مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

بررسی ریزازدیادی گیاه دارویی خوراکی چوچاق *Eryngium caucasicum* Trauv.

فاطمه محمودی کردی*، مصطفی عبادی نهاری و زهرا گرامی کشل

ایران، تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

چکیده

چوچاق با نام علمی *Eryngium caucasicum* Trauv. گیاهی چندساله از خانواده چتریان (Apiaceae) است که دارای خواص دارویی متعددی، مانند مسکن، اشتهاآور، مدر، ضد التهاب و اثر آنتی اکسیدانی است. هدف این پژوهش بررسی اثر ترکیب تنظیم کننده‌های رشد بر تولید کالوس، شاخه‌زایی و ریشه زایی گیاه چوچاق در شرایط درون شیشه بود. برگ‌ها و دمبرگ‌های سالم و جوان پس از سترون سازی بعنوان ریز نمونه استفاده شده و در محیط‌های کشت MS، MS ۱/۲ و MS۱/۴ با ترکیبی از هورمون‌های IAA، NAA، BAP و KIN در غلظت‌های متفاوت کشت شدند. در محیط MS با ترکیب هورمونی mgL^{-1} (۰/۱ NAA+۱ BAP) بیشترین درصد کالوس‌زایی وشاخه زایی مشاهده شد. پانزده روز پس از استقرار ریزنمونه ها در محیط کشت، کالوس‌های سفید رنگ تشکیل شدند. پس از ۲۱ روز، نشانه‌های تشکیل شاخه‌های نوپدید آشکار شد. نوشاخه‌های با طول ۲/۵-۲ سانتی متر برای تشکیل ریشه به محیط MS بدون تنظیم کننده رشد منتقل و ریشه‌دار شدند. ضمن تشکیل ریشه، پاجوش‌هایی (شاخسارهایی) از منطقه یقه گیاه نیز ایجاد شد. پس از رشد مناسب ریشه، گیاهان از شرایط درون شیشه خارج و به گلدان های دارای خاک سترون شامل کوکوپیت و پرلیت با نسبت حجمی ۱:۱ منتقل و برای سازش با کاهش تدریجی رطوبت با شرایط خاص در گلخانه نگهداری شدند. در محیط‌های MS، MS۱/۲ و MS۱/۴ ، کالوس‌زایی و پرآوری مطلوب مشاهده شد اما در سازگاری نهایی گیاهان به شرایط خاک، بالاترین درصد (۷۰ درصد) گیاهان ایجاد شده در محیط mgL^{-1} (۰/۱ NAA+۱ BAP)MS مشاهده شدند و در خاک گلدان و باغچه نیز بخوبی رشد کردند.

واژه های کلیدی: باززایی، ریزازدیادی، کشت در شیشه، چوچاق

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۲۴۵۲۰۷۴ ، پست الکترونیکی: fmahmoodi2@yahoo.com

مقدمه

Eryngium caucasicum با نام فارسی چوچاق یکی از گیاهان تیره چتریان است که در سال‌های اخیر بعنوان گیاه زراعی در شمال ایران کشت می‌شود. سرده *Eryngium* از بزرگ‌ترین سرده‌های زیر تیره Saniculoideae است که حدود ۲۳۰-۲۵۰ گونه از این سرده وجود دارد (۳۰،۳۱). این تاکسون گسترش وسیعی در آسیای مرکزی، آمریکای لاتین، اروپای جنوبی و مرکزی و شمال آفریقا و استرالیا دارد (۲۹). این گیاه در بخش قفقازی-شرقی (ترکیه) از جنوب روسیه، قفقاز و شمال شرقی آنتالیا، شرق وشمال ایران، آسیای میانه (جنوب ترکمنستان، پامیر) افغانستان، پاکستان و در برخی از نقاط ایران بویژه در استان‌های مازندران و گیلان پراکنش دارد (۲۱،۲۲،۲۳). رشد بهاره گیاه از فروردین ماه آغاز و در خرداد وارد فاز گل‌دهی شده، سپس در شهریور خزان کرده و وارد رشد کند پاییزه می‌شود (۴). سرده *Eryngium* در ایران، ۹ گونه گیاه علفی خاردار دارد که سرتاسر ایران پراکنده‌اند و از رایج‌ترین آنها می‌توان به *E. caucasicum, E. bungee* و *E. billardieri* نام برد (۵). چوچاق گیاهی دو یا چند ساله است که یک‌بار در طول سال گل می‌دهد. گل آذین آن ۴۰ تا ۸۰ سانتی متر با قطر حدود ۰/۸ تا ۱/۵ سانتی‌متر ، دارای انشعابات دوتایی با شاخه‌های

