

Optimization of In Vitro Micropropagation of the Medicinal Plant *Primula veris* L.Farah Farahani^{1*}, Zahra Sabouri², Mohsen Zargar³¹Full professor, Department of Biology, Institute of Quantum Science and Social Biology, Qo. C., Islamic Azad University, Qom, Iran²MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University (East Tehran Branch), Tehran, Iran³Associate professor, Department of Biology, Institute of Quantum Science and Social Biology, Qo. C., Islamic

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 2025.07.02

Revised 2025.07.24

Accepted 2025.08.07

KeyWords:

Benzylaminopurine (BAP)
In vitro culture
Shoot proliferation
Mahallat and Amol seeds
Micropropagation

*Corresponding author:

E-mail address:

Abioqom2020@gmail.com

Introduction: *Primula veris* L., a valuable medicinal plant in medicine and the pharmaceutical industry. Due to limitations in natural propagation and the necessity to conserve genetic resources, micropropagation offers an efficient approach for the mass production of uniform and healthy plants. This study aimed to evaluate the effects of different concentrations of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* regeneration and growth of shoot explants derived from seeds of two Iranian: Mahallat and Amol.

Materials and Methods: The experimental treatments included BAP concentrations of 1, 1.5, 2 and 2.5 mg⁻¹ and IAA 1.5 mg⁻¹.

Results: Analysis of variance (ANOVA) revealed that the interaction between hormone concentration and seed origin had a significant effect ($p < 0.05$) on shoot length, number of shoots, leaf length, and number of leaves. The highest shoot length was observed in treatments 1, 1.5 mg⁻¹ of Mahallat seeds, while the lowest was recorded in treatment 2.5 mg⁻¹ of Amol seeds. The greatest mean values for shoot number, leaf number, and leaf length were obtained in treatment 1.5 mg⁻¹ of Mahallat seeds, while the highest shoot number for Amol was observed in treatment 1 mg⁻¹. Mean comparison tests (LSD and Duncan's multiple range test) confirmed significant differences among most treatments across the evaluated traits. Overall, BAP concentrations of 1.5 mg⁻¹ and 2 mg⁻¹ were most effective in enhancing growth parameters in both Mahallat and Amol seeds.

Conclusion: These findings provide a practical basis for optimizing micropropagation and developing efficient *in vitro* multiplication protocols for future breeding programs.

Cite this article: F. Farahani, Z. Sabouri, M. Zargar, Optimization of In Vitro Micropropagation of the Medicinal Plant *Primula veris* L. Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (4): 45-54



Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

بهینه سازی ریزازدیادی گیاه دارویی پامچال (*Perimula veris*)فرح فراهانی^{۱*}، زهرا صبوری^۲، محسن زرگر^۳

^۱استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم کوانتوم و زیست اجتماعی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
^۲دانش آموخته گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور (مرکز شرق)، تهران، ایران.
^۳دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم کوانتوم و زیست اجتماعی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: پامچال (*Primula veris* L) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که در پزشکی و صنعت داروسازی اهمیت دارد. بدلیل محدودیت‌های تکثیر طبیعی و لزوم حفظ منابع ژنتیکی، ریزازدیادی روشی کارآمد برای تولید انبوه و یکنواخت گیاهان سالم بشمار می‌رود. هدف پژوهش تأثیر مقادیر مختلف بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و ایندول استیک اسید (IAA) بر باززایی و رشد *In vitro* شاخساره‌های بذور محلات و آمل بود.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۴/۱۱
 بازنگری ۱۴۰۴/۰۵/۰۲
 پذیرش ۱۴۰۴/۰۵/۱۶

مواد و روش: جهت تکثیر از تیمارها با مقادیر ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA استفاده شد.

کلمات کلیدی

بنزیل‌آمینوپورین (BAP)
 کشت درشیشه
 شاخه‌زایی
 بذره‌های محلات و آمل
 ریزازدیادی

یافته‌ها: تجزیه واریانس نشان دادند، اثر متقابل مقدار هورمون و منبع بذر بر صفات طول و تعداد ساقه، طول و تعداد برگ در سطح احتمال ۵٪ معنادار بود. بیشترین طول ساقه در تیمارهای ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بذر محلات و کمترین طول ساقه در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بذر آمل مشاهده شد. بیشترین میانگین تعداد ساقه، تعداد و طول برگ در تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بذر محلات و بیشترین تعداد ساقه در بذر آمل در تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد. نتایج آزمون‌های مقایسه میانگین (LSD و دانکن) نیز تفاوت معنی‌دار بین تیمارها را در صفات تأیید کرد. به‌طور کلی، مقادیر ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین تأثیر را در بهبود شاخص‌های رشدی در هر دو نوع بذر محلات و آمل داشتند.

* مسئول مکاتبات:

Abioqom2020@gmail.com

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها می‌توانند مبنایی برای بهینه‌سازی ریزازدیادی و توسعه پروتکل‌های تکثیر *In vitro* جهت برنامه‌های اصلاحی آینده فراهم سازند

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ف. فراهانی، ز. صبوری، م. زرگر. بهینه سازی ریزازدیادی گیاه دارویی پامچال (*Perimula veris*). مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۳؛ ۱۹: (۴).

