اثر نیترات آمونیم بر القای ریشه نابجا در گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)

ندا رضائی[۱]، محمد عبدلی*[۲]، آرش بابایی[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد رشته تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر
[۲*]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر
[۳]استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر
*نویسنده مسئول: Abdoli_m@malayeru.ac.ir

چکیده:

سالهاست که در طب سنتی از گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) به منظور پیشگیری و درمان طیف گسترده ای از بیماری‌ها از قبیل سرماخوردگی معمولی، درمان سرفه، عفونت‌های ریوی، اختلالات جلدی و حتی بیماری های مزمن ناشی از نقص ایمنی استفاده می شود. دوره رشد طولانی مدت و محدودیت های محیطی، تولید دارو از گیاه سرخارگل را مشکل ساخته است. کشت ریشه‌های نابجا می تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای تولید متابولیت های ارزشمند ثانویه باشد. در این پژوهش، در راستای بهینه کردن شرایط القای ریشه نابجا در سرخارگل، اثر کاهش میزان نیترات آمونیم محیط کشت پایه MS (۱، ۳/۴، ۲/۴، ۰،۱/۴) بر روی ریزنمونه های برگ با طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار بررسی شد. بعد از چهار هفته، صفات درصد القای ریشه نابجا و متوسط تعداد ریشه های نابجا یادداشت شدند. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد القای ریشه نابجا به طور بسیار معنی داری تحت تاثیر میزان نیترات آمونیم محیط کشت MS می باشد. بیشترین درصد القای ریشه نابجا (۸۲٪) مربوط به تیمار با میزان $۳/۴NH_4NO_3$ در محیط کشت MS بود. همچنین بیشترین متوسط تعداد ریشه نابجا در ریزنمونه های کشت شده (۴/۳۵) در تیمار حاوی میزان $۱/۴NH_4NO_3$ در محیط کشت MS بدست آمد.

کلمات کلیدی: درون شیشه ای، ریشه نابجا، سرخارگل، نیترات آمونیم

مقدمه

انسان‌ها از دیرباز از گیاهان دارویی به عنوان غذا، طعم دهنده، درمان بیماری‌ها و کاربردهای دیگر استفاده می‌نموده اند. آثار درمانی و موارد استفاده گیاهان دارویی بر کسی پوشیده نیست. امروزه استفاده از گیاهان دارویی در جهان رو به افزایش می‌باشد و حدود ۸۰ درصد از مردم جهان در حال حاضر بطور مستقیم و یا غیر مسقیم از گیاهان دارویی استفاده می کنند. تقریباً یک چهارم داروهای تولید شده، حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به دست آمده‌اند (Tripathi and Tripathi, 2003). گزارش‌ها نشان می‌دهند که ۱۱٪ از ۲۵۲ دارویی که توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان داروهای بنیادی و ضروری مطرح شده‌اند، منحصراً از گیاهان مشتق شده‌اند. امروزه، داروهای گیاهی در کشورهای غربی ارزش اقتصادی و تجاری بسیار زیادی دارند به طوری که در آمریکا تجویز داروهایی با منشاء گیاهی در سال ۲۰۰۲، ارزشی بالغ بر ۳۰ میلیارد دلار داشته است (Namdeo, 2007). سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.)، گیاهی علفی و چند ساله می‌باشد که برای صدها سال به عنوان گیاهی دارویی استفاده شده است (Wang and To, 2004). این گیاه، یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای توسعه یافته است و از نظر موارد مصرف در ایالات متحده آمریکا و اروپا، دومین رتبه را بین گیاهان دارویی دارد (Kayser and Quax, 2007)، به طوری که حدود ۱۰٪ تجارت مکمل‌های دارویی را به خود اختصاص داده است (Romero *et al.*, 2009). فروش سالانه‌ی فرآورده‌های گیاه سرخارگل در آمریکا، ۳۰۰ میلیون دلار و در کانادا ۲۵ میلیون دلار می‌باشد. طبق تحقیق پایگاه اطلاعات فرآورده‌های