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

افقی گسترش یافته است. برگ‌ها دارای یک پهنک قلبی تا بیضی شکل هستند (۲۳، ۲۲). خواص دارویی و درمانی این گیاه در بین مردم شمال ایران شناخته شده است و به عنوان آرامش‌بخش اعصاب، محرک قوای جنسی، اشتهاآور، مدر، خلط آور، ضد عفونی کننده، ضد التهاب و تسکین دهنده بیماری‌های رماتیسمی، عفونت‌های گوارشی و سنگ کلیه استفاده می‌شود (۴، ۱۹). با توجه به اهمیت دارویی و فقدان داده کافی در زمینه اهلی سازی این گیاه، تنها منبع در دسترس انسان، گیاهان چوچاق خودرو در باغات و حاشیه مزارع می باشد. مشابه بسیاری از گیاهان دارویی اهلی نشده، برداشت‌های بی‌رویه و تخریب رویشگاه طبیعی، این گیاهان را در معرض فرسایش و خطر انقراض قرار می‌دهد. بنابراین امروزه نیاز به اهلی کردن و کشت گیاهان دارویی در سیستم‌های زراعی افزایش یافته است(۸،۲۵). روش کشت بافت برای بدست آوردن تعداد زیادی گیاه سالم و شبیه گیاه اصلی با ظرفیت تولید بالا بکار می‌رود که به‌این‌ترتیب کمک زیادی به حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری یا گیاهان در خطر انقراض می شود (۲۴، ۲۶). از دیگر برتری‌های ازدیاد گیاهان با روش‌های کشت بافت، می توان به همسان‌سازی و ازدیاد ژنوتیپ‌های مرغوب در مدت زمان کوتاه اشاره کرد (۳). بر این اساس، ریزازدیادی در برخی از گونه‌های *Eryngium* بررسی شده و نتایج مطلوبی بدست آمده است. Kikowoska و همکاران از ترکیب mgL^{-1} (BAP۱ و IAA۰/۱) در ریزازدیادی *Eryngium maritimum* استفاده کرده و ۹۶ درصد ایجاد کالوس و شاخه زایی گزارش کردند. همچنین گزارش کردند که محتوای ترکیبات فنلی مهم با ارزش دارویی، در گیاهان حاصل از کشت بافت به مراتب بیشتر از گیاهان رویش یافته در طبیعت است که این نتیجه برای گیاه دارویی دارای اهمیت می‌باشد (۱۵). گزارش شده است در گیاه *Eryngium viviparum* با استفاده از ترکیب دو نوع سیتوکینین mgL^{-1} (Kin۱، BAP۲) بیشترین تعداد شاخه زایی و در محیط کشت دارای IBA۰/۱میلی گرم بر لیتر، صد درصد ریشه زایی مشاهده شد(۸). در دو پژوهش جدا که روی *Eryngium alpinum* انجام شد، برای ریزازدیادی محیط کشت MS دارای mgL^{-1} (BAP۱ ،۰/۵ IAAو۱ GA_3) و به منظور تولید بذر مصنوعی از محیط کشت دارای mgL^{-1} (BAP ۱ ، IAA۱ و۱ GA_3) استفاده شد(۱۴). بررسی‌هایی که روی باززایی *Eryngium foetidum* انجام شد نشان داد که در محیط MS دارای ۲/۲۲ BAPو۴/۶۵Kin میکرو مولار، بیشترین شاخه‌دهی به همراه بالاترین سازش گیاهچه‌های حاصل در خاک باغچه گزارش شد (۱۱).