۵۴-۴۵



مقدمه

گیاه پامچال از جنس *Primula* به خانواده *Primulaceae* تعلق دارد. با نام علمی *primula veris L*. شناخته می شود. پامچال گیاهی علفی و چند ساله است. منشأ آن اروپای مرکزی و آسیا گزارش شده است و در مناطق سرد و مرطوب شمال ایران رشد می کند و به طور وحشی در جنگلها و بیشه زارها می روید (۱). برگ ها خاصیت دارویی دارند و می توان آنها را به لحاظ داشتن ویتامین ها و ساپونین ها مورد استفاده قرار داد. این گیاه در درمان های خانگی برای معالجه سرفه، برونشیت، زکام و همچنین به عنوان مسکن و یک ادرارآور و ضدانعقاد استفاده می شود، همچنین در درمان بیماریهای عصبی، تنفسی، کلیوی و خونی کاربرد دارد. البته پامچال علاوه بر خواص مذکور، دارویی تب بر، ضدانگل و حالت تهوع را درمان می نماید. اثرات دارویی بالا به خاطر وجود متابولیت های ثانویه از جمله آلکالوئیدها می باشد. متابولیت های ثانویه این گیاه، از جمله ساپونین هایی که دارای خواص موثر اسپکتورانتی هستند به دلیل توانایی در از بین بردن موکوس یا خلط می توانند به شربت های سرفه ای که در درمان بیماری های برونشیتی یا ریوی به کار می روند اضافه شود (۱)

کاشت و تکثیر این گیاه به وسیله بذر و به طریق رویشی انجام می شود. اگر چه تکثیر پامچال از طریق بذر امکان پذیر است، ولی روش مناسبی نیست زیرا بذریه پامچال به سرعت قوه نامیه خود را از دست می دهند، رشد و نمو گیاهان به کندی صورت می گیرد، بدلیل تفرق صفات یکنواختی لازم وجود ندارد، دوره نونهالی طولانی تر است و کیفیت اولیه بذر از بین می رود، همچنین بی نظمی و تاخیر در جوانه زنی بذر در اکثر گونه های پامچال مانع جدی برای تولید انبوه این گیاهان است (۲،۳). برای آن دسته از گیاهان که نیاز به یکنواختی دارند روش بذر کاری برای تکثیر آن ها مشکل آفرین است. همچنین در بعضی گیاهانی که زمان لازم برای بلوغ و به گل رفتن گیاه طولانی است، هزینه زیادی دارد (۴)

پامچال دارای گل هایی جذاب بوده و به طور گسترده به عنوان گیاهان زینتی باغچه ای و گلدانی کشت می شوند. برخی گونه های پامچال از اهمیت اقتصادی قابل توجهی در صنعت گیاهان زینتی برخوردار هستند. در سیستم های تولید تجاری، هیبریدهای پامچال عمدتاً از طریق بذر تکثیر می شوند؛ هرچند که امکان تقسیم بوته نیز برای برخی گونه ها وجود دارد. با این حال،

مشکلاتی مانند جوانه زنی نامنظم یا دیر هنگام و نرخ جوانه زنی پایین بذرها در بسیاری از گونه های پامچال، مانع از تکثیر انبوه آنها می شود. از اینرو، تکنیک های کشت بافت گیاهی به عنوان ابزارهای ارزشمندی در برنامه های اصلاح نژادی، گسترش تنوع ژنتیکی، انتقال ژن و همچنین حفاظت از منابع ژنتیکی گیاهی در پامچال مطرح هستند (۵). ریزازدیادی گونه های *Primula* از اهمیت بالایی برای مطالعات علمی بنیادی و نیز کاربردهای تجاری برخوردار است. *Primula vulgaris*، دارای ناهم ریختگی گل (*floral heteromorphy*) بوده و دو نوع متمایز از گل های هرمافرودیت تولید می کند. مطالعاتی که به شناسایی ژن های مؤثر در توسعه این ناهم ریختگی گلی می پردازند، نیازمند تکثیر گیاهان جهش یافته گلی هستند و بازایی مؤثر، شرط کلیدی برای ایجاد سیستم های تراریختگی در این گیاه است. چندین رقم از گونه، *P. vulgaris* و هیبریدهای *P. × polyantha*، به عنوان محصولات زینتی مهم شناخته می شوند. ارقام نیمه پر یا پرگل (*semidouble/double*) پامچال نیز از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند. با این حال، تکثیر رویشی این ارقام عقیم و همچنین افزایش تعداد والدین هم نژاد برای تولید بذر هیبرید F₁، روندی کند دارد. در این میان، ریزازدیادی سریع ترین و کارآمدترین روش برای افزایش تعداد این ارقام است. یک پروتکل مؤثر و کارآمد برای باززایی *P. vulgaris*، *In vitro*، از طریق اندام زایی غیرمستقیم از ریزنمونه های برگ بالغ توسعه داده شده است. پروتکل ریزازدیادی امکان تکثیر *P. vulgaris* را بدون محدودیت های فصلی و بدون تخریب گیاه والد ارزشمند فراهم می سازد. این روش، با توسعه بیشتر، بعنوان پایه برای طراحی سیستم های تراریختی در پامچال و مقاومت به بیماری ها در شرایط آزمایشگاهی حائز اهمیت است (۶)

