. (2013a). Diferentes concentrações de sais do meio ms e bap na multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. Bioscience Journal.

Rodrigues, F.A., Dos Santos Penoni, E., Soares, J.D.R., and Pasqual, M. (2013b). Different concentrations of ms and bap medium salts in the in vitro multiplication of *Physalis peruviana* L. Bioscience Journal.

Rout, G., Mohapatra, A., and Jain, S.M. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology advances, 24(6):531-560 .

Shah, F. A. (2018). In Vitro Shoot Multiplication and Plant Regeneration of *Physalis peruviana* L. An Important Medicinal Plant Harvested at IIIM Jammu (J&K). american journal of pharmtech research, 8(6):6 .

Velasquez, H.J.C., Giraldo, O.H.B., and Arango, S.A.P. (2007). Estudio preliminar de la resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín, 60(1):3785-3796 .

Whitson, M., and Manos, P.S. (2005). Untangling Physalis (Solanaceae) from the Physaloids: a two-gene phylogeny of the Physalinae. Systematic Botany, 30(1):216-230 .

Yucesan, B.B., Mohammed, A., Arslan, M., and GÜREL, E. (2015). Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments ofCape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 39(5):797-806 .