مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۱۰۱-۹۱ (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2020.342034.1360
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.28.93.55.1.1585.41

رویان‌زایی بدنی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)

محدثه حجازی[۱]، مریم دهستانی اردکانی[۲*]، کاظم کمالی علی‌آباد[۳] و محسن رشیدی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان

پست الکترونیکی: mdehestani@ardakan.ac.ir

۳- دانشیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یزد

۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه اردکان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۴

چکیده

سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) یک گونه گیاهی با ارزش دارویی بالا می‌باشد. به‌منظور بهینه‌سازی پروتکل رویان‌زایی بدنی ریزنمونه‌های برگی گیاه سرخارگل از ۱۸ تیمار ترکیبی شامل تنظیم کننده‌های رشد شامل بنزیل آدنین (BA) در سه سطح (۳، ۴، ۵ میلی‌گرم در لیتر)، نفتالین استیک اسید (NAA) در سه سطح (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، همراه و یا بدون یک گرم در لیتر زغال فعال، ۵۰ میلی‌لیتر در لیتر شیره نارگیل و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین‌هیدرولیزات در محیط کشت MS استفاده شد. داده‌های بدست‌آمده در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مقایسه میانگین تیمارها به روش توکی انجام شد. نتایج نشان داد که رویان‌زایی با تولید کالوس به‌صورت غیرمستقیم اتفاق افتاد. کالوس‌های رویان‌زا به رنگ سبز تیره، منسجم و با رشد سریع‌تر بودند. بیشترین رویان‌زایی کالوس‌ها (۱۰۰ درصد) و نیز باززایی رویان در تیمارهای ترکیب BA و NAA همراه با زغال فعال، شیره نارگیل و کازئین هیدرولیزات حاصل شد. در حالی‌که تیمارهای تنظیم‌کننده رشد فاقد شیره نارگیل و کازئین هیدرولیزات موفق به تولید رویان بدنی نشدند. بیشترین میزان تولید شاخساره (۴۳/۳ عدد) در تیمار ترکیبی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA+۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA+۱ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال+۵۰ میلی‌لیتر در لیتر شیره نارگیل+۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین‌هیدرولیزات مشاهده شد. به‌طورکلی برای رویان‌زایی بدنی سرخارگل، استفاده از سطوح بالای BA و مقادیر اندک NAA به همراه شیره‌نارگیل و کازئین‌هیدرولیزات توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آدنین، شیره نارگیل، کازئین هیدرولیزات، کالوس، نفتالین استیک اسید

مقدمه

سرخارگل ((*Echinacea purpurea* L. (Moench))، گیاهی علفی، چند ساله، زینتی و دارویی است. این گیاه متعلق به تیره آستراسه (Asteraceae) بوده و منشأ آن آمریکای شمالی گزارش شده است (OmidBeigi, 2010). ارزش زینتی این گیاه به‌دلیل دوره گلدهی طولانی و گل-آذین‌های بزرگ متشکل از دو نوع گل یعنی گلچه‌های شعاعی ارغوانی و گلچه‌های دیسکی ارغوانی–قهوه‌ای است (Perry *et al*., 2001). سرخارگل به‌عنوان یکی از گونه‌های دارویی مهم جنس *Echinacea* در ایالات متحده، استرالیا و

اروپا به‌شمار می‌رود (Stanisavljevic *et al*., 2009). تمام قسمت‌های گیاه سرخارگل اعم از ریشه و اندام رویشی حاوی مواد مؤثره ارزشمندی از قبیل ترکیبات آلکیل آمیدی، ترکیبات پلی‌ساکاریدی و نیز اسانس است (Gruenwald *et al*., 1999). از مهمترین خواص این گیاه افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌باشد که سبب شده این گیاه به‌عنوان یک داروی مؤثر در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها همانند سرماخوردگی، آنفولانزا و عفونت‌ها استفاده شود (Li, 1998).

گیاه سرخارگل به‌صورت سنتی از طریق بذر تکثیر می‌شود (Maria *et al*., 2012)، ولی تکثیر آن با بذر بازدهی کمی دارد و معمولا گیاهان تولید شده در سال دوم بذر تولید نمی‌کنند (Abbasi *et al*., 2007). بر همین اساس تکثیر رویشی توصیه می‌شود. روش‌های تکثیر سنتی مانند تقسیم بوته یا قلمه ریشه با تعداد اندک قلمه‌های تولیدی محدود می‌شوند. در حالی‌که تکثیر درون شیشه‌ای موجب تکثیر سریع آن در سطح انبوه می‌گردد (Wang & To, 2004). در رویان‌زایی بدنی هر سلول بدنی می‌تواند در صورتی که شرایط مناسب داشته باشد، گیاه جدیدی تولید کند (Joshi & Kumar, 2003). رویان‌زایی بدنی به دلیل تکثیر سریع و مداوم توده رویان زا، روشی مناسب برای ریزازدیادی معرفی شده است (Karkonen, 2001; Khosravi *et al*., 2007). ریزازدیادی از طریق رویان‌زایی بدنی به‌دلیل دارا بودن ساختار دوقطبی ساقه و ریشه، نیازی به تغییر محیط کشت و محرک‌های هورمونی متفاوت برای اندام‌زایی ندارد و به‌لحاظ کاهش زمان مورد نیاز برای تکثیر مورد توجه اصلاح‌گران می‌باشد (Jain & Gupta, 2005). این تکنولوژی قابلیت زیادی برای ریزازدیادی گیاهان در مقیاس صنعتی دارد. علاوه‌براین در صورت تشکیل، می‌تواند یک منبع تنوع سوماکلونال از طریق کالوس‌زایی باشد که در شرایط درون شیشه موجب القای تنوع شود (Larkin & Scowcroft, 1981) و می‌توان از آن در اصلاح و تولید لاین‌های با خصوصیات برتر استفاده نمود. نکته مهمی که باید در نظر داشت، این است که ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی قابلیت یکسانی در رویان‌زایی بدنی ندارند، بنابراین انتخاب لاین‌های با بالاترین کارایی لازم است.