گزارشات متعددی در مورد وجود خواب مورفولوژیک در بذور گیاهان تیره چتریان و گونه‌های *Eryngium* وجود دارد که بدلیل مشکل در ازدیاد با بذر، با کمک روشهای مرسوم کشت بافت به تکثیر این گیاهان دست پیدا کرده‌اند (۱۷،۱۴،۱۰،۱۱). با توجه به اهمیت گیاه چوچاق در ایران که در بالا اشاره شد و بر اساس آخرین جستجوها، تا کنون داده‌ای در زمینه اهلی‌سازی و ازدیاد این گیاه با سایر روش‌ها منتشر نشده است، بنابراین ضرورت ازدیاد این گیاه با استفاده از روش‌های متداول کشت بافت و معرفی محیط کشت مناسب برای مراحل مختلف، از پرآوری تا تشکیل ریشه و سازش گیاهان حاصل از کشت در شیشه به خاک گلدان، از اهداف این پژوهش بود که ضمن تحقق این مهم، نتایج این پژوهش می‌تواند برای سایر تحقیقات، از جمله بررسی ترکیبات دارویی و مواد موثره این گیاه مفید باشد و به جای استفاده و برداشت گیاه از منابع طبیعی، از کالوس‌ها و گیاهان حاصل از کشت بافت بعنوان منبع پژوهش‌ها استفاده شود.

مواد و روشها

به منظور ریزازدیادی چوچاق(*Eryngium caucasicum*)، گیاهان کامل دارای اندام‌های هوایی و ریشه، در شهریور سال ۱۳۹۶ از ناحیه شمال ایران، لاهیجان با مختصات جغرافیایی "۱۸/۱۵۲ ´۵۶ °۴۹ شرقی و "۵۴/۳۸۱ ´۱۰ °۳۷ شمالی جمع‌آوری و به گلدان انتقال داده و برای نمونه گیری به آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه شهید مدنی آذربایجان منتقل

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

و نگهداری شدند (شکل ۱ و شکل 5A). با توجه به درصد کم جوانه زنی بذرها و سرعت رشد کند دانه‌رستها تا تبدیل شدن به گیاه مناسب برای تهیه ریز نمونه، تمامی ریز نمونه ها از گیاهان برداشت شده از طبیعت که در گلخانه نگهداری شدند، تهیه شد.

شکل ۱- A-C، چوچاق *(Eryngium caucasicum)* در مراحل مختلف نمو در زیستگاه طبیعی - لاهیجان.

برای شروع کار، ابتدا برگ و دمبرگ سالم قسمت‌های جوان گیاه ۳۰ روزه، به مدت ۵ دقیقه با آب جاری شسته شدند تا آلودگی‌های سطحی حذف شود. مراحل بعدی ضدعفونی نهایی قبل از کشت، زیر هود لامینار و در شرایط کاملا استریل انجام شد. ابتدا پهنک و دمبرگ به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰ درصد، ضدعفونی شده، سپس ۲ تا ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد و چند قطره مایع شوینده قرار گرفتند، پس از آن نمونه‌ها با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو و برای از بین بردن اثر هیپوکلریت سدیم، قطعات پهنک و دمبرگ با آب مقطر درسه مرحله به مدت ۵ دقیقه آبکشی شد و پس از خشک کردن روی کاغذ صافی ، به قطعات ۱تا ۲ سانتی متری برش داده و در ظروف پتری محیط های MS (۱۸،۲۱)، MS۱/۲ و MS۱/۴ تهیه شده با ترکیب‌های مختلف از تنظیم کننده های رشد، Kin و BAP با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر ؛ NAA و IAA با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کشت شدند (جدول۱). طرح آماری مورد استفاده، آزمایش فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با سه تکرار و دو فاکتور بود. فاکتور A نوع ریزنمونه در دو سطح؛ پهنک و دمبرگ و فاکتور B پیش تیمار هورمونی با هشت سطح بود. به منظور بررسی اثر نوع محیط و غلظت تنظیم کننده های رشد و نوع ریزنمونه بر مسیر باززایی، برای هر تیمار سه تکرار و تعداد کل از هر ریزنمونه برای هر نوع محیط، ۲۴ عدد در نظر گرفته شد. پس از پایان مرحله کشت، نمونه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. ۱۵ روز پس از کشت، پارامترهایی مانند تعداد کالوسهای ایجاد شده در هر ریزنمونه و در پی آن تعداد نوشاخه‌های باززا شده از کالوس‌های مذکور محاسبه شد. با توجه به اهمیت رنگ کالوس‌های ایجاد شده در موفقیت مراحل بعدی، رنگ کالوس به عنوان فاکتور موثر یادداشت شد. هر چند از ابتدای آزمایش برای بررسی اثر نور و تاریکی بر شدت کالوس‌زایی هر دو تیمار اعمال شد، اما با توجه به عدم تفاوت مشهود در مقدار کالوس‌زایی بین این دو؛ در ادامه، تیمار تاریکی حذف شد.

