DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109715

دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۳، شماره ۱، صفحه ۱۱۱-۱۰۳ (۱۳۹۶)

بررسی تأثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی، باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه و ریشه‌زایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea angustifolia* DC.)

سمانه خلیلی[۱]، احمد معینی[۲*] و محمد عبدلی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: Moieni_ahmad@yahoo.com

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۵

چکیده

سرخارگل، یکی از گیاهان دارویی و با ارزش و از منابع مهم اسید شیکوریک است. در این پژوهش کالوس‌زایی، باززایی غیرمستقیم و ریشه‌زایی ساقه‌چه در گونه *Echinacea angustifolia* DC. بررسی گردید. در دو آزمایش جداگانه، اثرات نوع ریزنمونه (برگ، دمبرگ و ریشه) و غلظت ماده تنظیم‌کننده رشد NAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر میزان کالوس‌زایی و نیز اثرات نوع ریزنمونه (برگ، دمبرگ و ریشه) و غلظت ماده تنظیم‌کننده رشد BAP (۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) بر میزان باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه بررسی شد. این آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. همچنین در آزمایش دیگری اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد IBA (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بر ریشه‌زایی ساقه‌چه‌های باززایی شده در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. در بررسی کالوس‌زایی اختلاف آماری معنی‌داری بین عوامل مورد مطالعه مشاهده نشد ولی اثرات مورد مطالعه در بررسی ساقه‌چه‌زایی و ریشه‌زایی در سطح ۱٪ معنی‌دار بودند. بیشترین میزان باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه (۷۲٪) از ریزنمونه برگ و با استفاده از BAP در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین درصد ساقه‌چه‌های ریشه‌دار شده یا به‌عبارتی بیشترین درصد گیاه کامل (۳۸٪ و ۴۰٪)، به‌ترتیب با استفاده از IBA در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمدند. این پژوهش قابلیت خوب این گونه را برای کالوس‌زایی و تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای به‌منظور استفاده‌های مختلف ازجمله در برنامه‌های تکثیر، انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل (*Echinacea angustifolia* DC.)، کشت درون شیشه‌ای، باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه، BAP، NAA، IBA.

مقدمه

سرخارگل، گیاهی علفی، چندساله و از خانواده Asteraceae و بومی شمال آمریکاست (Sari *et al*., 1999). در سال‌های اخیر، نیاز جهانی برای فرآورده‌های حاصل از سرخارگل به‌دلیل خطر بیماری‌های واگیردار ویروسی به‌شدت افزایش یافته است (Nilanthi *et al*., 2009). گیاه سرخارگل، یکی از پرفروش‌ترین گیاهان دارویی در بیشتر کشورهای توسعه یافته است (Kim *et al*., 2009). این گیاه دارویی از نظر

Archive of SID

www.SID.ir

موارد مصرف در ایالات متحده آمریکا و اروپا، دومین رتبه را به خود اختصاص داده است، به‌طوری که حدود ۱۰٪ تجارت مکمل‌های دارویی به این گیاه تعلق دارد (Romero *et al.*, 2009؛ Kayser & Quax, 2007). سه گونه از جنس *Echinacea* که عموماً دارای مصارف دارویی هستند، عبارتند از: *E. purpurea* (استفاده از ریشه و قسمت‌های هوایی)، *E. angustifolia* (استفاده از ریشه) و *E. pallida* (استفاده از ریشه) (Perry *et al.*, 2001). اسیدهای فنولیک، آلکامیدها، پلی‌استیلن‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها به‌عنوان ترکیب‌های فعال بیولوژیکی در گونه‌های مختلف *Echinacea* شناسایی شده‌اند (Bauer & Wagner, 1991؛ Harborne & Williams, 2004). اکیناکوزید موجود در گونه *E. angustifolia* و اسید شیکوریک موجود در گونه *E. purpurea* به‌عنوان مهمترین مواد مؤثره این گونه‌ها، خاصیت ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانت و تقویت‌کنندگی سیستم دفاعی بدن را دارند (Dal Toso & Melandri, 2011).