Lakshmanan و همکاران (2002)، وجود BA (6-benzyladenine) را برای اندام‌زایی شاخساره در گونه‌های سرخارگل توصیه کردند. آنان با استفاده از محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ترکیب‌های مختلف BA، کینتین و IBA در القای شاخساره از برگ و محیط‌کشت حاوی 2, 4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid) موفق به رویان‌زایی از هیپوکتیل *E. pallida* شدند. Zobayed و Saxena (۲۰۰۳) قابلیت جنین‌زایی بافت‌های مختلف گیاه سرخارگل را بررسی کردند و بیشترین میزان تولید رویان از قطعات برگ کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۵ میکرومول BAP (Benzyl amino pourine) و ۲/۵ میکرومول IBA (Indolebutyric acid) را به‌دست آوردند و در طی چهار هفته، ۸۳ جنین از هر ریزنمونه تولید کردند. Ahmad و همکاران (۲۰۱۹) اثر سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشدی بر رویان‌زایی بدنی گیاه سرخارگل را بررسی کردند و بیشترین درصد رویان‌زایی را در محیط‌کشت MS حاوی ویتامین B_5 همراه با ۵ میکرومولار BAP+ ۲/۵ میکرومولار IBA بدست آوردند.

Murch و همکاران (۲۰۰۶) تفاوت معنی‌داری را در توسعه شاخساره یا رویان‌های بدنی حاصل از قطعات دمبرگ در لاین‌های تکثیر شده از بذرهای مختلف سرخارگل در محیط کشت حاوی سیتوکنین (BAP) مشاهده کردند. به همین ترتیب کشت ریزنمونه‌های برگ حاصل در محیط کشت حاوی اکسین و سیتوکنین و القای تاریکی موجب القای شاخساره و رویان بدنی شد.

منشأ ریزنمونه نیز به‌طور معنی‌داری بر پاسخ باززایی سرخارگل تأثیرگذار است. این تفاوت ممکن است در نتیجه تفاوت در روش کشت، ساختار ژنتیکی گیاهان والد و وضعیت ژنتیکی بافت ریزنمونه مورد استفاده باشد. تفاوت در بازدهی باززایی به میزان قابل توجهی به نوع ریزنمونه مرتبط است (Annadana *et al*., 2000). برخی مطالعات نشان داده که کاربرد هیپوکتیل نسبت به سایر اندام‌ها در

ریزنمونه‌ها در سرخارگل مؤثرتر است (Lakshmana *et al*., 2002; Chae *et al*., 2004).

با توجه به اینکه غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی اثرهای متفاوتی در رویان‌زایی بدنی سرخارگل دارند، در این تحقیق اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی شامل شیره نارگیل، کازئین هیدرولیزات و زغال فعال بر رویان‌زایی بدنی و القای شاخساره از ریزنمونه‌های برگ سرخارگل مورد بررسی قرار گرفت و پروتکل بهینه در زمینه تولید رویان‌های بدنی از ریزنمونه‌های برگی معرفی شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ابتدا بذرهای گیاه دارویی سرخارگل با استفاده از آب مقطر سترون شست‌وشو شدند، سپس به محلول حاوی اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد + کلرید جیوه ۰/۱ درصد سترون منتقل و به‌مدت سه دقیقه ضدعفونی گردیدند و در نهایت به محلول اسید سیتریک ۰/۰۵ درصد منتقل و به‌مدت سه دقیقه در آن شست‌وشو شدند (Zamani *et al*., 2020). بذرها در محیط کشت MS ۱/۲ (دارای نصف غلظت پیشنهادی عناصر ماکرو) حاوی ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با pH برابر ۵/۷ قرار گرفتند. محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سترون شد. برای کشت بذرها از شیشه‌های مربایی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر شش سانتی‌متر استفاده شد و درون هر شیشه هشت عدد بذر کشت شد.

رویان‌زایی بدنی

پس از دو ماه از کشت بذرها، ریزنمونه‌های برگی با ابعاد ۱ × ۱ cm از دانهال‌های *E. purpurea* حاصل از کشت بذر در محیط درون شیشه جدا و در محیط کشت MS حاوی ۳۰ gL^{-1} ساکارز و ۷ $g\ L^{-1}$ آگار با pH ۵/۷ حاوی ترکیبات متفاوت تنظیم کننده‌های رشدی کشت شدند. همچنین اثر متقابل سطوح مختلف BA (۳ $mg\ L^{-1}$، ۴، ۵) و NAA (۰/۱ $mg\ L^{-1}$، ۰/۲ و ۰/۵) همراه و یا بدون ترکیبات ۱ $g\ L^{-1}$ زغال فعال، ۵۰ $ml\ L^{-1}$ شیره نارگیل و mg ۵۰ L^{-1} کازئین هیدرولیزات (مرک) بررسی شد (جدول ۱). در ادامه به‌منظور القای ریزنمونه‌های برگی به کالوس رویان‌زا، شیشه‌ها به‌مدت ۱۴ روز در تاریکی قرار گرفتند و بعد به اتاقک رشد با شرایط ذکر شده در بالا انتقال یافتند. پس از چهار هفته ریزنمونه‌ها شروع به تشکیل رویان در بافت کالوس برگ کردند. رویان‌های متصل به قطعات کالوس جدا و به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA برای تولید گیاهچه انتقال داده شدند. در پایان صفاتی مانند رنگ کالوس، درصد کالوس جنین‌زا، درصد قهوه‌ای شدن، درصد نکروزه شدن و میزان تولید شاخساره (گیاهچه) در فاصله زمانی ۳۰ تا ۶۰ روز از زمان کشت ریزنمونه‌ها اندازه‌گیری شد. رنگ کالوس بر اساس مقیاس هدونیک ۵–۱ اندازه‌گیری شد. به‌طوری‌که کالوس‌های با رنگ سفید نمره ۱ و سبز پررنگ (تیره) نمره ۵ را به خود اختصاص دادند (Zamani *et al*., 2020).

