القای کالوس و باززایی گیاه اکیناسه (*Echinaceae purpurea* L.) با استفاده از کشت ریزنمونه ریشه

محسن محمدرضایی[1]، داود نادری[2*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، رشته علوم باغبانی دانشگاه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان). ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان) و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول: davidnaderi@gmail.com

چکیده

اکیناسه یا سرخارگل از جنبه دارویی و زینتی مورد توجه بوده و متعلق به تیره کاسنی می‌باشد. این گیاه از دیرباز تاکنون در درمان اکثر بیماری ها استفاده می شود. از آنجایی که طی تحقیقات انجام شده جوانه‌زنی بذور این گیاه بدلیل خواب آن، مشکل می‌باشد، یکی از اهداف این تحقیق، باززایی و تکثیر آن در محیط درون شیشه‌ای می‌باشد. جهت باززایی و کالوس‌زایی این گیاه، ریزنمونهریشه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل آمینوپورین BAP (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید NAA (صفر، ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تأثیر بر حجم کالوس و تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تأثیر بر تعداد شاخه تولیدی را داشتند.

کلمات کلیدی: اکیناسه، ریزازدیادی، کالوس، BAP، NAA

مقدمه

اکیناسه یا سرخارگل از دو جنبه‌ی دارویی و زینتی مورد توجه می‌باشد به طوری که در آمریکا سالانه بیش از ۳۰۰ میلیون دلار به فروش می‌رسد (O'Hara et al., 1998; World Health Organization 1999). به طور کلی این گیاه برای درمان سرماخوردگی، سرفه، برونشیت و التهاب دهان و فارنکس به کار می‌رود (Harbage, 2001). این گیاه طی تحقیقات انجام شده جوانه‌زنی آن بدلیل خواب، مشکل می‌باشد (Salac, 1982). اکیناسه یا سرخارگل با نام علمی *Echinaceae purpurea* (L.) Mounch، گیاهی علفی و چند ساله است. این گیاه متعلق به تیره کاسنی بوده و منشأ آن شمال آمریکا گزارش شده است. تا بحال ۴۰ ژنوتیپ مختلف اکیناسه مورد مطالعه قرار گرفته که ۹ گونه آن متمایز شده‌اند(Perry, 2001). یکی از اهداف این تحقیق، باززایی و تکثیر آن در محیط درون شیشه‌ای می‌باشد. به منظور افزایش شاخه‌زایی و باززایی گیاه اکیناسه سکیم و همکاران (SeKim, 2010) تحقیقی بر روی استفاده تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت این گیاه با ریزنمونه ساقه گیاه انجام دادند. در این آزمایش بیشترین شاخه‌زایی در محیط کشت MS[1] با استفاده از هورمون بنزیل آمینوپورین[2] (BAP) مشاهده شد. علاوه بر این تحقیقات دیگری نیز در مورد ترکیب بین اکسین و سیتوکنین در محیط کشت بافت اکیناسه انجام شده که به این نتیجه رسیدند، مقادیر پایین نفتالین استیک اسید[3] (NAA) در ترکیب BAP برای القای کالوس و پرآوری و تمایز شاخه از کالوس مناسب است (Lisowska & Wysokinska, 2000; Pereira et al, 2000; Pretto & Santarém, 2000).

مواد و روش‌ها

منظور جهت سترون کردن بذور، از ترکیبی از چند ماده استریل کننده شامل پراکسید هیدروژن ۰/۳ درصد، توین ۸۰، الکل ۷۰ درصد و هیپوکلرید ۵ درصد استفاده شد. سپس بذرها با رعایت کامل شرایط استریل، در محیط کشت ½MS حاوی ماده ژله