تکثیر و بهره‌برداری از قابلیت بالقوه گیاهان دارویی از اهداف فناوری‌های نوین ازجمله بیوتکنولوژی گیاهیست. باززایی موفقیت‌آمیز ساقه‌چه در بسیاری از گونه‌های گیاهی از طریق انتخاب صحیح ترکیب محیط کشت، نوع ریزنمونه و کنترل شرایط محیطی امکان‌پذیر است (Debnath *et al.*, 2006؛ Tripathi & Tripathi, 2003). به‌منظور باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است، به‌عنوان مثال در *Hydrastis canadensis* (Shan-shan *et al.*, 2007) و ریحان از قطعات برگ (Winthrop *et al.*, 2000) و از قطعات ریزنمونه گره‌ای (Asghari *et al.*, 2012)، در رزماری (Misra & Chaturvedi, 1984)، پونه (Rech & Pires, 1986)، درمنه (Gulatia *et al.*, 1996) از ریزنمونه گره‌ای و در ختمی از قطعات هیپوکوتیل و لپه (Raoul *et al.*, 2010) استفاده شده است. در گیاه سرخارگل نیز، باززایی گیاه با استفاده از تنظیم‌کننده رشد TDZ در سیستم‌های کشت مایع و جامد گزارش شده است (Jones *et al.*, 2007). رشد کالوس نیز در یک گونه گیاهی براساس نوع ریزنمونه و ترکیب محیط کشت آن گیاه متفاوت است (Magyar-Tabori *et al.*, 2010). در تحقیقی، کالوس‌زایی و باززایی گیاه سرخارگل از ریزنمونه برگ گونه‌های *E. pallida* و *E. purpurea* در غلظت‌های مختلف BA (۹–۰ میکرومول) و NAA (۵/۳۷–۰ میکرومول) بررسی و مشخص شده‌است که باززایی در تمام غلظت‌های BA در ترکیب با غلظت‌های پایین NAA (۰/۲۷–۰ میکرومول) رخ داده و غلظت‌های بالاتر NAA باعث کاهش تولید کالوس و عدم باززایی گیاه شده‌است (Koroch *et al.*, 2002؛ Koroch *et al.*, 2003). همچنین در آزمایشی روی گونه *E. purpurea*، باززایی از قطعات برگ با استفاده از غلظت‌های مختلف BA و NAA، بررسی و مشخص شده‌است که غلظت‌های بیشتر تنظیم‌کننده رشد NAA تأثیر منفی بر باززایی گیاه داشته‌اند (Mechanda *et al.*, 2003).

ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای نیز توسط عوامل مختلفی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشت کنترل می‌شود. در بیشتر گونه‌ها، وجود اکسین برای ریشه‌زایی لازم است. همچنین نسبت اکسین به سیتوکینین برای القاء و رشد ریشه فاکتور مهمی محسوب می‌شود و با افزایش اکسین و کاهش سیتوکینین، ریشه‌ها تشکیل می‌شوند (Tripathi & Tripathi, 2003).

با وجود اهمیت دارویی گونه *Echinacea angustifolia*، اطلاعات کمی در مورد کشت درون شیشه‌ای این گیاه وجود دارد. با توجه به افزایش تقاضا برای این گیاه دارویی و نیز درصد بالای دگرگشنی این گیاه (Mcgregor, 1967)، از کشت بافت می‌توان برای تکثیر این گیاه استفاده کرد. یکی از روش‌های تولید گیاه درون شیشه‌ای، استفاده از سیستم باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه است. از این روش می‌توان به‌طور مستقیم برای تکثیر یا تهیه مواد اولیه مورد نیاز برای ریزازدیادی از طریق سایر روش‌ها، برنامه‌های انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت استفاده کرد. سیستم باززایی غیرمستقیم گیاه اگرچه معایبی از نظر احتمال وقوع تنوع ژنتیکی دارد، اما این احتمال را با مدیریت روش تولید ازجمله نوع و غلظت هورمون‌ها می‌توان کاهش داد، ضمن آنکه، بعکس، به‌منظور افزایش تنوع ژنتیکی و استفاده از این تنوع در برنامه‌های اصلاحی و تولید متابولیت‌های ثانویه،