طبیعی، ۲۱۶ ماده موثره با خواص دارویی در سرخارگل وجود دارد (Murch *et al.*, 2006). 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). گیاه داروئی سرخاگل، حاوی مشتقات اسید کافئیک یعنی کافئیک اسید، اسید کلروژنیک و اسید شیکوریک، کربوهیدرات ها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، الکلآمیدها (آلکامیدها) و پلی اتیلنها می باشد. اسید شیکوریک به عنوان یکی از مهمترین مواد موثره این گیاه، خاصیت ضد ویروسی، آنتی اکسیدان و تقویت‌کنندگی سیستم دفاعی بدن داشته و از تکثیر ویروس ایدز جلوگیری می‌کند (Abbasi *et al.*, 2007). در حال حاضر گیاه سرخارگل به طور گسترده ای در بسیاری از کشورها و همچنین منطقه شمال آمریکا که از آن سرچشمه می گیرد، کشت می شود (Chen *et al.*, 2016). در سال‌های اخیر، نیاز جهانی برای فرآورده‌های حاصل از گیاه دارویی سرخارگل به خاطر خطر بیماری‌های واگیردار ویروسی به شدت افزایش یافته است. تولید اقتصادی گیاه سرخارگل به خاطر عواملی از جمله آلودگی مواد گیاهی با حشرات، قارچ‌ها، باکتری‌ها و خاک، تغییر در میزان ترکیبات فعال از گیاهی به گیاه دیگر و از سالی به سال دیگر، فقدان مواد گیاهی خالص و استاندارد برای آنالیزهای بیوشیمیایی، طولانی بودن دوره رشد و نیز مشکلات برداشت ریشه، با مشکل مواجه می‌باشد (Abbasi *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2009). بنابراین میزان تولید آنها اقتصادی نبوده و ضرورت دارد که برای تولید سریع و انبوه آنها، از فنون کشت بافت گیاهی به طور بهینه استفاده گردد. در این تحقیق، اثر میزان نیترات آمونیم بر القای ریشه نابجا در سرخارگل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، کشت بذرهای سرخارگل (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) در شرایط درون شیشه‌ای و در اتاق کشت با شرایط کنترل شده در آزمایشگاه سلولی- مولکولی واقع در دانشکده علوم پایه دانشگاه ملایر، انجام شد. ابتدا بذور با یک قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شدند. در مرحله بعد بذور به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. سپس بذرها در زیر هود لامینار به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در مرحله بعد بذور در هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند و در مرحله آخر سه مرتبه هر بار به مدت پنج دقیقه مورد آبشویی قرار گرفتند. بذور استریل شده در محیط کشت جامد 1/2MS حاوی۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH= ۵/۸ در شرایط استریل کشت شدند. شرایط اتاق کشت با دمای۲± ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی برای جوانه زنی بذرها در نظر گرفته شد. برای جوانه زنی بذور و تولید گیاهچه های استریل از شیشه هایی با ارتفاع ۸ سانتی متر حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت استفاده شد و در هر شیشه ۱۵ عدد بذر کشت شد. در این تحقیق از طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار شامل پنج ریزنمونه برگ در یک پتری دیش) استفاده شد و اثر کاهش میزان نیترات آمونیم محیط کشت پایه MS (۱، ۳/۴، ۲/۴، ۰،۱/۴) بر القای ریشه نابجا از ریزنمونه های برگ گیاهچه های دو ماهه سرخارگل مورد بررسی قرار گرفت. این محیط های کشت، حاوی ۱ میلی گرم در لیتر هورمون NAA بودند. بعد از چهار هفته، صفات درصد القای ریشه نابجا، متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌هایی که کشت شدند و متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌هایی که تولید ریشه نابجا نمودند، یادداشت شدند. جهت تجزیه و تحلیل های آماری، از نرم افزار SPSS 21 استفاده شد و مقایسه میانگین ها با روش دانکن انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اختلاف بسیار معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بین تیمارهای این تحقیق وجود دارد و بعبارت دیگر در سرخارگل، صفات درصد القای ریشه نابجا و متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌هایی که تولید ریشه نابجا نمودند، به طور بسیار معنی داری تحت تاثیر میزان نیترات آمونیم موجود در محیط کشت MS می

IrHC2019

باشند؛ ولی متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌هایی که کشت شدند تحت تیمارهای مذکور در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی داری ندارند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه نابجا (۸۲٪) مربوط به تیمار با میزان ۳/۴NH_4NO_3 در محیط کشت MS بود و با کاهش میزان NH_4NO_3 در محیط کشت MS، درصد القای ریشه نابجا در ریزنمونه برگ سرخارگل کاهش یافت تا جایی که با حذف NH_4NO_3 درصد القای ریشه نابجا به ۲۸٪ رسید (جدول ۱). همچنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین متوسط تعداد ریشه نابجا در ریزنمونه های کشت شده (۴/۳۵) در تیمار حاوی میزان ۱/۴NH_4NO_3 در محیط کشت MS بدست آمده است. نتایج بررسی صفت متوسط تعداد ریشه نابجا در ریزنمونه های برگ ریشه دار شده نشان داد که بیشترین متوسط تعداد ریشه نابجا در میزان صفر و یک چهارم NH_4NO_3 در محیط کشت MS (بترتیب تعداد ۷/۳۷ و ۶/۲۵ عدد) است. بر اساس تحقیق صورت گرفته روی سیب، نشان داده شد که کاهش بیشتر سطح NH_4NO_3 از ۱/۴ به صفر به طور قابل توجهی باعث کاهش درصد ریشه زایی در رقم گالای سیب شد (Sriskandarajah *et al.*,1990). در واقع این آزمایش نشان می دهد که با کاهش NH_4NO_3 به ۱/۴، میزان القای ریشه نابجا افزایش می یابد و با حذف کامل NH_4NO_3 میزان درصد القای ریشه نابجا به حداقل می رسد ولی متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌هایی که ریشه نابجا تولید نمودند افزایش می یابد. بنابراین ۱/۴ مقدار NH_4NO_3 در محیط کشت پایه MS برای القای ریشه نابجای سرخارگل توصیه می گردد.