کاربرد روش های زیست فناوری کشت بافت به منظور تکثیر و افزایش توان ژنتیکی گیاهان دارویی و همچنین شناسایی سریع تر و دقیق تر ژنوتیپ هایی که مواد موثره بیشتری تولید می کنند، می تواند بسیار مفید و از لحاظ تجاری بسیار سودآور باشد. یکی از روش های مختلف برای تکثیر با تکنیک کشت بافت ریزازدیادی است، با ریزازدیادی می توان نرخ تکثیر را بالا برد و مواد گیاهی عاری از پاتوژن تولید کرد (۴)

اندازه‌گیری مقدار DNA با استفاده از روش فلو سائتومتری، پایداری ژنتیکی گیاهان *Primula veris L*. حاصل از فرآیند ریزازدیادی را تأیید می‌کند.

پامچال در گروه گیاهان با ژنوم بسیار کوچک طبقه‌بندی می‌شود. منشأ گیاهان به‌طور معناداری ویژگی‌های مورفولوژیکی را تحت تأثیر قرار داده است. گیاهان مشتق از ریزازدیادی، بذرها بزرگ‌تری تولید کردند.

یافته‌های این پژوهش نویدبخش استفاده گسترده از گیاهان باززایی‌شده پامچال در باغبانی زینتی و صنعت داروسازی هستند (۷)

کشت ریزپیوندی درشیشه (*In vitro micrografting*) یکی از تکنیک‌های مهم و پشتیبان در ریزازدیادی بسیاری از گونه‌های گیاهی، به‌ویژه گیاهان چوبی، محسوب می‌شود. این روش به‌عنوان یک راهبرد مؤثر برای بازیابی شاخه‌ها و سازگاری گیاهان رشد یافته در شرایط *In vitro* با محیط خارج توسعه یافته است. از کاربردهای این تکنیک در ریزازدیادی می‌باشد که نقش‌های کلیدی در بازگرداندن بنیه رشد و توانایی ریشه‌زایی گیاهان، افزایش باززایی شاخه‌ها پس از جنین‌زایی سوماتیکی یا اندام‌زایی، کمک به رشد مجدد شاخه‌ها پس از فرآیند نگهداری در دمای بسیار پایین (کریوپریزرویشن) دارد. این تکنیک بویژه به‌عنوان ابزاری بالقوه در مهندسی ژنتیک گیاهان باغبانی و حفاظت ایمن از ذخایر ژنتیکی گیاهی مورد تأکید قرار گرفته است (۸)

در این پژوهش بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه پامچال انجام شده است، زیرا پامچال یک گونه در معرض انقراض است و در بعضی نواحی به صورت محافظت شده می‌باشد. در نتیجه یک راه مؤثر برای به دست آوردن متابولیت‌های با ارزش از پامچال، تکنولوژی کشت بافت می‌باشد. اما اطلاعات بسیار کمی از روش‌های کشت بافت گیاهان جنس *Primula* موجود است.

کشت بافت گیاهان یک راه امیدبخش دیگر برای تولید گروهی از متابولیت‌هایی است که به دست آوردن آنها از راه‌های سنتتیک شیمیایی یا عصاره‌گیری گیاهی مشکل است و بنابراین چاره‌ای جز استفاده از روش‌های زیست فناوری باقی نمی‌ماند

معمولاً کشت بافت به کیفیت تولید و محصول باارزش اهمیت می‌دهد (۱)

به علاوه کشت بافت با استفاده از تکنیک‌های پیشرفته زیست فناوری فرصت‌های جدیدی در افزایش تولید ترکیبات جدید ارائه می‌دهد. ریزازدیادی گونه‌های پامچال در شرایط آزمایشگاهی یک تکنیک حیاتی هم برای حفاظت و هم برای باغبانی تجاری است.

این روش امکان تکثیر سریع و کارآمد گونه‌های مختلف پامچال، از جمله آنهایی که نادر یا در معرض خطر هستند را فراهم می‌کند

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، تهیه گیاهچه استریل

بذور پامچال پس از جمع‌آوری از مناطق محلات و آمل ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در جریان آب شهر قرار گرفتند. در مرحله بعد با الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس در آب ژاول ۳۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس بذرها ۵ بار با آب مقطر استریل در زیر هود لامینار شستشو داده شدند. بذور استریل شده در محیط کشت پایه استریل (MS (۱۹۶۲ Murashige, Skoog) حاوی ساکارز (۳٪) و آگار (۱٪) با pH: ۵/۷ کشت می‌شوند (۹). شرایط اتاق کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی برای جوانه زنی و رشد در

نظر گرفته شده است.