Archive of SID
www.SID.ir

می‌توان با اعمال تیمارهایی این احتمال را افزایش داد. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی، باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه و ریشه‌زایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea angustifolia*) انجام شده‌است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه دارویی سرخارگل از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. منشأ اولیه این بذرها کشور مجارستان است و توسط شرکت پاکان بذر در شیراز تکثیر شده‌است. برای انجام آزمایش‌ها، ابتدا بذرها ضدعفونی شده و برای این منظور، بذرها به مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار گرفته و بعد توسط چند قطره مایع ظرفشویی و به‌مدت ۵ دقیقه شسته شدند. سایر مراحل ضدعفونی در لامینار ایرفلو انجام شد، به‌طوری که بذرها ابتدا به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ (v/v) قرار گرفته و پس از یک مرتبه شستشو با آب مقطر سترون، در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ (w/v) حاوی یک قطره توئین ۲۰، به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و در پایان سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. بذرها سپس به‌منظور آبگیری روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند (Abdoli *et al.*, 2013). بذرها در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف (۶۰×۱۵mm) حاوی محیط کشت $^1/_2$ MS (غلظت نمک‌های عناصر ماکرو نصف شدند) همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار–آگار و با pH=۵/۷–۵/۸ کشت شدند. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. گیاهچه‌ها پس از ۲ هفته به‌علت نیاز به فضای بیشتر، به ظروف شیشه‌ای (۸×۵/۵ سانتی‌متر) حاوی ۷۰ میلی‌لیتر از همان محیط کشت منتقل شدند. کشت‌ها در اتاق رشد کنترل شده تحت شرایط شدت نور ۴۳۰۰ لوکس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از دستیابی به گیاهچه‌های قوی به طول ۱۰–۸ سانتی‌متر از آنها ریزنمونه‌هایی شامل برگ کامل (پهنک به همراه ۲–۱ سانتی‌متر دمبرگ)، دمبرگ و ریشه تهیه شد. ریزنمونه‌های مذکور به‌منظور بررسی کالوس‌زایی، باززایی ساقه‌چه از کالوس و ریشه‌زایی به محیط کشت MS (Murashinge & Skoog, 1962) حاوی مواد تنظیم‌کننده رشد، طبق توضیحات در آزمایش‌های مربوطه منتقل شدند. در هر پتری‌دیش، ۵ عدد ریزنمونه کشت شد و پتری‌دیش‌های کشت شده به‌منظور کالوس‌زایی، در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به‌منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و محیط کشت به‌دلیل ترکیب‌های پلی فنولیک ریزنمونه‌ها، محیط کشت هر دو هفته تعویض شد. برای باززایی ساقه‌چه از کالوس‌ها، این کالوس‌ها حدود یک ماه روی محیط کشت باززایی حاوی مواد تنظیم‌کننده رشد BAP و NAA با دوره نوری متناوب ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفته و هر دو هفته یک مرتبه زیرکشت برده شدند. برای بررسی ریشه‌زایی، ساقه‌چه‌های بدست آمده از ریزنمونه‌های برگی استفاده شد و این ساقه‌چه‌ها به محیط کشت MS حاوی IBA منتقل شدند. به‌منظور یکنواخت بودن ساقه‌چه‌ها در بررسی ریشه‌زایی و با توجه به اینکه بیشتر ساقه‌چه‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگی بدست آمده بودند، بنابراین از این ساقه‌چه‌ها برای مطالعه ریشه‌زایی استفاده شد.

آزمایش بررسی اثرات نوع ریزنمونه و غلظت NAA بر میزان کالوس‌زایی

درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا در ریزنمونه‌های مختلف به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۵ تکرار بررسی شد. فاکتور اول شامل نوع ریزنمونه (برگ، دمبرگ و ریشه) و فاکتور دوم شامل غلظت تنظیم‌کننده رشد NAA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. در این آزمایش از غلظت ثابت BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا از طریق ۱۰۰× (تعداد ریزنمونه کشت شده/تعداد ریزنمونه کالوس‌زا) در هر پتری‌دیش محاسبه گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش بررسی اثرات نوع ریزنمونه و غلظت BAP بر میزان باززایی

در این آزمایش درصد باززایی ساقه‌چه در ریزنمونه‌های مختلف، به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار بررسی شد. فاکتور اول شامل نوع ریزنمونه (برگ، دمبرگ و ریشه) و فاکتور دوم شامل غلظت تنظیم‌کننده رشد BAP (۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. در این آزمایش، از غلظت ثابت NAA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در تمام تکرارها استفاده شد. صفت درصد باززایی ساقه‌چه از طریق ۱۰۰× (تعداد ریزنمونه کشت شده/تعداد ساقه‌چه تولید شده) در هر پتری‌دیش محاسبه گردید.

