اثر تیمارهای مختلف بر کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)

محدثه حجازی[۱]، مریم دهستانی اردکانی*[۲]، کاظم کمالی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان

[۲*]استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد، ایران.

[۳]استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد، یزد، ایران.

نویسنده مسئول: mdehestani@ardakan.ac.ir

چکیده

گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) متعلق به خانواده آستراسه بوده و در طب سنتی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. به منظور بهینه سازی کشت بافت این گیاه، در پژوهش حاضر اثر سطوح مختلف BA (۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱، ۰/۲و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها بر میزان تشکیل کالوس و باززایی نمونه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که اثر BA، NAA و اثر متقابل آنها بر میزان تولید کالوس معنی‌دار نبود و در تمام تیمارها کالوس‌زایی اتفاق افتاد. رنگ کالوس در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA سبز تیره و در بقیه تیمارها سبز یشمی بود. بیشترین تعداد برگ در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و نیز ۳ میلی-گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل شد.

کلمات کلیدی: باززایی، بنزیل آدنین، سرخارگل، نفتالین استیک اسید، کالوس

مقدمه

سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) یک گیاه داروئی محبوب در سراسر دنیا (Barrett, 2003) و یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای توسعه یافته است (Kim *et al*., 2010). این گیاه به عنوان یک داروی موثر در پیشگیری و درمان بسیاری از امراض همچون سرماخوردگی، آنفولانزا، عفونت‌ها و التهابات پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nilanthi *et al*., 2009). تلاش‌های بیوتکنولوژیکی فراوانی از طریق انتقال ژن (Wang and To, 2004)، کشت بساک (Zhao *et al*., 2006) و دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها (Nilanthi *et al*., 2009) جهت بهبود خصوصیات گیاه صورت گرفته است. قبل از همه این تلاش‌ها باززایی جوانه‌های نابجا از کشت‌ها یک مرحله پیش نیاز است. اگرچه گزارش‌های زیادی در مورد باززایی جوانه‌های نابجا در سرخارگل وجود دارد (Koroch *et al*., 2002)، تفاوت‌های معنی‌داری در ظرفیت باززایی ژنوتیپ‌های مختلف نیز تشخیص داده شده است (Li *et al*., 2013). پیشنهاد می‌شود که پیشرفت‌های بیشتری در زمینه تکنیک‌های کشت باززایی درون شیشه‌ای لازم است.

زبرجدی و همکاران (۱۳۹۲) در آزمایشی ریز ازدیادی گیاه دارویی سرخارگل را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تجزیه واریانس برای صفات کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین برخی از عوامل مورد مطالعه بود. بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه لپه و با تیمار ترکیبی ۰/۲ میلی‌گرم در لیترBAP و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA به میزان ۹۱ درصد بود. تیمار ۰/۴ میلی‌گرم در لیترBAP با میانگین ۵/۳ نوساقه در هر ریزنمونه بیشترین درصد باززایی نوساقه را به ترتیب در ریزنمونه‌های کوتیلدون و لپه داشت.

آقایی و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیقی پرآوری سرخارگل را بررسی نمودند. در این آزمایش ریزنمونه‌ها از تک جوانه‌های جانبی تهیه و روی محیط کشت MS حاوی هورمون‌های باززایی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP به علاوه مقدار کم IBA اثر مثبتی روی باززایی داشته است و با افزایش غلظت IBA از میزان باززایی کاسته می‌شود.

Zayova و همکاران (۲۰۱۲) ایجاد نوساقه در گیاه سرخارگل را بررسی نمودند. بیشترین میزان باززایی در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد.

IrHC2019

هدف از این تحقیق دست یافتن به شرایط بهینه به منظور انجام عمل باززایی در گیاه دارویی سرخارگل بود.