بست و یک روز پس از کشت ریزنمونه‌ها، نوشاخه های ایجاد شده بر روی کالوس‌ها که طولی حدود ۲/۵-۲ سانتی متر داشتند، از محل اتصال به کالوس جدا و برای ایجاد و رشد ریشه به محیط MS بدون تنظیم کننده رشد و دارای ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA منتقل شدند، در این مرحله

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

برای ارزیابی تاثیر محیط های القاء کالوس و شاخه زایی، شاخه های ایجاد شده در محیط‌های شماره یک تا هشت، جداگانه به محیط القاء ریشه منتقل شدند. پس از تشکیل ریشه‌ها و رشد مناسب، در هر محیط تعداد قلمه های ریشه دار شده محاسبه و درصد گیری شد.

مرحله سازگاری با هدف انتقال گیاهچه های ریشه دار شده از شرایط کشت در شیشه و محیط کشت مصنوعی به خاک و سازگار کردن آنها با شرایط طبیعی محیط انجام شد. به این منظور گیاهچه های ریشه دار شده با پنس و با احتیاط از محیط کشت خارج و برای حذف باقیمانده آگار از سطح ریشه ها، با آب شستشو شدند. به منظور جلوگیری از آلودگی‌های قارچی، مخلوط خاک مورد استفاده شامل کوکوپیت و پرلیت با نسبت حجمی ۱:۱ اتوکلاو شد. پس از استقرار گیاهچه‌ها در گلدانها، برای حفظ رطوبت درپوش پلاستیکی بر روی آنها قرار داده و برای ایجاد سازش تدریجی با ایجاد سوراخ‌هایی روی درپوشها گذاشته شد. گلدانها در شرایط اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای $25 \pm 1^{\circ}C$ نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: آماده سازی داده‌ها در برنامه Excel انجام شد، پس از تجزیه تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش‌ها، مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون پس تجربی توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel ver. 2013 استفاده شد.