شرایط کشت

آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تأثیر تیمار هورمون‌های بنزیل آمینوپورین (BAP) و اندول استیک اسید (IAA) و سطوح مختلف هورمونی (۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ میلی گرم بر لیتر برای هورمون BAP و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر برای هورمون IAA) (طبق جدول ۱) و یک نوع قطعه جداکشت (نوک یا جوانه شاخساره) مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱. تسمایهای مقادیر متفاوت هورمون در بهینه سازی ریزازیدادی گیاه بامچال (*Primula veris* L).

(٤) 157bp <i>qac</i> ژن	(٥) 533bp <i>mec</i> ژن
Forward: 5'-CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG-3'	Forward: 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'
Reverse: 5'-CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT-3'	Reverse: 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTCG-3'

(BAP + MS+ ۱ mg l⁻¹ IAA، mg l⁻¹) منتقل شدند و در دمای ۲۵ ± ۲ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی در اتاق رشد نگهداری شدند. صفات مورفولوژیک طول ساقه، تعداد شاخساره و تعداد برگ در تیمارهای مختلف پس از طی دوره ۳۰ روزه مورد بررسی قرار گرفتند

نوک شاخساره (به طول حدود ۵ میلیمتر) از دانه رست های سه هفته ای که در شرایط آزمایشگاهی رشد کردند به عنوان جداکشت مورد استفاده قرار گرفت. جداکشت ها به محیط های کشت MB۱ (MS+ BAP) ۲,۵ mgL⁻¹ IAA ۱,۵ mgL⁻¹، MB۲ (MS+ BAP) ۱,۵ mgL⁻¹ IAA ۱,۵ mgL⁻¹، MB۳ (MS+ BAP) ۰/۱ mgL⁻¹ IAA ۱,۵ mgL⁻¹ و MB۴ (MS+ BAP) ۰/۱ mgL⁻¹ IAA ۱,۵ mgL⁻¹ قرار دادند.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز ANOVA، گروه بندی دانکن و مقایسه حداقل میانگین داده ها (LSD) بررسی و سپس نمودارها با نرم افزار اکسل رسم شدند.

داده های حاصل از طرح بلوک های تصادفی با آزمون های آماری و نرم افزار (SPSS Version ۲۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین داده ها و انحراف معیار،

یافته ها

تیمار MB۲، بذر محلات و بیشترین میانگین تعداد ساقه ۱۰ عدد در هر جداکشت تیمار MB۴، بذر آمل مشاهده شدند. در گروه بندی دانکن غلظت های هورمونی ۲، ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر BAP، در تعداد ساقه بذر محلات و غلظت های هورمونی ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر (در یک گروه) نسبت به ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر BAP، در تعداد ساقه بذر آمل در گروه های متفاوت قرار داشتند و در سطح احتمال ۵٪ معنا دار بودند (جدول ۲) تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمونی و جداکشت نوک شاخساره بذر محلات بر میانگین تعداد ساقه نشان دادند میانگین تعداد ساقه در غلظت های هورمونی ۱، ۱/۵ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر هورمونی BAP (تیمارهای MB۴، MB۳ و MB۲) و بذر آمل غلظت هورمونی ۲/۵ میلی گرم بر لیتر هورمونی BAP (تیمار MB۴) نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند (جدول ۳). بیشترین میانگین طول برگ ۱۱ میلی متر در تیمار MB۲، بذر محلات و بیشترین میانگین طول برگ ۹ میلی متر در تیمار MB۳، بذر آمل مشاهده شدند.

تأثیر تیمارهای مختلف در صفات مورفولوژیکی گیاهچه های پامچال حاصل از بذرهای مناطق محلات و آمل بیشترین میانگین طول ساقه ۱۶ میلی متر در تیمارهای MB۳ و MB۴، بذر محلات و بیشترین میانگین طول ساقه ۲ میلی متر در تیمار MB۱، بذر آمل مشاهده شدند. در گروه بندی دانکن غلظت های هورمونی ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم بر لیتر (تیمارهای MB۱، MB۲ و MB۳) نسبت به ۲ میلی گرم بر لیتر (تیمار MB۴) BAP، در طول ساقه بذر محلات و غلظت های هورمونی ۱ و ۱/۵ میلی گرم بر لیتر (تیمارهای MB۳ و MB۴) نسبت به ۲/۵ میلی گرم بر لیتر (تیمار MB۴) و غلظت هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر (تیمار MB۴) نسبت به غلظت هورمونی ۱ میلی گرم بر لیتر (تیمار MB۱) BAP، در طول ساقه بذر آمل در گروه های متفاوت قرار داشتند و در سطح احتمال ۵٪ معنا دار بودند (جدول ۲) تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمونی و جداگشت نوک شاخساره بذرهای محلات و آمل نشان دادند، میانگین طول ساقه در غلظت های هورمون BAP مورد نظر تفاوت معنی داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند (جدول ۳). بیشترین میانگین تعداد ساقه ۱۰ عدد در هر جداگشت