انتقال و سازگاری گیاهچه‌های به‌دست آمده

گیاهچه‌های به‌دست آمده از طریق رویان‌زایی پس از حدود دو ماه به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA برای رشد و ریشه‌زایی منتقل شدند. پس از شش هفته ریشه تشکیل و کاملا داخل شیشه‌ها را پر کرد. گیاهچه‌ها برای سازگاری به گلدان‌های حاوی ۷۰ درصد پیت‌ماس و ۳۰ درصد پرلایت پس از آماده‌سازی اولیه بستر منتقل و با قارچ‌کش بنومیل با نسبت ۱/۵ در ۱۰۰۰ ضدعفونی شدند. گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی منتقل شدند. برای آبیاری گلدان‌ها از روش آبیاری زیرزمینی (به روش کاپیلاریته استفاده شد که با قرار دادن یک رشته نخ ابریشمی–پلاستیکی درون گلدان و هدایت انتهای نخ درون منبع کوچک آب در زیر گلدان انجام شد. برای سازگاری بهتر روی هر گلدان یک لیوان پلاستیکی شفاف قرارداده شد و پس از سازگاری کامل از روی گیاه برداشته شد.

داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مقایسه میانگین تیمارها به روش توکی انجام شد.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای رویان‌زایی بدنی ریزنمونه‌های برگی گیاه سرخارگل

تیمارها	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
BA (mg/l)	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۵	۵	۵	۳	۳	۳	۴	۴	۴	۵	۵	۵
NAA (mg/l)	۰/۱	۰/۲	۰/۵	۰/۱	۰/۲	۰/۵	۰/۱	۰/۲	۰/۵	۰/۱	۰/۲	۰/۵	۰/۱	۰/۲	۰/۵	۰/۱	۰/۲	۰/۵
کازئین هیدرولیزات (mg/l)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
زغال فعال (mg/l)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
شیره نارگیل (ml/l)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰

نتایج

اثر تیمارهای مختلف بر رنگ کالوس، کالوس تمایز نیافته، رویان‌زا، اندام‌زا، نکروز شدن و تعداد شاخساره در سطح احتمال یک درصد بر میزان قهوه‌ای شدن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

بیشترین رنگ کالوس (سبز تیره) (۹/۶۶) در تیمارهای T7، T10، T11، T15 و T17 حاصل شد (شکل ۱). کالوس‌ها بر اساس رنگ و کیفیت به سه گروه کالوس‌های تمایز نیافته، رویان‌زا و اندام‌زا تقسیم‌بندی شدند. کالوس-های رویان‌زا به رنگ سبز تیره، منسجم و با رشد سریع‌تر بودند (شکل ۶-الف). کالوس‌های اندام‌زا نرم، شل و پفکی به رنگ سبز روشن و دارای رشد کمتر بودند (شکل ۶-ج) و تولید رویان نکردند. کالوس‌های سفید رنگ به سرعت قهوه‌ای شده و از بین رفتند (تمایز نیافتند) (شکل ۶-و).

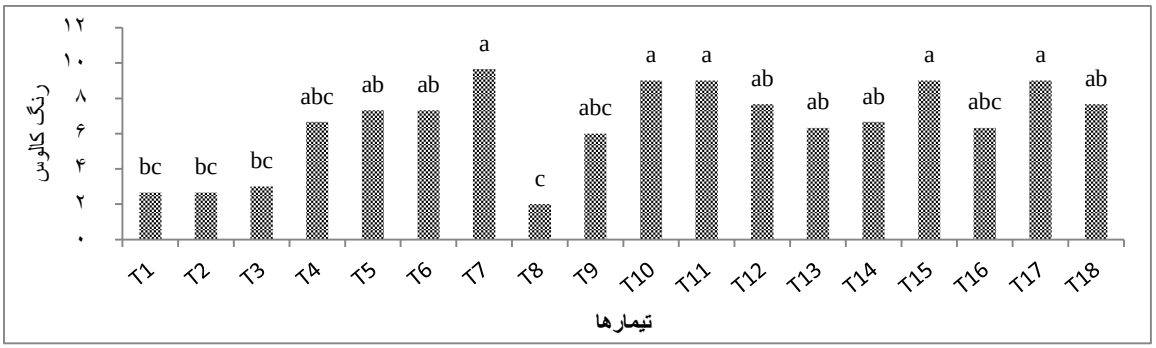
استفاده از زغال فعال، کازئین هیدرولیزات و شیره نارگیل همراه با تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی به‌طور معنی‌داری رویان‌زایی کالوس‌ها را نسبت به تیمارهای فاقد این ترکیبات (ترکیب BA و NAA به تنهایی) افزایش داد (شکل ۶-الف). بیشترین رویان‌زایی کالوس‌ها (۱۰۰ درصد) در تیمارهای T10، T11، T12، T17 و T18 (۸۸/۷ درصد) حاصل شد (شکل ۲). استفاده از تیمارهای ترکیبی BA و NAA بدون کاربرد شیره نارگیل و کازئین هیدرولیزات در تیمارهای T1، T2، T3، T4 و T8 موفق به تولید رویان نشد (شکل ۲). در تیمارهای T5 و T9 (۳۳ درصد)، T6 (۱۱ درصد) و T7 (۴۴ درصد) رویان بدنی مشاهده شد (شکل ۲)