آزمایش بررسی اثرات غلظت IBA بر ریشه‌زایی نوساقه‌های باززایی شده

آزمایش ریشه‌زایی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار انجام شد. در این مرحله از محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف IBA (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. صفت درصد ریشه‌زایی ساقه‌چه از طریق ۱۰۰× (تعداد ساقه‌چه کشت شده/تعداد ساقه‌چه ریشه‌دار شده) در هر پتری‌دیش محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام گردید. داده‌هایی که دارای توزیع نرمال نبودند، بر مبنای تبدیل Arcsin √X نرمال شدند.

نتایج

اثر نوع ریزنمونه و غلظت NAA بر میزان کالوس‌زایی

نتایج حاصل به صورت تعداد ریزنمونه های کالوس زا بر تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده در هر تکرار تجزیه و تحلیل گردید. از آنجایی که تقریباً تمام ریزنمونه‌ها کالوس زا بودند، نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول آورده نشده است) هیچگونه اختلاف آماری را بین ریزنمونه‌ها، غلظت‌های مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد و اثر متقابل آنها نشان نداد. اما اندازه ظاهری کالوس های تشکیل شده در ریزنمونه های مختلف متفاوت بود. غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از NAA در ریزنمونه برگی و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه دمبرگ به ترتیب کالوس های بزرگتر و کوچکتری از نظر ظاهری تولید کردند.

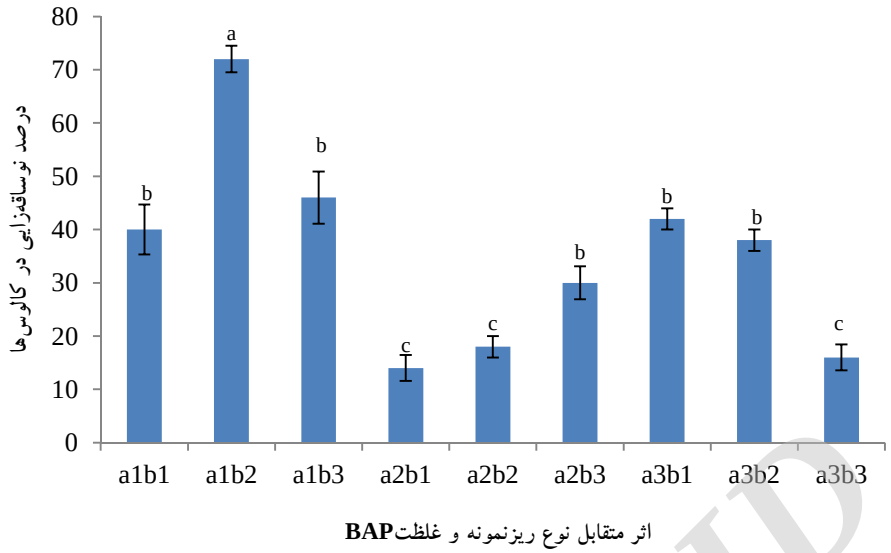
اثر نوع ریزنمونه و غلظت BAP بر میزان باززایی ساقه‌چه

اثرات ساده غلظت BAP و نوع ریزنمونه و نیز اثر متقابل آنها معنی‌دار بود. بیشترین مقدار باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه (۷۲٪) در ریزنمونه برگ و با استفاده از BAP در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر بدست آمده است (شکل ۱). در ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد (شاهد)، هیچگونه ساقه‌چه‌ای تشکیل نشد. شکل ۲، باززایی ساقه‌چه روی ریزنمونه برگ گیاه را نشان می‌دهد.