نیست. نتایج آزمون مقایسه میانگین ها (LSD) در سطح احتمال پنج درصد نشان می دهد که در مورد صفت تعداد برگ گیاهچه بذر آمل، بین همه تیمارها اختلاف معنی دار است، در مورد اندازه برگ گیاهچه بذر آمل اختلاف بین تیمارهای MB^۳ و MB^۴ با هم معنی دار نبود. نتیجه این آزمون در مورد طول ساقه گیاهچه بذر آمل نشان می دهد که تیمارهای MB^۴ و MB^۲ اختلاف معنی داری ندارند. همچنین در مورد تعداد ساقه گیاهچه بذر آمل اختلاف بین همه تیمارها با هم معنی دار بود

مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی گیاهچه های بذر محلات و آمل در تیمارهای مختلف

در مورد صفت تعداد برگ، بیشترین تعداد برگ در گیاهچه های بذر محلات با تیمار MB^۲ رویت گردید. همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود تعداد برگ گیاهچه بذر محلات به طور قابل توجهی بیشتر از گیاهچه بذر آمل می باشد. در گیاهچه بذر محلات، با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین، تعداد برگ افزایش می یابد. اما در مورد گیاهچه بذر آمل با افزایش غلظت هورمون، تعداد برگ ها کاهش یافته و در کل تغییر چندانی را نشان نمی دهد.

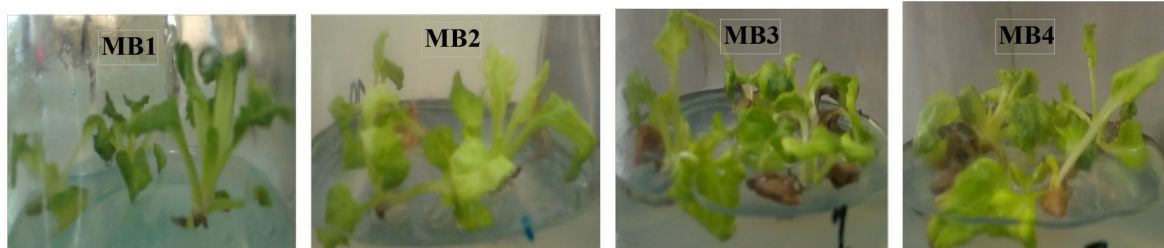
از نظر صفت طول برگ گیاهچه ها، تیمار MB^۲ در بذر محلات بیشترین طول برگ را دارا بود، اما در تیمارهای دیگر، در بذر آمل طول برگ گیاهچه در مقایسه با بذر محلات بیش تر بود. همچنین میانگین طول برگ در گیاهچه بذر محلات با تیمار MB^۱، ۱ میلی متر بود. در کل صفت طول برگ گیاهچه، با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین، در بذر محلات روند افزایشی و در بذر آمل روند کاهشی را نشان می دهد

در گروه بندی دانکن غلظت های هورمونی ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر BAP (تیمارهای MB^۴، MB^۳ و MB^۲)، در طول برگ بذر محلات در سه گروه متفاوت قرار داشتند و در سطح احتمال ۵٪ معنا دار بودند. در غلظت های هورمونی متفاوت BAP، در طول برگ بذر آمل در یک گروه قرار داشتند و در سطح احتمال ۵٪ معنا دار نبودند (جدول ۲). تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمونی و جداکشت نوک شاخساره بذرهای محلات و آمل بر میانگین تعداد ساقه نشان دادند میانگین تعداد ساقه در غلظت های هورمونی ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP تفاوت معنی داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند (جدول ۳) بیشترین میانگین تعداد برگ ۳۹ عدد در هر گیاهچه تیمار MB^۲، بذر محلات و بیشترین میانگین تعداد برگ ۶ عدد در هر گیاهچه تیمار MB^۴، بذر آمل مشاهده شدند. در گروه بندی دانکن غلظت های هورمونی ۱، ۲ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر BAP (تیمارهای MB^۴، MB^۲ و MB^۱)، در تعداد برگ بذر محلات و غلظت های هورمونی ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر BAP (تیمارهای MB^۴ و MB^۳)، در تعداد برگ بذر آمل در گروه های متفاوت قرار داشتند و در سطح احتمال ۵٪ معنا دار بودند (جدول ۲) تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمونی و جداکشت نوک شاخساره بذرهای محلات و آمل بر میانگین تعداد ساقه نشان دادند میانگین تعداد ساقه در غلظت های هورمونی ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP تفاوت معنی داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان دادند (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان می دهد، اثر تیمارهای مختلف بر تعداد برگ، طول برگ، طول ساقه و تعداد ساقه در گیاهچه های بذر محلات و تعداد برگ، طول ساقه و تعداد ساقه در گیاهچه های بذر آمل در سطح $P > 0.05$ معنا دار است (جدول ۳)

نتایج آزمون مقایسه میانگین ها (LSD) در سطح احتمال پنج درصد نشان می دهد که در مورد صفت تعداد برگ گیاهچه بذر محلات بین همه تیمارها اختلاف معنی دار است، در مورد اندازه برگ گیاهچه بذر محلات نیز اختلاف بین همه تیمارها با هم معنی دار بود. نتیجه این آزمون در مورد طول ساقه گیاهچه بذر محلات نشان می دهد که تیمار MB^۲ با تیمارهای MB^۳ و MB^۴ اختلاف معنی داری ندارند. همچنین در مورد تعداد ساقه گیاهچه بذر محلات اختلاف بین تیمارهای MB^۲ و MB^۳ معنی دار