در بیشتر تیمارهای مورد بررسی کالوس‌ها قهوه‌ای نشدند، تنها در چهار تیمار قهوه‌ای شدن کالوس‌ها مشاهده شد (شکل ۳). بیشترین قهوه‌ای شدن کالوس‌ها (۲۰ درصد) در تیمارهای T4 و T5 مشاهده شد (شکل ۳ و شکل ۶-ز). در تمام تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشدی همراه با شیره نارگیل، زغال فعال و کازئین هیدرولیزات، به‌جز تیمار T18 (۱۱ درصد)، هیچ‌گونه قهوه‌ای شدن کالوس تولید نشد (شکل ۳). کالوس‌های حاصل از تیمارهای مختلف به‌جز در تیمارهای T4 و T16 نکروزه نشدند (شکل ۴ و شکل ۶-ه). در واقع بیشتر کالوس‌های حاصل هیچ‌گونه نشانه‌ای از نکروزگی نشان ندادند (شکل ۴). در هیچ‌یک از تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشدی BA و NAA به تنهایی تولید شاخساره انجام نشد (شکل ۵). در حالی‌که در تمام تیمارهای دارای زغال فعال، شیره نارگیل و کازئین هیدرولیزات همراه با BA و NAA، شاخساره تشکیل شد (شکل ۵ و شکل ۶-ب). بیشترین میزان تولید شاخساره (۴۳/۳ عدد) در تیمار T10 مشاهده شد (شکل ۵).

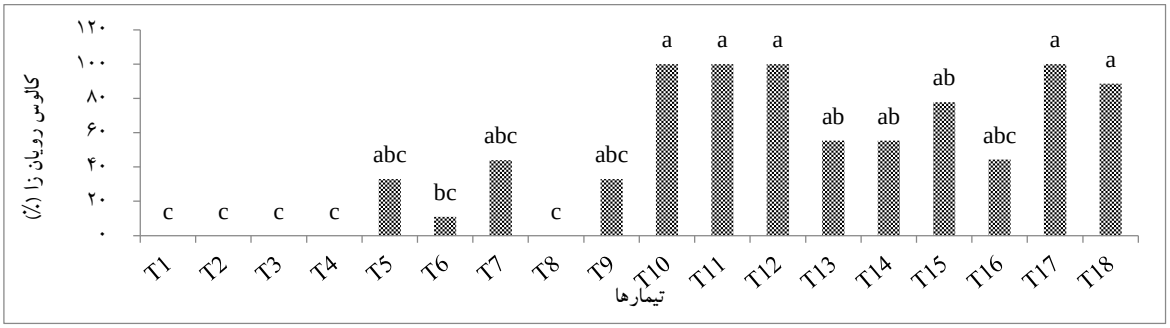
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر تولید کالوس رویان‌زا و میزان سازگاری آنها

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		رنگ کالوس	کالوس تمایزنیافته	کالوس رویان‌زا	کالوس اندام‌زا	درصد قهوه‌ای‌شدن	نکروز شدن	تعداد شاخساره
تیمار	۱۷	۰/۶۹**	۱۹/۸۴**	۱۴/۴۸**	۰/۳۶**	۲/۷۵*	۲/۱۵**	۸/۳۲**
خطای‌آزمایش	۳۶	۰/۱۶	۰/۲۶	۲/۰۴	۰/۱۳	۱/۳۰	۰/۸۰	۰/۷۶

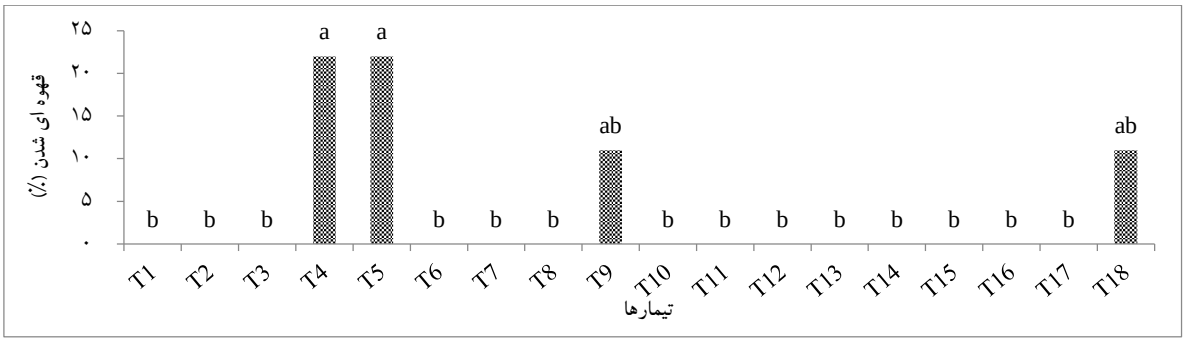
** و *: به‌ترتیب دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد



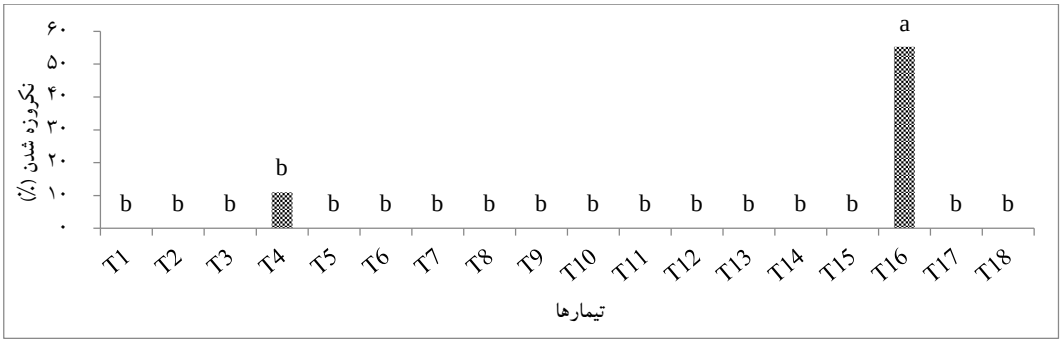
شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف بر رنگ کالوس‌ها (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند).