اثر غلظت IBA بر ریشه‌زایی ساقه‌چه‌های باززایی شده

ساقه‌چه حاصل از کالوس‌های برگ، برای ریشه‌دار شدن به محیط کشت حاوی IBA منتقل شدند. نتایج آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت IBA بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار بود. میزان ریشه‌زایی در غلظت‌های مورد مطالعه هورمون IBA، متفاوت بود. بیشترین درصد ساقه‌چه‌های ریشه‌دار شده (۳۸٪ و۴۰٪) در غلظت‌های ۱ و mgl^{-1} ۱/۵ IBA بدست آمدند. در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱ به‌ترتیب ۱۲٪ و ۶٪ ساقه‌چه‌ها ریشه‌دار شدند (شکل ۳).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱– مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت BAP روی صفت باززایی ساقه‌چه در گیاه *E. angustifolia*

A (نوع ریزنمونه): a_1 (برگ)، a_2 (دمبرگ) و a_3 (ریشه)

B (غلظت تنظیم‌کننده رشد BAP): b_1 (۳ میلی‌گرم در لیتر)، b_2 (۴ میلی‌گرم در لیتر) و b_3 (۵ میلی‌گرم در لیتر)

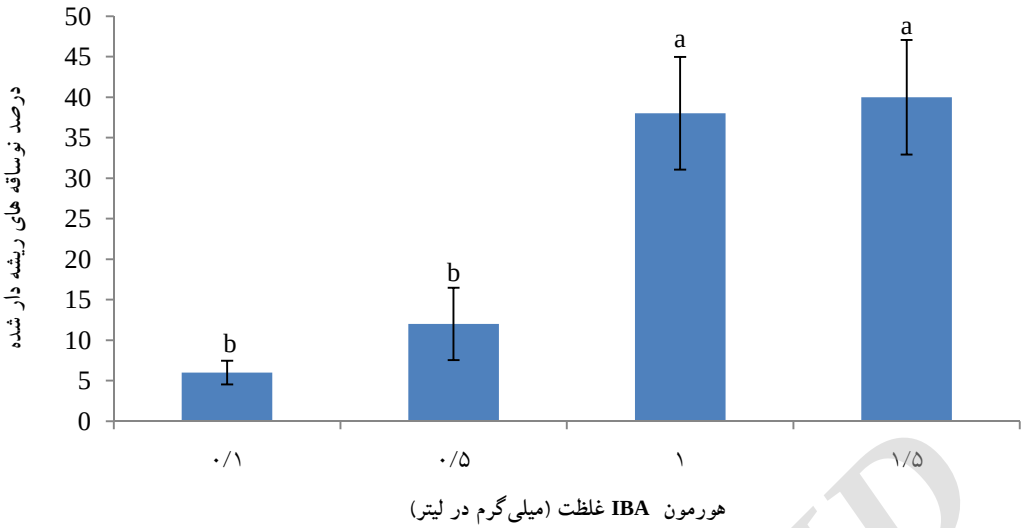
شکل ۲– الف: ساقه‌چه‌های باززایی شده از کالوس‌های ریزنمونه برگ گیاه *Echinacea angustifoli* و ب: ساقه‌چه‌های درون شیشه‌ای بدست‌آمده در محیط کشت حاوی IBA برای ریشه‌زایی

بحث

از فاکتورهای مؤثر در باززایی گیاهان می‌توان به ژنوتیپ، ریزنمونه و عوامل تنظیم‌کننده رشد اشاره کرد (Tripathi & Tripathi, 2003؛ Meftahizade *et al.*, 2010). در این پژوهش نیز پاسخ ریزنمونه‌های متفاوت به غلظت‌های مختلف مواد تنظیم‌کننده رشد استفاده شده بسیار متفاوت بود (آزمایش‌های ۱، ۲ و ۳). شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه، وضعیت سلول از نظر مرحله تقسیم سلولی، توانایی انتقال یا قابلیت دسترسی به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و توانایی متابولیکی سلول، از عوامل اصلی تنوع در پاسخ ریزنمونه‌های مختلف هستند (Nagarathan *et al.*, 1991).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت IBA روی صفت ریشه‌زایی ساقه‌چه‌ها در گیاه *E. angustifolia*