شکل ۱. صفات مورفولوژیکی گیاهچه های پامچال حاصل از بذر محلات



شکل ۲. صفات مورفولوژیکی گیاهچه های پامچال حاصل از بذر آمل

جدول ۲. میانگین صفات مورفولوژیکی گیاهچه های پامچال بذرهای محلات و آمل در تیمارهای متفاوت

مقدار هورمون		تیمار	تعداد برگ		طول برگ (mm)		طول ساقه (mm)		تعداد ساقه	
BAP(mg l ⁻¹)	IAA(mg l ⁻¹)		بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل
۱	۱/۵	MB4	۱۹۳±b	۶۰±a	۷۰±b	۹۰±a	۱۶۱±a	۱/۰۰۰±b	۵۱±b	۱۰۱±a
۱/۵	۱/۵	MB3	۲۶۳±ab	۵۰±ab	۶۲±b	۹۰±a	۱۶۲±a	۱/۰۰۰±b	۵۱±b	۹۱±a
۲	۱/۵	MB2	۳۹۳±a	۵۰±a	۱۱۲±a	۸۰±a	۱۱۲±a	۱۰±a	۱۰۳±a	۹۱±a
۲/۵	۱/۵	MB1	۱۴/۰۸۱±c	۳۰±b	۱/۰۰۰±c	۷۰±a	۱۰±b	۲۰±a	۱/۰۰۰±c	۶/۰۳۰±b

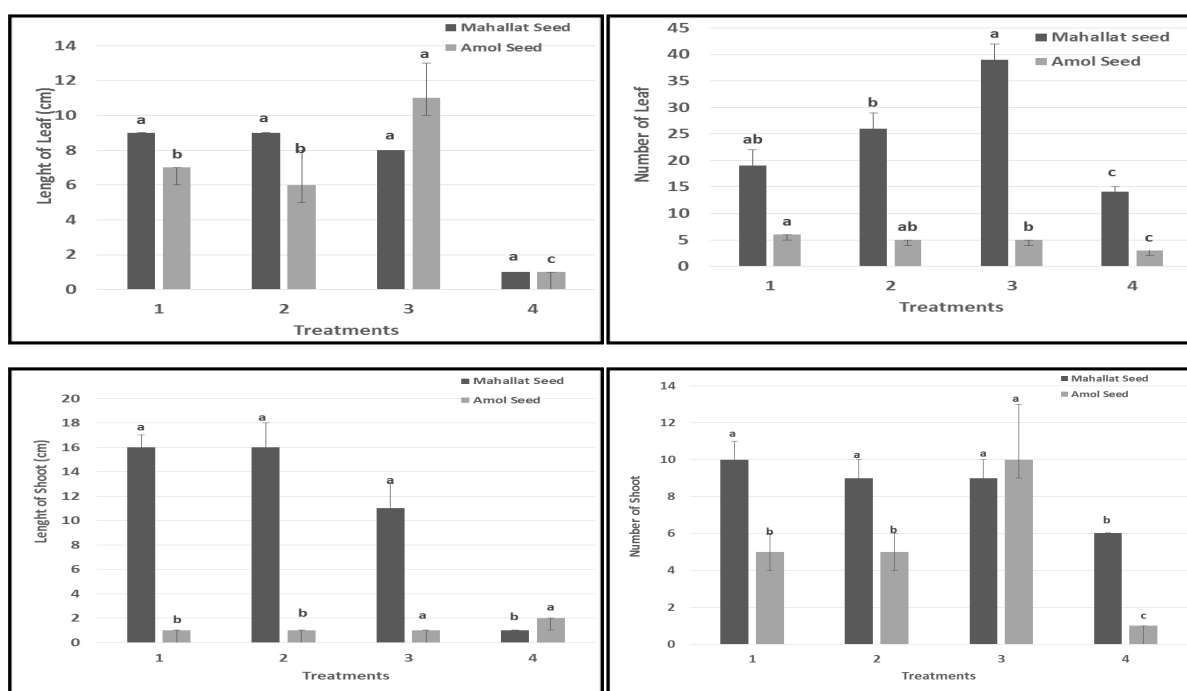
جدول ۳. نتایج آزمون تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهچه های بذرهای محلات و آمل در تیمارهای متفاوت

میانگین مربعات (MS)										منابع تغییرات
درجه آزادی		تعداد برگ		طول برگ (mm)		طول ساقه (mm)		تعداد ساقه		
بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل	بذر محلات	بذر آمل	
۳	۳۰	۱۷۴۷*	۲۶*	۴۴۳*	۲۴ **	۱۴۴۰*	۳۶*	۲۹۸*	۱۱۸*	مقادیر متفاوت هورمون
۷۴	۸۶	۱۸۰	۴	۲۰	۹	۴۵	۵/۰۲	۳۳	۱۵	خطای آزمایشی

*در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار است، **در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار نیست.