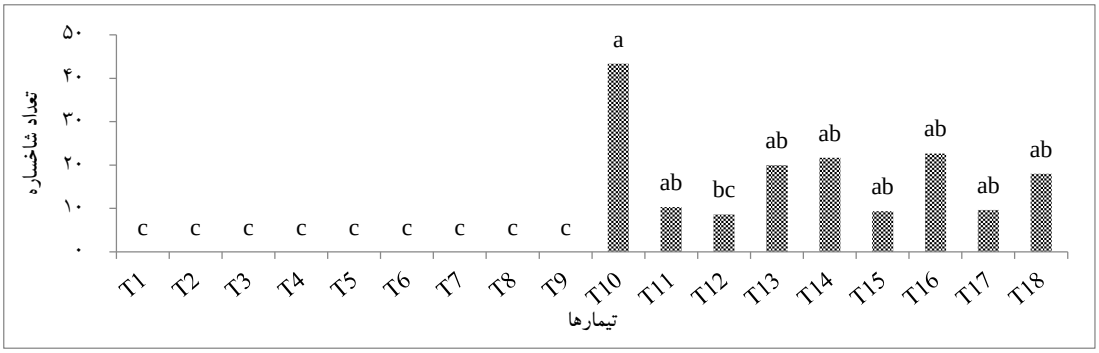
شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف بر تولید کالوس‌های رویان‌زا (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند).



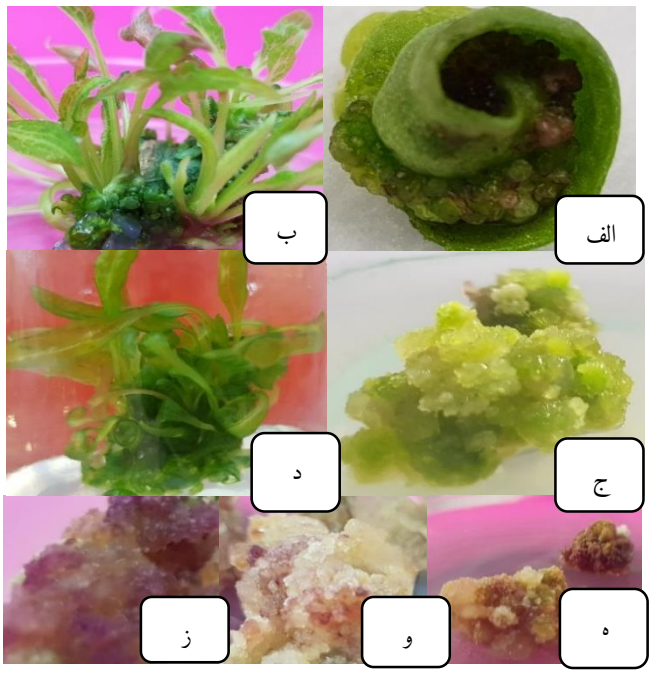
شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف بر قهوه‌ای شدن کالوس‌ها (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر درصد نکروزه شدن کالوس‌ها (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند).



شکل ۵- اثر تیمارهای مختلف بر میزان تولید شاخساره (ستون‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند).



شکل ۶- تولید الف) رویان‌های حاصل از کالوس ریزنمونه برگی به‌دست آمده از ترکیب **BA+NAA** با زغال فعال، شیره نارگیل و کازئین هیدرولیزات و ب) رویان‌های باززا شده به گیاهچه، ج) کالوس‌های اندامزا، د) گیاه باززا شده از کالوس اندامزا، ه) کالوس قهوه‌ای شده و تمایزنیافته، و) کالوس سفید و باززا نشده و ز) کالوس تمایزنیافته.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که اندام‌زایی و رویان‌زایی بدنی گیاه سرخارگل با استفاده از BA، NAA، شیره نارگیل، زغال فعال و کازئین هیدرولیزات ممکن است. از مهمترین دستاوردهای این پژوهش می‌توان به: ۱) استقرار دانهال‌های سترون در محیط کشت، ۲) توسعه پروتکل برای باززایی درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های برگی و ۳) تشکیل رویان‌های بدنی و باززایی آنها با استفاده از ترکیب BA و NAA و نیز کازئین هیدرولیزات، شیره نارگیل و زغال فعال اشاره نمود.

بسیاری از عوامل مؤثر بر باززایی و رشد و نمو گیاهان هنوز کاملا شناخته شده نیستند. به‌طوری‌که برهم‌کنش مواد غذایی، بیوشیمیایی و محیطی می‌تواند بر مسیر توسعه سلول‌ها اثر بگذارد (Choffe *et al*., 2000). Skoog و Miller (۱۹۵۷) گزارش کردند که مسیر مورفوژنی ریزنمونه‌ها عمدتا توسط نسبت اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها تعیین می‌شود. همچنین، محققان گزارش کردند که اکسین برای القا و سیتوکنین برای باززایی در بافت‌های گیاهی کشت شده لازم است (Steward *et al*., 1964).

در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA بر رویان‌زایی بدنی گیاه سرخارگل در ریزنمونه برگ مورد مطالعه قرار گرفت. اگرچه همه سلول‌های گیاه حاوی تمام اطلاعات ژنتیکی لازم برای به‌وجود آوردن یک گیاه کامل هستند، اما تیمارهای مختلف برای تولید کالوس‌های رویان‌زا توانایی یکسانی ندارند (Pola & Sarada, 2006). علت آن ممکن است به سطح هورمون‌های درونی ریزنمونه‌ها مربوط باشد و اینکه سطح هورمون‌های درون‌زا با استعداد رویان‌زایی ریزنمونه‌ها مرتبط باشد. در گونه‌های استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) (Rezaei *et al*., 2019)، وشا (*Dorema ammoniacum* D.) (Ghasemian *et al*., 2012) و رازیانه (*Foeniculum vulgare* Miller) (Hunault *et al*., 1989) گزارش کرده‌اند که رویان‌زایی بدنی عمدتا در مرحله القای کالوس رخ می‌دهد. در این تحقیق حضور مقادیر اندک سیتوکنین BA به‌همراه غلظت‌های بالای اکسین NAA حداکثر تولید کالوس‌های رویان‌زا را به دنبال داشت که با نتایج Ghasemian و همکاران (۲۰۱۲) روی وشا مطابقت داشت. سلول‌ها به هورمون‌های گیاهی به‌ویژه اکسین و سیتوکنین برای فعال شدن سلول‌های بدنی و ورود به چرخه سلولی نیازمندند. در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین‌ها ازجمله متداول‌ترین ترکیبات استفاده شده برای گذر از مرحله رویشی به مرحله رویانی هستند. هنگامی که شرایط مناسب باشد و به‌محض تحریک کافی، احتمالاً با برقراری یک شیب اکسین درونی در ریزنمونه‌ها رویان‌زایی انجام می‌شود (Jimenez & Bangerth, 2001) از سوی دیگر، سطوح بالای اکسین از رشد و نمو مریستم نوشاخه‌ها ممانعت می‌کند. اگر غلظت اکسین کم باشد، پس از تشکیل لپه، شکل‌گیری مریستم ساقه خیلی سریع انجام و بعد در شرایط مناسب محیط کشت جوانه‌زنی زودرس انجام می‌شود (Pareek, 2005).