ریزنمونه‌های دارای یک یا چند مریستم مانند جوانه‌های انتهایی و جوانه‌های جانبی ساقه و نیز مریستم انتهایی ریشه از قابلیت باززایی بالایی برخوردار هستند. چنین بافت‌هایی با تولید و تجمع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد نیاز (اکسین‌ها یا سیتوکینین‌ها) از قدرت تقسیم سلولی بالایی برخوردار بوده و نیز قابلیت باززایی بالایی را نشان می‌دهند (Akin-Idowu *et al.*, 2009). به‌طور کلی نسبت بالای غلظت سیتوکنین به اکسین باعث القاء و تشکیل ساقه‌چه می‌شود، در حالی‌که اکسین بیشتر نسبت به سیتوکنین باعث تولید ریشه می‌شود و غلظت برابر این تنظیم‌کننده‌های رشد روند رشد و نمو کشت را به سمت کالوس‌زایی هدایت می‌کند (Thadavong *et al.*, 2002). البته استفاده از BAP در این پژوهش، اثر مثبتی روی باززایی ساقه‌چه داشت. BAP و Kinetin سیتوکینین‌های مناسبی برای باززایی درون شیشه‌ای گیاه *E. angustifolia* هستند و تأکید شده‌است که تنظیم‌کننده رشد BAP به‌طور قابل توجهی بیش از Kinetin، باعث باززایی در این گیاه می‌شود (Kim *et al.*, 2009) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. البته تفاوت در واکنش ریزنمونه‌های مختلف به غلظت‌های مختلف BAP در این پژوهش می‌تواند به‌دلیل شرایط فیزیولوژیکی مختلف آنها باشد. نوع ریزنمونه به‌طور قابل ملاحظه‌ای روی میزان باززایی در گونه‌های Echinaceae تأثیر دارد (Koroch *et al.*, 2003).

انواع مختلف ریزنمونه‌های یک گیاه و سلول‌های مختلف موجود در یک ریزنمونه در موقعیت‌های متفاوتی به لحاظ رقابت مورفولوژیکی قرار دارند، در نتیجه به سیگنال‌های متفاوتی برای ورود به یک مسیر مورفولوژیکی خاص نیاز دارند، بنابراین منطقی است که واکنش‌های باززایی متفاوت ریزنمونه‌ها نسبت به ترکیب‌های اکسین و سیتوکنین نیز حاصل موقعیت‌های مختلف در رقابت اثرات مورفولوژیکی سلول‌های لپه، هیپوکوتیل و سایر بافت‌ها باشد (Lakshmanan *et al.*, 2002). در این پژوهش، نوع ریزنمونه در تولید کالوس و باززایی ساقه‌چه، بسیار مؤثر بود و بالاترین درصد کالوس‌زایی و باززایی ساقه‌چه در ریزنمونه برگ مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

عامل مهم دیگر روی کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف است، اگرچه میزان موفقیت در اندام‌زایی به قابلیت طبیعی باززایی ریزنمونه مورد نظر نیز وابسته است (Ilahi *et al.*, 2005). معمولاً در محیط کشت دارای اکسین و فاقد سیتوکنین، کالوس تولید می‌گردد اما بدون حضور اکسین، کالوس تولید نمی‌شود (Hohtola, 1988). با این حال، در بعضی موارد حضور همزمان اکسین و سیتوکنین باعث افزایش تولید کالوس می‌گردد، همچنان که در گیاه *Stevia rebaudiana*، با اضافه کردن BAP به محیط کشت حاوی اکسین، تولید کالوس افزایش یافت (Ahmad *et al.*,

Archive of SID
www.SID.ir

2011). البته نیاز به حضور همزمان اکسین و سیتوکینین در محیط کشت عامل مهمی برای کالوس‌زایی در بعضی گیاهان مثل داتوره است (Dessouky *et al*., 2001). در این پژوهش، برای کالوس‌زایی، به‌طور همزمان از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP استفاده شد. ترکیب مواد تنظیم‌کننده رشد اکسین و سیتوکینین، علاوه‌بر القای کالوس، در مدت زنده‌مانی آن نیز مؤثر است (Abd Elaleem *et al*., 2009).