می دهد. در مورد صفت تعداد ساقه گیاهچه، بیشترین مقدار در تیمارهای MB۲ بذر محلات و MB۴ بذر آمل مشاهده شد. در کل طول ساقه گیاهچه در بذر بومی بیشتر از بذر محلات بود و مقدار آن در تیمار MB۱ بذر محلات برابر ۱ میلی متر بود. در کل صفت طول ساقه گیاهچه، با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین، در بذر محلات روند افزایشی و در بذر آمل روند کاهشی را نشان می دهد

در مورد صفت طول ساقه گیاهچه ها، طول ساقه در بذر محلات به طور قابل ملاحظه ای بیشتر از بذر آمل بود و بیشترین طول ساقه در تیمارهای MB۴ و MB۳ بذر محلات مشاهده گردید در حالی که طول ساقه در این دو تیمار برای بذر آمل ۱ میلی متر بود. همان طور که نمودار ۲ نشان می دهد در کل صفت طول ساقه گیاهچه، با افزایش غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین، در بذر محلات روند کاهشی و در بذر آمل روند افزایشی را نشان



نمودار ۱. مقایسه میانگین تعداد برگ و طول برگ گیاهچه بذور محلات و آمل در تیمارهای مختلف

بحث

سیواکومار و همکاران (۲۰۲۴) از ریزنمونه های تک گره و در محیط کشت MS حاوی بنزیل آمینوپورین (BAP) در تحریک تولید شاخه های متعدد استفاده کردند. همچنین از تی دی آزرین (TDZ)، کینتین (KIN) و ۲،۴-دی کلروفنوکسی استیک اسید نیز در محیط کشت MS برای تحریک رشد شاخه و ریشه در فرآیندهای اندامزایی مستقیم و غیرمستقیم استفاده می شود (۱۱). در بهینه سازی ریزازدیادی پامچال هورمون های سیتوکینین و اکسین را با مقادیر متفاوت مورد استفاده قرار دادیم، که محققان متعددی مانند هایتا و همکاران

در تحقیق حاضر قطعات گره و نوک شاخساره گیاهچه های پامچال برای بهینه سازی ریزازدیادی مورد استفاده قرار گرفتند در آزمایش هایی که چاندراوانشی و همکاران (۲۰۱۴) به منظور استانداردسازی تکنیک کشت (in vitro) برای گیاه *Primula zeylanica*، بعنوان یکی از منابع گیاهی مهم دارویی، به منظور بررسی توان بالقوه آن برای ریزازدیادی انجام دادند، از قطعات گره این گیاه بعنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی بر روی محیط کشت MS حاوی بنزیل آمینوپورین (BAP) و جیبرلیک اسید (GA3) جهت آغاز رشد ساقه کشت داده شدند (۱۰)

vulgaris با استفاده از ریزغونه های حاصل از برگ در محیط کشت MS حاوی هورمون های TDZ و اکسین (NAA) و یا D-۲,۴ بدون آسیب رساندن به گیاهان مادری انجام دادند (۶). گونه نادر *Primula scotica* با استفاده از محیط های بدون هورمون یا محیط مکمل شده با بنزیل آمینو پورین و اسید ایندول استیک تکثیر شد و به نرخ ضریب ۴-۶ رسید (۱۳)

از مقایسه تاثیر تیمارهای مختلف بر روی ریزازدیادی پامچال دریافتیم در تیمارهای MB۴، MB۳ و MB۲ بیشترین تغییرات افزاینده در صفات مورفولوژیکی تعداد برگ و طول ساقه باززایی شده از بذر محلات و بیشترین تغییرات افزاینده در صفات مورفولوژیکی طول برگ و تعداد ساقه باززایی شده از بذر آمل مشاهده شده است. گونه گیاهی و ارقام می توانند در باززایی گیاهچه ها تاثیر داشته باشند. شریف و همکاران (۲۰۱۱) در باززایی گونه پامچال هتروکروم با ریزغونه راس ساقه در محیط کشت MS با هورمون های BA و NAA رشد و ریشه زایی انجام دادند (۱۲).

(۲۰۱۶)، نوروزی شریف و همکاران (۲۰۱۱) و بنسون و همکاران (۲۰۰۰) از هورمون های ستوکینین و اکسین برای ریزازدیادی استفاده کردند (۱۳، ۱۲، ۶).

نوروزی شریف (۲۰۱۵) پروتکل ریزازدیادی برای *Primula heterochroma* با استفاده از ریزغونه های نوک شاخساره بهینه شده و باززایی زیاد شاخساره در محیط کشت حاوی هورمون های BAP و NAA پیشنهاد کردند و تلاش های حفاظتی برای این گونه ایرانی در معرض خطر را از طریق تکنیک های آزمایشگاهی تسهیل نمودند (۱۴) در مقایسه نرخ رشد و تکثیر گیاهچه های پامچال حاصل از بذر محلات در مقادیر بالاتر از ۲ میلی گرم بر لیتر هورمون سیتوکینین و در بذر آمل در مقادیر ۱ تا ۱/۵ میلی گرم بر لیتر سیتوکینین بیشترین باززایی را داشتند. در پژوهشی که Hayta و همکاران (۲۰۱۶) انجام دادند، نرخ بالای باززایی گیاهچه ها از کالوس را در مقادیر ۲ تا ۳ میلی گرم بر لیتر هورمون سیتوکینین TDZ گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر در بذر محلات همخوانی دارد (۶).