مواد و روش‌ها

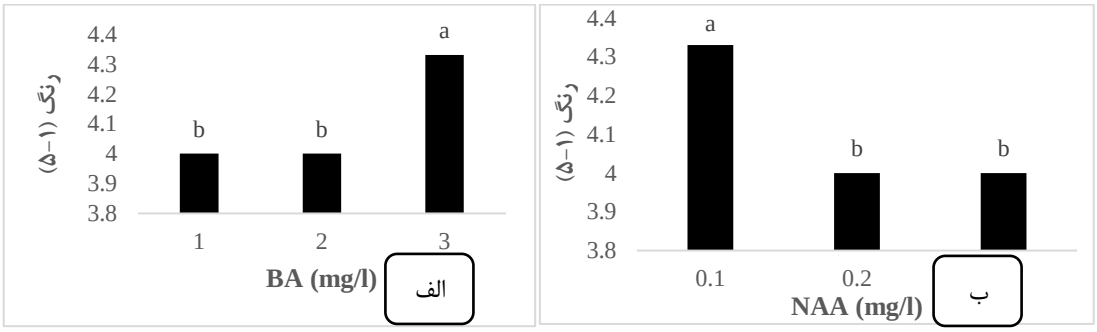
این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه اردکان انجام شد. جهت انجام آزمایش ابتدا بذور گیاه دارویی سرخارگل با استفاده از آب مقطر استریل شست و شو داده شد، سپس به محلول حاوی ۰/۰۵ درصد اسید سیتریک + ۰/۱ درصد کلرید جیوه استریل منتقل و به مدت سه دقیقه ضدعفونی گردید و در نهایت به محلول اسید سیتریک ۰/۰۵٪ منتقل و به مدت سه دقیقه در آن قرار داده شد. محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تهیه شد و pH آن روی ۵/۷ تنظیم و به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. برای کشت نمونه‌ها از شیشه‌های مربایی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر شش سانتی‌متر استفاده شد و درون هر شیشه سه عدد بذر قرار گرفت. پس از کشت شیشه‌ها در اتاقک رشد با دوره نوری ۸: ۱۶ ساعت تاریکی/روشنایی، دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در دوره روشنایی و ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد در دوره تاریکی و شدت نور ۲۵۰۰ تا ۳۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. در این آزمایش اثر سطوح مختلف BA (۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۱، ۰/۲و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار ترکیبی آنها بر میزان تشکیل کالوس و باززایی نمونه‌ها بررسی شد. جهت کشت پس از جوانه‌زنی بذر از قطعات کوچک برگ‌ها استفاده شد. سه هفته پس از کشت درصد تکشیل کالوس و رنگ آنها اندازه‌گیری شد. پس از باززایی کالوس‌ها تعداد برگ اندازه‌گیری شد. میزان رنگ بر مبنای درجه بندی از ۱ تا ۵ صورت گرفت. کمترین میزان آن رنگ سفید و بیشترین میزان سبز تیره بود. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. داده‌ها با نرم افزار SAS آنالیز شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر BA، NAA و اثر متقابل آنها بر میزان تولید کالوس معنی‌دار نبود (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصله در تمام تیمارها کالوس‌زایی اتفاق افتاد. بر اساس جدول تجزیه واریانس اثر BA، NAA و اثر متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد بر رنگ کالوس معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان رنگ کالوس (۴/۳۳ برابر با سبز تیره) در سطح تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر BA (شکل ۱ الف) و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (شکل ۱-ب) و نیز تیمار ترکیبی آنها (شکل ۲) به‌دست آمد. سایر تیمارها رنگ سبز یشمی نشان دادند.

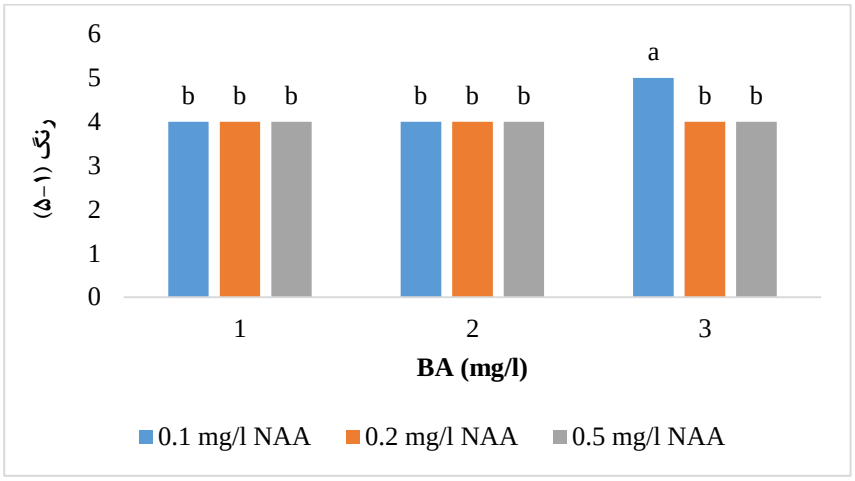
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر BA، NAA و اثر متقابل آنها بر رنگ و درصد کالوس‌زایی و تعداد برگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی	رنگ کالوس	تعداد برگ
BA	۲	۴۲/۸۱^{ns}	۰/۳۳**	۵۱/۵۹^{ns}
NAA	۲	۴۲/۸۱^{ns}	۰/۳۳**	۱۳/۵۹^{ns}
BA*NAA	۴	۱۰۷/۰۳^{ns}	۰/۳۳**	۹۱/۲۰*
CV%		۱۸/۹۸	۰	۲۵/۲۴