تنظیم‌کننده رشد اکسین برای القای ریشه‌زایی ضروری است و در بسیاری از گیاهان به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای افزایش درصد ریشه‌زایی استفاده شده‌است (Valizade *et al*., 2008؛ Miao-Miao *et al*., 2009). در این پژوهش، حداکثر درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی IBA بدست آمد. به‌طور کلی ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای به میزان تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی وابسته است و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی نیز به مقدار مواد تنظیم‌کننده‌های رشد آندوژن گیاه بستگی دارد (Nhut *et al*., 2006).

با توجه به ارزش دارویی گیاه سرخارگل و تقاضای روزافزون آن در سال‌های اخیر و تحقیقات بسیار اندک در گونه *Echinacea angustifolia*، از نتایج این پژوهش می‌توان در برنامه‌های تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای برای تکثیر یا تهیه مواد اولیه مورد نیاز برای ریزازدیادی از طریق سایر روش‌ها استفاده کرد. همچنین از روش باززایی غیرمستقیم ساقه‌چه می‌توان به‌عنوان یک روش مناسب برای برنامه‌های انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Abd Elaleem, K.G., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M., 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2529-2534.
- Abdoli, M., Moieni, A. and Naghdi Badi, H., 2013. Influence of KNO_3, $CaCl_2$ and $MgSO_4$ concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). Journal of Medicinal Plants, 12: 75-84.
- Ahmad, N., Fazal, H. and Zamir, R., 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech, 13(2): 174-177.
- Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O. and Ademoyegun, O.T., 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticulture crops. African Journal of Biotechnology, 8(16): 3782-3788.
- Asghari, F., Hosseini, B., Hassani, A. and Shirzad, H., 2012. Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). Australian Journal of Agricultural Engineering, 3(1): 12-17.
- Bauer, R. and Wagner, H., 1991. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs: 253-321. In: Wagner, H. and Farnsworth, N.R., (Eds.). Economic and Medicinal Plant Research. Academic Press, New York, 1056p.
- Dal Toso, R. and Melandri, F., 2011. *Echinacea angustifolia* cell culture extract. Nutrafoods, 10(4): 19-25.
- Debnath, M., Malik, C.P. and Bisen, P.S., 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology, 7: 33-49.
- Dessouky, M., Taha, H. and El-Bahr, M., 2001. Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L. Biotechnology, 4: 23-30.
- Gulatia, A., Bharel, S., Abdin, M.Z., Jain, S.K. and Srivastava, P.S., 1996. In vitro micropropagation and flowering in *Artemisia annua*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 5: 31-37.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A., 2004. Phytochemistry of the genus *Echinacea*: 55-71. In: Miller, S.C., and Yu, H., (Eds.). Echinacea. The genus Echinacea. CRC Press, Boca Raton, 276p.
- Hohtola, A., 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue culture from mature scot pine. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 15: 211-222.
- Ilahi, I.S., Bano. M.J. and F. Rahim., 2005. Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. cv. SWAT-II) through somatic embryogenesis. Pakistan Journal of Botany, 37(2): 237-242.
- Jones, M.P.A., Yi, Z., Murch, S.J. and Saxena, P.K., 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: micropropagation in solid and liquid culture systems. Plant Cell Reports, 26: 13-19.
- Kayser, O. and Quax, W.J., 2007. Medicinal Plant Biotechnology from Basic Research to Industrial

Archive of SID
www.SID.ir

- 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, 2009: 1-7.
- Nhut, D.T., Duy, N., Vy, N.N.H., Khue, C.D., Khiem, D.V. and Vinh, D.N., 2006. Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, shot and root regeneration capacity from callus. Journal of Applied Horticulture, 8(2): 135-137.
- Perry, B., Burges, E. and Glennie, V., 2001. *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. Journal of Agriculture Food Chemistry, 49: 1702-1706.
- Raoul, S., Gilbert, C., Hamidou, F.S., Yannick, T., Yao, D., Abdourahmane, S. and Michel, B., 2010. Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. Australian Journal of Crop Science, 4: 98-106.
- Rech, E.L. and Pires, J.P., 1986. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of the axillary buds. Plant Cell Reports, 5: 17-21.
- 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 Cell Development Biology-Plant, 45: 599-609.
- Sari, A.O., Morales, M.R. and Simon, J.E., 1999. *Echinacea angustifolia*: An Emerging Medicinal: 490-493. Janick, J., (Ed.), Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 528p.
- Shan-shan, H., Chun-zhao, L. and Praveen, S., 2007. Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. Scientia Horticulturae, 113: 82-86.
- Thadavong, S., Sripichitt, P., Wongyai, W. and Jompuk. P., 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDK1. Kasetsart Journal, 36(4): 334-344.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2): 243-253.
- Valizadeh, M., Safarnejad, A., Nematzadeh, G. and Kazemitabar, S.K. 2008. Regeneration of plantlets from embryo explants of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 11(42(A)): 33-39.
- Winthrop, B., Phippen, E. and James, S., 2000. Shoot regeneration of young leaf explants from basil. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 36(4): 250-254.

Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, 571p.
- Kim, J., Baek, K., Son, Y., Son, S. and Shin, H., 2009. Hairy root cultures of *Taxus cuspidata* for enhanced production of paclitaxel. Journal of Applied Biological Chemistry, 52: 144-150.
- Koroch, A.R., 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: 79-83.
- Koroch, A.R., Kapteyn, J., Juliani, H.R. and Simon, J.E., 2003. In vitro regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants. In Vitro Cell. Developmental Biology Plant, 39: 415-418.
- Lakshmanan, P., Danesh, M. and Taji, A., 2002. Production of four commercially cultivated *Echinacea* species by different methods of in vitro regeneration. Journal of Horticultural, Science and Biotechnology, 77: 158-163.
- Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira, D.A. and Silva, J.A., 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 101: 251-267.
- Mcgregor, R.L., 1967. A new species and two new varieties of *Echinacea* (Compositae). Transactions of the Kansas Academy of Science, 70: 366-370.
- Mechanda, S.M., Baum, B.R., Johnson, D.A. and Arnason, J.T., 2003. Direct shoot regeneration from leaf segments of mature plants of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. In Vitro Cell. Developmental Biology Plant, 39: 505-509.
- Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lotfi, M. and Naseri, A., 2010. Improved in vitro culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. Journal of Medicinal Plants Research, 4: 240-246.
- Miao-Miao, Y., Chan, X., Chun-Hwan, K., Yeong-Cheol, U., Amadou Apho, B. and De-Ping, G., 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae, 123:124-128.
- Misra, P. and Chaturvedi, H.C., 1984. Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 3: 163-166.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-97.
- Nagarathan, K.C., Prakash, H.S. and Shetty, H.S., 1991. Genotypic effects on the callus formation from different explants of pearl millet B lines. Advances in Plant Sciences, 4: 82-86.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of explant and plant growth regulators on callogenesis, indirect shoot regeneration and shoot rooting in *Echinacea angustifolia* DC.

S. Khalili[1], A. Moieni[2*] and M. Abdoli[3]

1- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E-mail: Moieni_ahmad@yahoo.com

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

Received: February 2016 Revised: May 2016 Accepted: August 2016

Abstract

Echinacea is one of the most important medicinal plants and an important source of cichoric acid. In this research, callus induction, indirect shoot regeneration, and shoot rooting of *Echinacea angustifolia* DC. were investigated. The effects of explant (leaf, petiole and root) and NAA concentrations (0.5, 1 and 1.5 mg l^{-1}) on callus induction as well as the effects of explant (leaf, petiole and root) and BAP concentrations (3, 4 and 5 mg l^{-1}) on the indirect shoot regeneration of callus were evaluated in two separated experiments. The study was conducted as factorial in a completely randomized design (CRD). The effects of IBA concentrations (0.5, 1, 1.5 and 2 mg l^{-1}) on shoot rooting were also investigated in a completely randomized design. The effects of the factors studied on the callogenesis were not significant while these factors had significant effects on the shoot regeneration and rooting at 1% probability level. In general, the results indicated that the highest indirect shoot regeneration (72%) was obtained from the leaf explant and by the use of 4 mgl^{-1} BAP. In addition, the highest shoot rooting (38% and 40%) was obtained using 1 and 1.5 mgl^{-1} IBA. The good potential of this species for indirect shoot regeneration was shown in this research. These results can be used in micropropagation programs, gene transfer, and transgenic plants production.

Keywords: *Echinacea angustifolia* DC., *In vitro* culture, indirect shoot regeneration, BAP, NAA, IBA.

Archive of SID

www.SID.ir