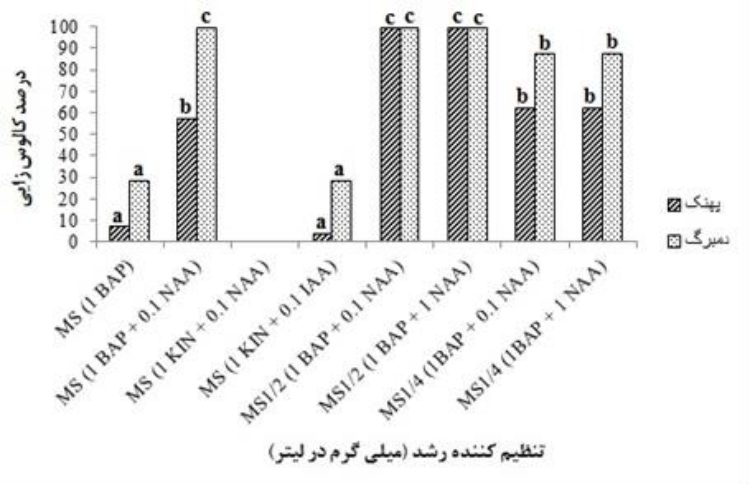
نتایج

القاء و باززایی کالوس: بررسی اثر تنظیم کننده های رشد و نوع ریزنمونه‌ها در سرعت ایجاد و اندازه کالوس، درصد تشکیل کالوس، نشان داد برای این معیار در برخی از محیط‌ها تفاوت معنی داری ($P\leq ۰/۰۵$) وجود دارد (شکل۲). پانزده روز پس از کشت نمونه ها در محیطهای ۵،۲و۶ با ترکیب تنظیم کننده های رشد یکسان بیشترین درصد کالوس زایی (۱۰۰٪-۹۰) مشاهده شد. در محیط های ۵ و ۶ هر دو ریز نمونه برگ و دمبرگ بیشترین درصد کالوس‌زایی و در محیط شماره ۲ فقط ریزنمونه دمبرگ بیشترین کالوس‌زایی را نشان داد. محیطهای ۵ و۶ که به لحاظ محتوای عناصر میکرو و ماکرو دارای قدرت نیم و یک چهارم‌اند در فرآیند کالوس زایی در ریزنمونه برگ و دمبرگ کاملا موفق عمل کردند. بررسی اثر عامل نور و تاریکی نشان داد که کالوس‌زایی در حضور نور به میزان بیشتر و کالوسهای با رنگ روشن و مطلوب ایجاد می‌کند(شکل 5A) ، بنابراین در مراحل ابتدایی آزمایش تیمار تاریکی حذف شد(داده های مربوطه آورده نشده است). همچنین نتایج نشان داد کاربرد BAPبه تنهایی به میزان خیلی کم باعث کالوس‌زایی می‌شود و توده کالوسهای کوچک و به رنگ قهوه‌ای ایجاد می‌کند و در مقایسه با محیط دارای BAP و NAA؛ ترکیب Kin با IAA وNAA عملکرد مناسبی نشان نداد. از بین دو سیتوکینین (BAP, Kin) به‌کار رفته به منظور کالوس‌زایی، BAP نتایج بسیار بهتری نشان داد. محیط ۳ کالوس‌زایی ناموفقی داشت و ترکیب تنظیم کننده های رشد برای القاء تقسیم سلولی و ایجاد کالوس کافی و مناسب نبود(جدول۱ و شکل۲).

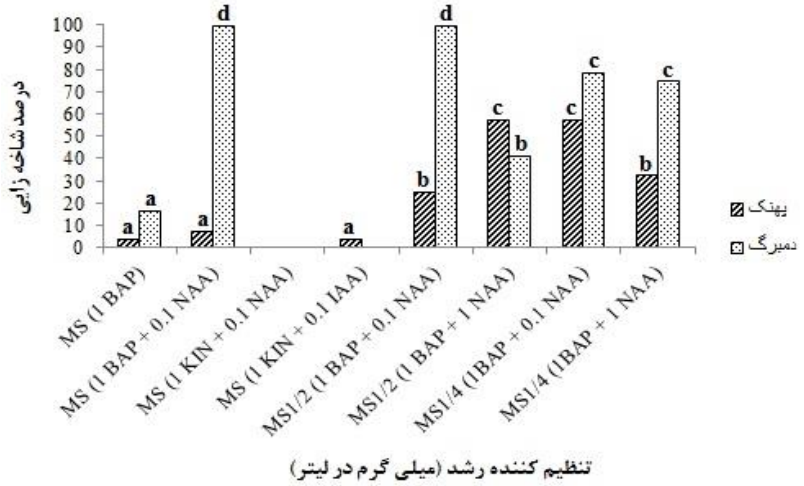
شاخه زایی و ریشه زایی: بیست ویک روز پس از تشکیل توده های کالوس، رنگ آنها به سبز تغییر یافت و در همان محیطهای ۸-۱ القاء و ایجاد کالوس، نوشاخه ها از باززایی غیرمستقیم کالوسها تشکیل شدند. در این مرحله کالوس‌های حاصل از ریز نمونه دمبرگ به ویژه در محیط‌های ۲و۵ بیشترین درصد شاخه زایی را نشان دادند(جدول ۱، شکل۳و D- ۵). در محیط شماره یک که دارای BAP و فاقد اکسین است، درصد شاخه زایی بسیار پایین گزارش شد. همچنین درصد شاخه زایی در محیط‌های دارای کینتین بسیار پایین بود(جدول۱، شکل۳) و نتایج نشان داد که این سیتوکینین برای شاخه‌زایی و پرآوری گیاه چوچاق انتخاب مناسبی نیست. محیط کشت شماره ۶ با ترکیب mgL^{-1} (۱ BAP ۱+NAA) و ریزنمونه های پهنک و دمبرگ، هر چند بازده صد درصدی در ایجاد کالوس داشتند اما به دلیل

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

تشکیل ریشه های نابه‌جای فراوان در سطح کالوس، برای تشکیل نوشاخه مناسب نبودند(شکل E –۵). نتایج نشان داد که افزایش مقدار NAA به همراه BAP می‌تواند به نفع کالوس زایی و مانع شاخه زایی باشد.