1 - Murashige and Skoog
2 - 6-Benzylaminopurine
3 - α-naphtalene acetic acid

کننده آگار به میزان ۰/۸ درصد استریل و ۳۰ گرم شکر در لیتر قرار داده شد و pH محیط کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. سپس بذرها جهت رشد و ایجاد دانهال در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از رشد کافی بذور جهت تهیه ریزنمونه، ریزنمونه‌های ریشه در محیط‌های کشت موراشیک و اسکوگ (MS) حاوی ترکیبات هورمونی بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین استیک اسید کشت داده شدند. در این تحقیق ترکیبی از چهار سطح هورمون بنزیل‌آمینوپورین به میزان صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و چهار سطح هورمون نفتالین استیک اسید به میزان صفر، ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شدند. قابل ذکر است که هر سه هفته یکبار واکشت جهت تراوایی نمونه‌ها انجام شد و پس از ۵۰ روز از کشت ریزنمونه‌ها، ثبت اطلاعات لازم انجام شد. جهت تعیین حجم کالوس، کالوس‌ها را از نظر حجم به ۵ دسته تقسیم شدند: ۱: مقدار کم کالوس، بعضاً حاشیه‌های ریزنمونه مقدار کالوس کم تشکیل شده/ ۲: مقدار نسبتاً کم کالوس/ ۳: مقدار متوسط کالوس/ ۴: مقدار و حجم نسبتاً زیاد کالوس/ ۵: مقدار بسیار زیاد و حجیم کالوس. رتبه بندی با این پنج شماره صورت پذیرفت و این صفات کیفی به صورت کمی مورد آنالیز آماری قرار گرفت. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار اجراء گردید. داده‌های مورد اندازه گیری پس از ثبت با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین اثرات اصلی به وسیله آزمون حداقل اختلاف معنی داری[1] و مقایسه میانگین اثرات متقابل با استفاده از آزمون حداقل مربعات میانگین‌ها[2] در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج تجزیه واریانس حجم کالوس و تعداد شاخه طبق جدول (۱)، اثر ساده هورمون‌های بنزیل آمینوپورین و نفتالین استیک اسید و همچنین اثرات متقابل هورمون‌های بنزیل آمینوپورین و نفتالین استیک اسید بر صفت حجم کالوس در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شد.

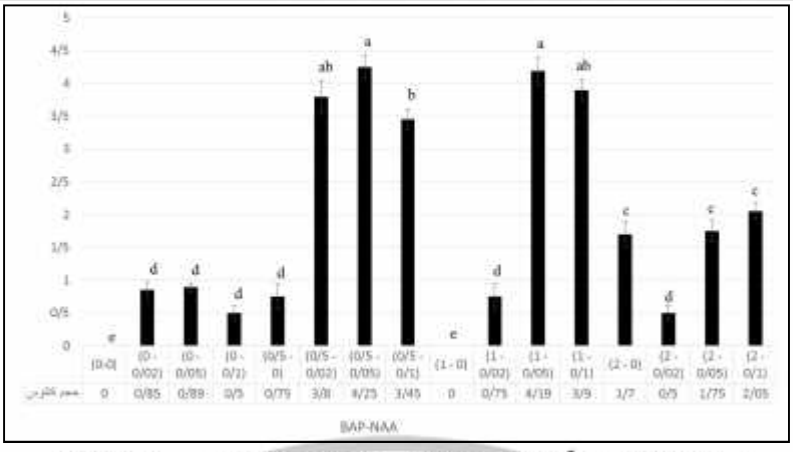
جدول (۱) نتایج تجزیه واریانس تعداد شاخه و حجم کالوس

اثرات اصلی	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخه	حجم کالوس
بنزیل آمینوپورین	۳	۱۲/۸۴۴***	۷۹/۲۵۲***
نفتالین استیک اسید	۳	۱۱/۵۵۱***	۳۶/۱۰۵***
بنزیل آمینوپورین × نفتالین استیک اسید	۶	۱۲/۸۷۷***	۴۹/۳۷۱***
خطای آزمایشی	۳۰۷	۱/۰۰۳	۰/۵۱۸
کل	۳۱۹		