جدول (۱) مقایسه میانگین اثر میزان نیترات آمونیم در محیط کشت پایه MS بر القای ریشه‌های نابجا در سرخارگل

میزان نیترات آمونیم در محیط کشت پایه MS	میانگین		
	درصد القای ریشه نابجا	متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه‌های کشت شده	متوسط تعداد ریشه‌های نابجا در ریزنمونه-هایی که ریشه نابجا تولید نمودند
۱	۴۰bc	۱/۸۰ b	۵/۰۰ abc
۳/۴	۸۲ a	۳/۰۷ ab	۳/۶۵ bc
۲/۴	۳۵ c	۲/۱۵ ab	۲/۵۰ c
۱/۴	۶۰ab	۴/۳۵ a	۶/۲۵ ab
۰	۲۸ c	۱/۸۴ b	۷/۳۷ a
آزمون F	**	ns	**

** و ns بترتیب دارای تفاوت بسیار معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و عدم وجود تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵٪

شکل (۱) القای ریشه نابجا در برگ های گیاه دو ماهه سرخارگل در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر هورمون نفتالین استیک اسید

IrHC2019

منابع

Abbasi, B. H., Tian, C. L., Murch, S. J., Sabena, P. K. and Liu, C. Z. 2007. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. Plant Cell Report, 26: 1367–1372.

Chen, R., Yang, Y., Wu, H. 2016. A comparative study on rooting of *in vitro* regenerated shoots in haploid diploid and tetraploid purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Biotechnology and Biotechnological Equipment, 44-48.

Kayser, O. and Quax, W. J. 2007. Medicinal plant biotechnology from basic research to industrial applications. Weinheim: Wiley-VCH Press, Germany.

Murch, S. J., Peiris, S. E., Shi, W. L., Zobayed, S. M. A. and 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: 522–532.

Namdeo, A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacological Reviews, 1: 69-79.

Nilanthi, D., Chen, X., Zhao, F., Yang, Y. and Wu, H. 2009. Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. Journal of Biomedicine and Biotechnology, doi:10.1155/2009 /343485.

Romero, F. R., Delate, K., Kraus, G. A., Solco, A. K., Murphy, P. A. and Hannapel, D. J. 2009. Alkamide production from hairy root cultures of *Echinacea*. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 45: 599-609.

Sriskandarajah, S., Skirvin, R. M., Abu-Qaoud, H. 1990. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21(2): 185-189.

Tripathi, L. and Tripathi, J. N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.

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

Effect of Ammonium nitrate on Adventitious Root Induction in Coneflower

Neda Rezai[1], Mohammad Abdoli [*2], Arash Babaei [3]

[1] MSc in Plant Production, Faculty of Agriculture, Malayer University
[2*]Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Malayer University
Corresponding author: Abdoli_m@malayeru.ac.ir

Abstract

Coneflower (*Echinacea purpurea* L.) has long been used in traditional medicine to prevent and treat a wide range of diseases like common cold, simple cough, pulmonary infections, dermatologic disorder and even chronic diseases due to immunodeficiency. Prolonged growth and environmental constraints have made it difficult drug manufacturing. Adventitious root induction can be used as an alternative to the production of secondary metabolites. In this study, in order to optimize the conditions for adventitious root induction in *Echinacea purpurea*, the effect of reducing the amount of ammonium nitrate in the MS medium (0, 1/4, 2/4, 3/4, 1) on leaf explants, with a completely randomized design with four replications was investigated. After four weeks, the traits of the percentage of root induction and the mean number of adventitious root was recorded. The results of the analysis of variance showed that induction of adventitious root was significantly affected by the amount of ammonium nitrate in the MS medium. The highest percentage of adventitious root induction (82%) was observed in the treatment with 3/4 NH_4NO_3 in MS medium. Also, the results showed that the highest mean number of adventitious roots (4.35) was obtained in the treatment containing 1/4 NH_4NO_3 in MS medium.

***Keywords*: *In vitro*,** Adventitious Root, *Echinacea purpurea*, Ammonium nitrate

IrHC2019

IrHC2019