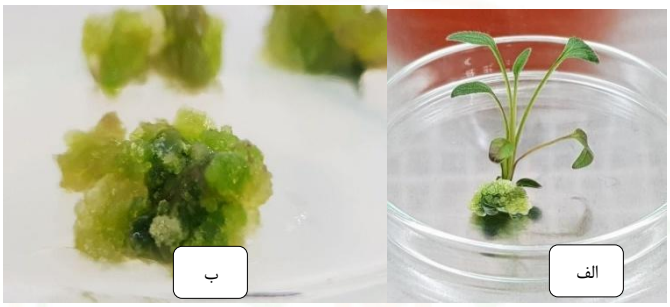


شکل ۱- اثر سطوح مختلف الف) BA و ب) NAA بر رنگ کالوس

IrHC2019

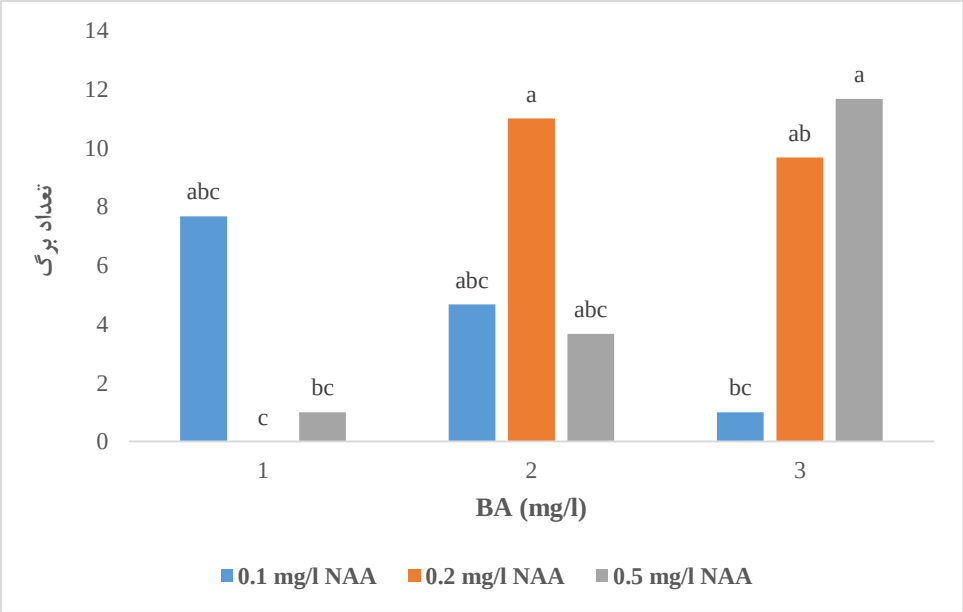


شکل ۲- اثر متقابل BA و NAA بر رنگ کالوس



شکل ۳- نمونه‌ای الف) کالوس‌زایی و ب) باززایی کالوس از گیاه دارویی سرخارگل

بر اساس نتایج بیشترین تعداد برگ در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل شد. باززایی در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA اتفاق نیفتاد (شکل ۳-ب و ۴). نتایج حاصله با زبرجدی و همکاران (۱۳۹۳) مطابقت داشت.



شکل ۴- اثر متقابل BA و NAA بر تعداد برگ

IrHC2019

منابع

آقایی، خ.، جبار زاده، ز.، جلیل دوست، پ و صبحی، س. ۱۳۹۰. تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر پرآوری گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در شرایط درون شیشه ای. هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران .

زبرجدی، ع.، معتمدی، م.، طراوت، ا و اسماعیلی، ا. ۱۳۹۲. ریز ازدیادی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) با استفاده از قطعات کوتیلدون و هیپوکوتیل. مجله پژوهش های گیاهی. ۲۶ (۳).

Barrett, B. 2003. Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review, *Phytomedicine*, 10 (1): 66–86.

Wang, H.M. and To, K.Y. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*," Plant Science, 166 (4) 1087–1096.

Zhao, F.C., Nilanthi, D., Yang, Y.S. and Wu, H. 2006. Anther culture and haploid plant regeneration in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86 (1) 55–62.

Nilanthi, D., Chen, X.L., Zhao, F.C., Yang, Y.S. and Wu, H. 2009. "Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L," Journal of Biomedicine and Biotechnology,. 2009,Article ID 343485, 7 pages, 2009.

Koroch, A., Juliani, H.R., Kapteyn, J. and Simon, J.E. 2002. "*In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69 (1): 79–83.

Li, Q., Chen, R., Chen, X., Yang, Y. and Wu, H. 2013. Estimation of the cloning potential in six selected genotypes of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.), Biotechnology and Biotechnological Equipment, 27 (4) 3911–3917.

Effect of different treatments on callus formation of medicinal plant of *Echinacea purpurea* L.

Mohadese Hejazi[1], Maryam Dehestani Ardakani[2*], Kazem Kamali[3]
[1]MSc. Student, Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Yazd, Iran
[2*]Assistant Prof., Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Yazd, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran
[*]*Corresponding Author: mdehestani@ardakan.ac.ir*

Abstract
Echinacea purpurea L. belongs to the family Asteraceae, and has been used extensively in medicinal preparations for the treatments of many diseases. For optimization of tissue culture of this plant, in this research, the effect of different levels of BA (1, 2, 3 mg/l), NAA (0.1, 0.2, 0.3 mg/l) and their combination on callus formation and their regeneration were investigated. Results showed that BA, NAA and their combination did not show significant effect on callus formation and all treatments produced callus. Color of callus in 3 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA was dark green and in other treatment was green. The maximum number of leaves was obtained in in 2 mg/l BA + 0.2 mg/l NAA and in 3 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA.

Keywords: Regeneration, BA, Coneflower, NAA, Callus

IrHC2019