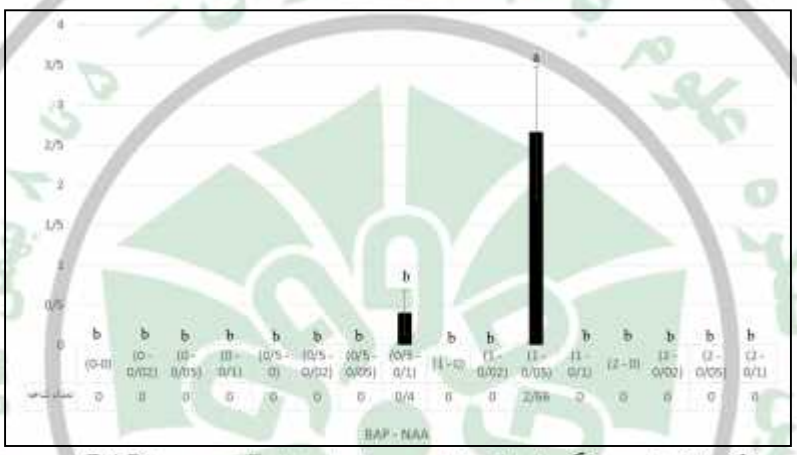
***: معنی داری در حد ۰/۰۱

با نگاه به جدول (۱) مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون‌های بنزیل آمینوپورین و نفتالین استیک اسید بر صفت حجم کالوس قابل مشاهده است. تیمارهای هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱ میلی‌گرم در لیتر در ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر دارای بالاترین تأثیر شدند ولی نسبت یکدیگر در سطح ۵ درصد معنی دار نشدند. همچنین طبق شکل (۲) تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر در ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را بر صفت تعداد شاخه گذاشت و نسبت به دیگر ترکیبات هورمونی در سطح ۵ درصد معنی دار شد. دیگر مقادیر این هورمون نسبت به یکدیگر در سطح ۵ درصد معنی دار نشدند.

1 - Least Significant Deffrences (LSD)
2 - Least Squares Means (LS Means)



شکل (۱) مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون های بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) بر روی حجم کالوس



شکل (۲) مقایسه میانگین اثرات متقابل هورمون های بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) بر روی تعداد شاخه

شکل (۳) کالوس و کالوس باززایی شده

نظر به اینکه محیط کشت انتخابی برای عملیات کشت بافت گیاه اکیناسه در این تحقیق MS بود و دیگر محققین نیز (Koroch et al, 2002 & 2003; Lata et al, 2004; Lucchesini et al, 2009; Sauve et al, 2004; SeKim et al, 2010; Zobayed & Saxena, 2003) از این نوع محیط کشت استفاده کردند می‌توان به اهمیت این نوع محیط کشت برای کالوس‌زایی و باززایی پی برد. در بیشتر مطالعات و بررسی‌های محققین حضور BAP در محیط کشت لازمه اندام‌زایی و تکثیر تمام گونه‌های گیاه اکیناسه است (Choffe et al, 2000a 2000b; Harbage, 2001; Coroch et al, 2003; Mechanda et al, 2003). همچنین در مطالعات کنونی دانشمندان، طیفی از ریزنمونه‌ها و جمعیت متنوع گیاهان، با محیط کشت حاوی BAP، به تنهایی و یا در ترکیب با دیگر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، باعث القاء پرآوری در گیاه *E.purpurea* می‌شود (Choffe et al, 2000a; Jones et al, 2007; Murch et al, 2006; Zobayed & Saxena, 2003) نتایج تحقیقات این دانشمندان به دلیل استفاده از هورمون BAP و عملکرد آن

یعنی شاخه‌زایی و پرآوری بر روی گیاهان گونه *E.purpurea* با نتایجی که در این تحقیق گرفته شد مطابقت داشت. همچنین تحقیقات دیگری نیز در مورد ترکیب بین اکسین و سیتوکنین در گونه‌های دیگر انجام شده است، که به این نتیجه رسیدند، مقادیر پایین NAA در ترکیب BAP برای القای کالوس و پرآوری و تمایز شاخه از کالوس مناسب است(Lisowska & Wysokinska, 2000; Pereira et al, 2000; Pretto & Santarém, 2000). هاربرگ (Harbage, 2011) در تحقیقی که در مورد ریزازدیادی ریزنمونه‌های ساقه و بذر سه گونه از گیاه اکیناسه *E.angustifolia* و *E.pallida* و *E.purpurea* انجام داد، به این پاسخ دست یافتند که اضافه کردن BAP به محیط کشت این گونه‌ها باعث شاخه‌زایی شده و از رشد ریشه جلوگیری به عمل می‌آورد.که این نتایج با نتایج این تحقیق همخوانی داشت.