هایتا و همکاران (۲۰۱۶) پروتکل ریزازدیادی گونه *Primula*

نتیجه گیری

تدوین راهبردهای مؤثر حفاظتی و توسعه روشهای کشت پایدار این گونه ها تأکید دارد. ریزازدیادی به عنوان یک تکنیک مؤثر برای تولید تعداد زیادی گیاه از یک ریزغونه، ابزاری ارزشمند در حفاظت و کشت تجاری گونه های نادر محسوب می شود. از میان انواع مختلف ریزغونه ها، رأس ساقه و قطعات گره مؤثرترین گزینه ها برای ریزازدیادی معرفی شده اند

بسیاری از گونه های گیاهی نادر و در معرض خطر، دارای متابولیت های ثانویه ارزشمند با کاربردهای دارویی هستند. این ترکیبات زیست فعال (Bioactive compounds) اغلب نقش مهمی در سیستم های پزشکی سنتی دارند و از این رو، نشان دهنده اهمیت کشت بافت این گیاهان نیز می باشند. برخی از آنها به دلیل تخریب زیستگاه، برداشت بی رویه، یا تغییرات اقلیمی در آستانه انقراض قرار دارند. این شرایط بر ضرورت فوری

References

1. Okrslar V, Plaper I, Kovac M, Erjavec A, Obermajer T, Rebec A, et al. Saponins in tissue culture of *Primula veris* L. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*. 2007;43(6):644-51. doi:10.1007/s11627-007-9072-3.
2. Coumans M, Coumans-Gilles MF, Delhez J, Gaspar T. Mass propagation of *Primula obconica*. *Acta Hort*. 1979;(91):287-94. doi:10.17660/ActaHortic.1979.91.33.
3. Morozowska M, Cieszkowski A, Polskiego W. In vitro clonal propagation of *Primula veris* L. and preliminary phytochemical analysis. *Acta Biol Cracov Ser Bot*. 2004;46(2):169-75.
4. Ebrahimpour F, Eidizadeh K. *Medicinal Plants*. Tehran: Payamnoor Publisher; 2003.
5. Tütüncü M. In vitro culture of *Primula*: A review. *Int J Agric Nat Sci*. 2020;13(2):118-25.
6. Hayta S, Smedley MA, Li J, Harwood WA, Gilmartin PM. Plant Regeneration from Leaf-derived Callus Cultures of Primrose (*Primula vulgaris*). *HortScience*. 2016;51(5):558-62. doi:10.21273/HORTSCI.51.5.558.

7. Jedrzejczyk I, Morozowska M, Nowinska R, Jagodzinski AM. *Primula veris* plants derived from in vitro cultures and from seeds: genetic stability, morphology, and seed characteristics. *Turk J Bot.* 2016;42(4):412–22. **doi:10.3906/bot-1802-7.**
8. Wang MR, Bettoni JC, Zhang AL, Lu X, Zhang D, Wang QC. In Vitro Micrografting of Horticultural Plants: Method Development and the Use for Micropropagation. *Horticulturae.* 2022;8(7):576. **doi:10.3390/horticulturae8070576.**
9. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473–97. **doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.**
10. Chandravanshi M, Yashwant S, Agrawal A, Raja W. In vitro Micropropagation of Important Commercial Medicinal Plant: *Plumbago zeylanica*. *Adv Biol Res.* 2014;8(3):139–42. **doi:10.5829/idosi.abr.2014.8.3.81121.**
11. Sivakumar P, Chitra M, Sasikala K, Selvamurugan M, Karunakaran V. An Overview of Pharmaceutical Applications and In Vitro Micropropagation Techniques for Rare and Endangered Plant Specie. *J Adv Biol Biotechnol.* 2024;27(9):573–85. **doi:10.9734/jabb/2024/v27i91330.**
12. Noroozisharaf A, Hamidoghli Y, Zakizadeh H. In vitro seed germination and micropropagation of primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) an endemic endangered Iranian species via shoot tip explants. *Hortic Environ Biotechnol.* 2011;52(3):298–302. **doi:10.1007/s13580-011-0129-1.**
13. Benson EE, Danaher JE, Pimbley IM, Anderson CT, Wake JE, Daley S, et al. In vitro micropropagation of *Primula scotica*: A rare Scottish plant. *Biodivers Conserv.* 2000;9(6):711–26. **doi:10.1023/A:1008941726419.**
14. Noroozisharaf A, Hatamzadeh A, Samizadeh Lahiji H, Bakhshi D. Genetic diversity of endangered primrose (*Primula heterochroma* Stapf.) accessions from Iran revealed by ISSR and IRAP markers. *Sci Hortic.* 2015;190:173–8.