شکل۲- مقایسه میانگین تاثیر محیط‌های MS، MS۱/۲ و MS۱/۴ دارای تنظیم کننده های رشد و ریز نمونه دمبرگ و برگ بر نرخ باززایی کالوس در گیاه چوچاق. در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال آماری ۵ درصد، اختلاف معنی دار ندارند.

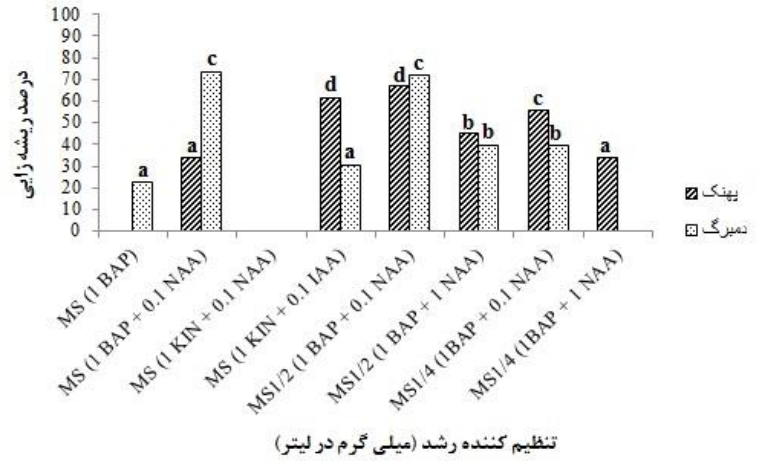


شکل۳- مقایسه میانگین تاثیر محیط کشت ، تنظیم کننده های رشد و نوع ریز نمونه در شاخه زایی چوچاق. در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ ، اختلاف معنی دار ندارند.

در مرحله ریشه زایی، نوشاخه های باززا شده حاصل محیطهای ۸-۱، در محیط MS فاقد تنظیم کننده، پاسخ های القاء و رشد ریشه متفاوتی بسته به محیطی که باززایی شاخه در آن رخ داده بود، نشان دادند(جدول۱ و شکل ۴). بیشترین درصد ریشه زایی مربوط به نوشاخه های حاصل از ریزنمونه دمبرگ رشد یافته در محیط‌های ۵و۲ بود، این نتیجه نشان می دهد ترکیب مناسب محیط شاخه زایی می تواند بر روند باززایی ریشه اثرگذار باشد. شکل F–۵ نمونه ای از نوشاخه ایجاد شده از محیط شاخه زایی شماره دو است که در محیط القاء و رشد ریشه مستقر شده است. یک هفته پس از استقرار در محیط ریشه زایی، تشکیل و رشد ریشه‌ها از قاعده نوشاخه‌ها مشاهده شد، در برخی از نمونه‌ها علاوه بر ریشه

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

زایی در این محیط، پاجوشهایی از محل یقه ایجاد شد (شکل۶-A)، این تعداد از گیاهان، در خاک گلدان سریعتر سازش یافته و رشد مناسبی داشتند.