مطلب قابل توجه در این پژوهش تولید رویان‌های بدنی به صورت غیرمستقیم بود. منظور از رویان‌زایی غیرمستقیم، تشکیل کالوس روی ریزنمونه و بعد ایجاد رویان و شاخساره از آن است (Sharp *et al*., 1986). ابتدا کالوس روی برخی از ریزنمونه‌های برگ سرخارگل تشکیل شد و بعد شاخساره از کالوس‌های رویان‌زا به‌وجود آمد. در نتیجه ارتباط آوندی میان شاخساره‌ها و بافت گیاه (ریزنمونه) به‌صورت پراکنده در توده کالوس تمایز نیافته مشاهده شد. در سایر بخش‌ها سلول‌های زیر اپیدرم تمایز نیافته و تولید رویان‌های بدنی در سلول‌های اپیدرمی انجام شد. نتایج حاصل با گزارش Choffe و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت داشت. آنان طی مطالعات هیستولوژیک و مورفولوژیک نشان دادند که یک لایه کالوس ابتدا روی ریزنمونه‌های دمبرگ تشکیل شد و باززایی شاخساره‌ها از روی کالوس انجام گردید. البته ارتباط آوندی شاخساره با بافت ریزنمونه تنها در کالوس‌های تمایزنیافته قابل مشاهده بود. در سایر بخش‌های دمبرگ، سلول‌های زیراپیدرم تمایز پیدا نکردند و کالوس تشکیل ندادند و رویان بدنی تنها روی

سلول‌های اپیدرمی تشکیل شد. نکته قابل توجه اینکه کالوس‌های رویان‌زا در این پژوهش به رنگ سبز تیره، منسجم و با رشد سریع‌تر بودند، در حالی‌که Peyvandi و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که کالوس رویان‌زا در زیتون متراکم، به رنگ سفید متمایل به زرد، با ساختار گره‌دار و کند رشد است.

در این پژوهش رویان‌های بدنی از ریزنمونه برگ در گیاه دارویی سرخارگل حاصل شد. اثر مثبت افزودن کازئین هیدرولیزات به محیط کشت برای تمایز رویان بدنی در سرخارگل مشخص شد، به‌طوری‌که با افزودن کازئین هیدرولیزات به محیط کشت، افزایش در تولید رویان بدنی را در پی داشت که مطابق با یافته‌های Mauro و همکاران (۱۹۸۶) و Mahmood و همکاران (۲۰۱۳) روی انگور و Rezaei و همکاران (۲۰۱۹) روی گیاه استویا بود. Mauro و همکاران (۱۹۸۶) رویان بدنی را تنها در محیط‌های حاوی کازئین هیدرولیزات به‌دست آوردند. Mahmood و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که بیشترین میزان رویان-زایی در ارقام انگور "یاقوتی" و "بی‌دانه سفید" با ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات و در رقم "شاهرودی" با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. Rezaei و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیشترین رویان بدنی را در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات به‌دست آوردند. وجود کازئین هیدرولیزات بر رویان‌زایی تأثیر مثبتی نشان داد، به‌طوری که در کنار استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، تیمارهای حاوی کازئین هیدرولیزات و شیره نارگیل به‌طور معنی‌داری نسبت به محیط‌های فاقد این ترکیبات رویان‌زایی بالاتری نشان دادند. در کازئین هیدرولیزات اسیدهای آمینه لازم برای رویان‌زایی مانند گلوتامین، پرولین، آلانین، سرین و گلیسین وجود دارد. اسیدهای آمینه پرولین و سرین از طریق افزایش میزان هورمون‌های داخلی باعث افزایش فعالیت‌های میتوزی سلول‌ها شده و به این وسیله تشکیل توده‌های سلولی پیش رویان‌زا افزایش می‌یابد (Nutironchi *et al*., 1984). طی بررسی‌هایی که توسط Sanjabi (۲۰۱۶)، برای بررسی القای رویان‌های بدنی اولیه از جدا کشت برگ نارون ملج (*Ulmus glabra*) روی محیط کشت MS حاوی سیتوکنین‌های مختلف و اکسین 2,4-D به همراه غلظت ثابت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات انجام شد، وجود کازئین هیدرولیزات در رویان‌زایی و میانگین تعداد رویان اثر مثبتی داشت که با نتایج حاصل از این پژوهش و نیز Rezaei و همکاران (۲۰۱۹) روی استویا مطابقت داشت. اسیدآمینه‌های آلی موجود در کازئین هیدرولیزات می‌توانند جایگزینی مناسب برای آمونیوم معدنی و مکمل نیترات باشند. همچنین جذب نیتروژن از طریق یک منبع آلی مثل کازئین هیدرولیزات بسیار آسان‌تر و سریع‌تر از منابع غیرآلی است (Thom *et al*., 1981).