منابع

1. Choffe. K.L., Murch. S.J., Saxena. P.K. 2000. Regeneration of *Echinacea purpurea*: induction of root organogenesis from hypocotyls and cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62: 227–234.
2. Choffe. K.L., Victor. R.M.J., Murch. S.J., Saxena. P.K. 2000. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* L.: direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 36(1): 30–36.
3. Gruenwald. J, Brcndler. T., Jaenicke. C(Eds.).1998. PDR for Herbal Medicines. Medical Economics Co. Montvale, NJ.
4. Harbage. J.F. 2001. Micropropagation of *Echinacea angustifolia, E.pallida,* and *E.purpurea* from Stem and Seed Explants. Hortscience. 36(2):360–364.
5. Jones. M.P.A., Yi. Z., Murch. S.J., Saxena. P.K. 2007. Thidiazuroninduced regeneration of *Echinacea purpurea* L. micropropagation in solid and liquid culture systems. Plant Cell Reports. 26(1):13–19.
6. Koroch. A.R., Juilani. R., Kapteyn .J.H., Simon. J.E. 2002. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69(1): 79–83.
7. Koroch. A.R., Kapteyn. J.H., Juilani. R., Simon J.E. 2003. In vitro regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 39(4):415–418.
8. Lata. H., Bedir. E., Moraes. R.M., Andrade. Z. 2004. Mass Propagation of *Echinacea angustifolia*: A Protocol Refinement using Shoot Encapsulation and Temporary Immersion Liquid System. Acta Horticulturae (ISHS). 629:409-414.
9. Lisowska. K., Wysokinska. H. 2000. In vitro propagation of Catalpa ovata G. Don. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60: 171–176.
10. Lucchesini. M., Bertoli. A., Mensuali-Sodi. A., Pistelli. L. 2009. Establishment of in vitro tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. Scientia Horticulturae. 122(3) : 484–490.
11. Mechanda. S.M., Baum. B.R., Johnson. D.A., Arnason. JT. 2003. Direct shoot regeneration from leaf segments of mature plants of *Echinacea purpurea* (L.) moench. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 39(5):505–509.
12. Murch. S.J., Peiris. S.E., Shi. W.L., Zobayed. S.M.A., Saxena. P.K. 2006. Genetic diversity in seed populations of *Echinacea purpurea* controls the capacity for regeneration, route of morphogenesis and phytochemical composition. Plant Cell Reports. 25(6):522–532.
13. O'Hara. M., Kiefer. D., Farrell. K., Kemper. K. 1998. A review of 12 commonly used medicinal herbs. Archives of Family Medicine. 7(6):523-36.
14. Pereira. A.M., Bertoni. BW., Appezzato-da-Glória. B., Araujo. ARB., Januário AH, Lourenco. MV., Franca. SC. 2000. Micropropagation of *Pothomorphe umbellate* via direct organogenesis from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60(1): 47–53.
15. Perry. B., Burges. E., Glennie. V. 2001. *Echinacea* standardization: analytical methods for henolic compounds and typical levels in medicinal species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(4):1702–1706.
16. Pretto. FR., Santarém. ER .2000. Callus formation and regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62(2):107–113.

17. Salac. S.S., J.M. Traeger., P.N. Jenson. 1982. Seeding dates and field establishment of wildflowers. HortScience. 17:805-806.

18. Sauve. R.J., Mmbaga. M.T., Zhou. S. 2004. In Vitro regeneration of the Tennessee coneflower (*Echinacea tennesseensis*). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 40(3):325–328.

19. SeKim. J., YoungLee. S., HyunEom. S., UnPark. S. 2010. Improved shoot organogenesis and plant regeneration of *Echinacea angustifolia* DC. Journal of Medicinal Plants Research. 4(7): 587-591.

20. World Health Organization. 1999. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 1. Geneve, pp: 136 - 44.

21. Zobayed. S.M.A., Saxena. P. K. 2003. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Enhancement of somatic embryogenesis by indolebutyric acid and dark pre-incubation. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 39(6): 605-612

Callus Induction and Plant Regeneration from ConeFlower (*Echinacea purpurea*) by Root Culture

M. MohammadRezaei[1], D. Naderi[2*]

1- MSc. Student, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. 2- Young Researchers Club, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

*Corresponding author: davidnaderi@gmail.com

Abstract

Echinacea is well-known for both, its medicinal and ornamental properties and is owned by a Asteraceae family. This plant has long been used in the treatment of many diseases. Studies have proven that the germination of Echinacea seeds is difficult because of its dormancy. The current study was aimed at regeneration and proliferation of Echinacea seeds using in vitro environment. To induce callus and plant regeneration root tissue explants were placed on Murashige and Skoog medium supplemented with various levels of 6-benzylaminopurine, BAP (0, 0.5, 1 and 2 mg/lit) and naphthaleneacetic acid, NAA (0, 0.02, 0.05 and 0.1 mg/lit) combinations. The results showed that the hormonal treatment with 0.5 mg/lit BAP and 0.05 mg/lit NAA and 1 mg/lit BAP and 0.05 mg/lit NAA had the greatest impact on callus volume. In addition, the hormonal treatment with 1 mg/lit BAP and 0.05 mg/lit NAA had the greatest impact on plant regeneration.

Key words: Echinacea, Callus, Micropropagation, BAP, NAA