فراورده‌های آندوسپرمی به‌ویژه شیره نارگیل دارای فعالیت‌های سیتوکینینی هستند. این محصولات طبیعی دارای منبع نیتروژنی احیا شده و طیفی از ترکیبات پیچیده شیمیایی هستند که قادر به تحریک رشد و اندام‌زایی می‌باشند (Arvin, 2000). اخیرا تجزیه شیره نارگیل نشان داده است که الیگوساکاریدهای متفاوتی در آن وجود دارد که بعضی از آنها دارای فعالیت‌های تنظیم کننده رشدی می‌باشند (White *et al*., 1989). قهوه‌ای شدن بافت‌ها اتوکاتالیزور است، تراوش‌های سمی فنلی موجب جراحت شده و در نتیجه باعث افزایش تراوش ترکیبات فنلی و در نهایت قهوه‌ای شدن بافت می‌گردد (Bagheri *et al*., 2004). در کشت‌های کالوس کاج (*Pinus sylvestris*) شروع قهوه‌ای شدن با افزایش سنتز پروتئین و نشاسته و کاهش تولید همراه بوده است. پس از آن که قهوه‌ای شدن شدیدتر گردید، سنتز پروتئین کاهش یافته و تخریب بافت آغاز می‌گردد (Lindfors *et al*., 1990). از سویی قهوه‌ای شدن بافت‌های گیاهان چوبی در محیط کشت به تجمع کینون‌های حاصل از فعالیت سیستم آنزیمی پلی‌فنل اکسیداز نسبت داده شده است، این موضوع می‌تواند ناشی از آلودگی مایکوباکتریایی نیز باشد (Sadeghi *et al*., 2006).

با توجه به نتایج این پژوهش برای رویان‌زایی بدنی گیاه دارویی زینتی سرخارگل، استفاده از سطوح بالای BA،

مقادیر اندک NAA به‌همراه زغال فعال، شیره نارگیل و کازئین هیدرولیزات توصیه می‌شود. امید است نتایج حاصل از این پژوهش برای تکثیر انبوه گیاه، مطالعات ژنتیکی و بیوتکنولوژی و نیز تولید بذر مصنوعی مورد استفاده محققان قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Abbasi, B.H., Saxena, P.K., Murch, S.J. and Liu, C.-Z. 2007. Echinacea biotechnology: challenges and opportunities. In Vitro Cell Development Biology Plant, 43: 481–492.
- Ahmad, K.M., Zafar, Z. and Mirza, J.I. 2017. Effect of plant growth regulators on shoot organogenesis and somatic embryogenesis of *Echinacea purpurea* L. Pakistan journal of life and social Sciences, 15(2): 107-113.
- Annadana, S., Radamaker, W., Rammana, M., Udayakumar, M. and de Jong, J. 2000. Response of stem expiants to screening and expiant source as a basis for methodical advancing regener? ation protocols for for chrysanthemum. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 62: 47-55.
- Arvin, M.J. 2002. Tissue culture of wood trees. Shahid Bahonar univ. of Kerman. univ. Press. 279 pp. (In Persian).
- Bagheri, A., Ziaratnia, M. and Hossaini, M. 2004. Tissue culture of trees. univ. of Ferdowsii, univ. Press. Mashhad, Iran. 205 pp. (In Persian).
- Chae, W.B., Choi, G.W. and Chung, I.S. 2004. Plant regeneration depending on expiant type in *Chrysanthmum coronarium* L. Journal of Plant Biotechnology, 6: 253-258.
- Choffe, K.L., Victor, J.M., Murch, S.J. and 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.
- Ghasemian, Kh, Nazeri, S., Chehregani Rad, A., Mirzaie Asl, A. 2012. The Stages of Somatic Embryogenesis Derived from Zygotic Embryo of *Dorema ammoniacum* D.. Journal of Cell & Tissue, 3(1): 21-27. (In Persian)
- Gruenwald, J., Brendler, T. and Jaenicke, C. 1999. DDR for herbal medicines. Medical Economics Co., New Jersy, USA.Li, Th.S.C. 1998. Echinacea: Cultivation and medicinal value. Hort. Technology, 8: 122-129.
- Hunault, G., Desmarest, P., Manoir, J.D. 1989. *Foeniculum vulgare* Miller: cell culture, regeneration and the production of anethole In: Bajaj YPS Ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 185-212.
- Jain, S.M. and Gupta, P.K. 2005. Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, 497–504. Springer. Printed in the Netherlands.
- Jimenez, V. M. and Bangerth, F. 2001. *In vitro* culture and endogenous hormone levels in immature zygotic embryos, endosperm and callus culture of normal and high-lysine barley genotypes. Journal of Applied Botany, 75: 1-7.
- Joshi, R. and Kumar, P. 2013. Regulation of somatic embryogenesis in crops: a review. Agricultural Revolution, 34 (1): 1–20.
- Khosravi, S., Azghandi, A.V., Hadad, R. and Mojtahedi, N. 2007. *In vitro* micrpropagation of *Lilium longiflorum*. Journal of Agricultural Research: Seed and Plant. 23: 159- 168.
- Karkonen, A. 2001. Plant tissue culture as models for tree: somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies, division of plant physiology university of Helsinki. 75: 22-23.
- Koroch, A.R., Kapteyn, J., Juliani, H.R. and Simon, J.E. 2002. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* transformation of *Echinacea purpurea* leaf explants. In: Janick J, Whipkey A (eds) Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, pp 522–526
- 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 Biotechnology, 77:158–163.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60: 197–214.
- Li, N., Parson, B. L., Liu, D. R. and Mattoo, A. K. 1992. Accumulation of wound-inducible ACC syntheses transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. Plant Molecular Biology, 18: 477-487.
- Lindfors, A., Kuusela, H., Hohtola, A. and Kupila-Ahvenniemi, S. 1990. Molecular correlates of tissue browning and deterioration in scots pine calli. Biology Plant, 32:171-180.
- Mahmood, A.J., Ebadi, A., Omidi, M. and Masoodi, M. 2013. "Effect of different concentrations of sucrose, casein hydrolysate and amino acids on somatic embryogenesis in some grapevine (*Vitis*

and plant breeding and plant research, 27(1): 108-119. (In Persian).
– Sadeghi, H., Khavari-Nejad, R., Fahimi, H. and Falahian, F. 2006. Effect of growth regulators on calli production and callus growth in various pieces of stem tissue culture of Tehran pine (*Pinus eldarica* M.). Journal of Agricultural Sciences & Natural Resources. 13 (4): 128-141.
– Sanjabi, M. 2016. Induction of direct somatic embryogenesis in leaf explants of *Ulmus glabra*. Journal of Plant Researches, 28(4): 885-894.
– Sharp, W.R., Sondhal, M.R. Caldar, R.S, Maraffa, S.B. 1986. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hor. Rev., 2: 268–310.
– Skoog, F.; Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 11:118–140.
– Stanisavijevic, I., Stojicevic, S., Velickovic, D., Veljkovic, V. and Lazic, M. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. Biotechnology and Bioengineering, Bioeng, 17: 478-483.
– Steward, F.C., Mapes, M.O., Kent, A.E. and Holsten, R.D. 1964. Growth and development of cultured plant cells. Biochemical and morphogenic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency. Science, 143:20–27.
– Thom, M., Maretzki, A., Komor, E. and Sakai, W.S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1: 3-14.
– Wang, H.M., To, K.Y. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea*. Plant Science, 166: 1087–1096.
– White, A.R., Elmore, H.W., Watson, M.B. and Gill, J.P. 1989. Purification and partial characterization of polysaccharides from coconut milk. Annals of Botany, 64: 205-209.
– Zamani, E., Dehestani-Ardakani, M., Kamali, K. (2020). Determination of the best culture medium for micropropagation of old Abarkooh cypress plant (*Cupressus semprvirens* var. horizontalis), Iranian Journal of Rangeland and plant breeding and plant research, 27(2): 240-251. (In Persian).
– Zobayed, S.M.A. and 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.

vinifera)cultivars". Journal of Plant Production Research, 20 (1): 157-170.
– Maria, O., Thomsen, M.O., Fretté, X.C., Christensen, K.B., Christensen, L.P, Grevsen, K. 2012. Seasonal variations in the concentrations of lipophilic compounds and phenolic acids in the roots of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallid*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 60:12131–12141.
– Mauro, M. Cl., Nef, C. and Fallot, J. 1986. Simulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Plant Cell Reports, 5: 377-380.
– Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Plant Physio. 15: 473–497.
– 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.
– Nutironchi, V., Caligo, M.A., Nozzolini, M. and Luccarini, G. 1984. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine. Plant Cell Reports, 3: 210-214.
– OmidBeigi, R. 2010. *Production and processing of medicinal plants*, Volume 4, Astan Quds Razavi Printing and Publishing Institute, Mashhad. (In Persian)
– Pareek, L. K. 2005. Trends in plant tissue culture and biotechnology. Agro Botanical Publishers, Nagar Bikaner.
– Perry, N.B., Burgess, E.J. and Glennie, V.L. 2001. *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49 (4): 1702–1706.
– Peyvandi, M., Farahzadi, H., Arbabiyan, S., Hoseynimazinani, M. 2010. Effects of medium on somatic embryogenesis of *Olea europea* L. (cv. Kroneiki). Iranian Journal of Rangeland and plant breeding and plant research, 18(1), 93-101. (In Persian).
– Pola, S.R. and Sarada, M.N. 2006. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Sorghum bicol*or (L.) Moench, from leaf segments. Journal of Cell and Molecular Biology, 5: 99-107.
– Rezaii Gangeh, S., Dehestani-Ardakani, M., Kamali aliabad, K. 2019. The effect of different factors on somatic embryogenesis of stevia plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). Iranian Journal of Rangeland

Somatic embryogenesis of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) medicinal herb

M. Hejazi[1], M. Dehestani-Ardakani[2*], K. Kamali Aliabad[3], M. Rashidi[4]

1. M.Sc. Graduated, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.
2. Assist. Prof., Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran. Email: mdehestani@ardakan.ac.ir
3. Assoc. Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran.
4. M.Sc. Graduated, Department of Animal Sciences, Faculty of Pediatrics, Ardakan University, Ardakan, I.R. Iran.

Received: 18.02.2020 Accepted: 13.06.2020

Abstract

Purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) is a plant species with high medical value. To optimize the somatic embryogenesis protocol for leaf explants of purple coneflower, 18 combined treatments including growth regulators including benzyladenine (BA) at three levels (3, 4 and 5 mg/l), naphtaleneacetic acid (NAA) at three levels (0.1, 0.2 and 0.5 mg/l) with or without 1 g/l activated charchoal, 50 ml/l coconut milk and 50 mg/l casein hydrolysate were used in MS culture medium. Data analyzed usng completely randomized design with three replications and the means of the treatments were compared using Tukey method. The results showed that embryogenesis occurred indirectly with callus formation. Embryogenic calli were dark green, coherent, and showed faster growth. The highest embryogenesis of calli (100 %) as well as embryo regeneration was obtained in the combination of BA and NAA with activated charcoal, coconut milk and casein hydrolysate treatments. Whereas, the treatments of plant growth regulators without coconut milk and casein hydrolysate failed to produce somatic embryos. The maximum number of shoot production (43.3 shoots) was observed in the combined treatment of 3 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA + 1 mg/l activated charcoal + 50 ml/l coconut milk + 50 mg/l casein hydrolysate. In general, application of high levels of BA and small amounts of NAA along with coconut milk and casein hydrolyzate was recommended for the embryogenesis of purple coneflower.

Keywords: Benzyladenine, Coconut milk, Casein hydrolysate, Naphtaleneacetic acid