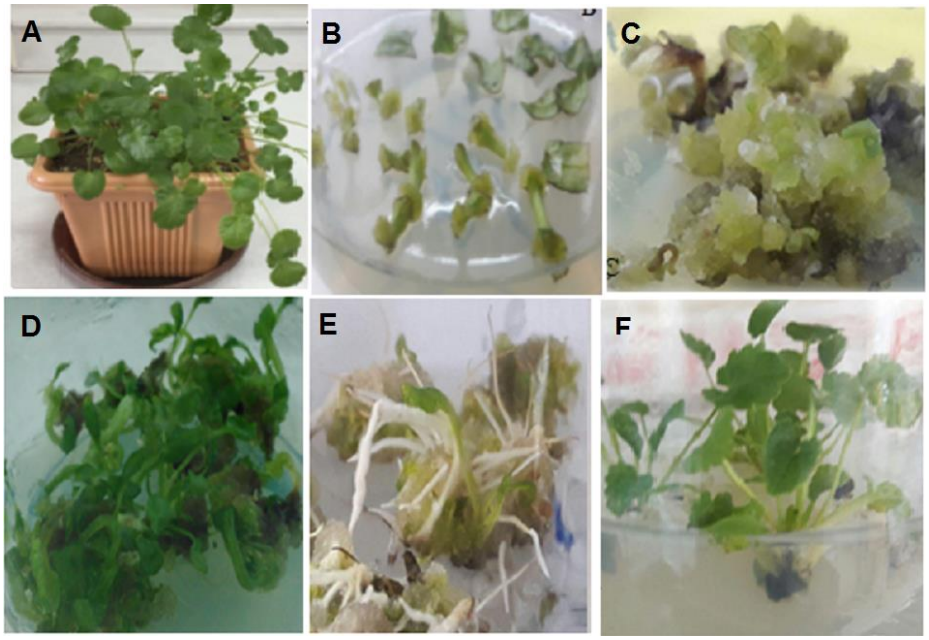
شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر ریز نمونه، محیط کشت و تنظیم کننده های رشد محیط‌های شاخه زایی در فرآیند ریشه زایی چوچاق. محیط ریشه زایی MS بدون تنظیم کننده رشد انتخاب شد که در شکل نشان داده نشده است.

پس از ریشه زایی مناسب، مرحله انتقال گیاهچه ها برای سازگاری به شرایط خارج از کشت در شیشه مطابق روشی که در مواد و روشها شرح داده شد، انجام شد(شکل۶). در مرحله سازش تدریجی به شرایط خاک گلدان و گلخانه، گیاهانی که در مراحل قبل، از محیط MS حاصل شده‌اند نسبت به گیاهان حاصل از محیطهای MS۱/۲ و MS ۱/۴ ، سازگاری بیشتری با شرایط گلخانه و خاک گلدان داشتند. شکل ۶-D یکی از گیاهان حاصل از کشت بافت را پس از دو ماه رشد در گلخانه نشان می دهد.

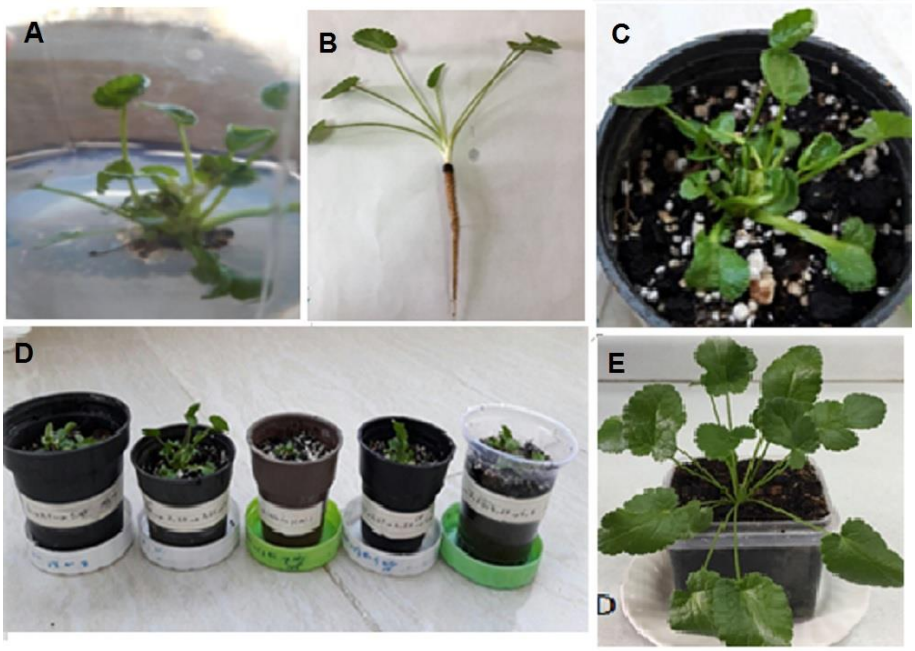
جدول ۱- تاثیر نوع محیط، تنظیم کننده های رشد و نوع ریزنمونه بر فرآیند باززایی (ایجاد کالوس، شاخه‌زایی و ریشه زایی) در گیاه چوچاق. محیط ریشه‌زایی، MS فاقد تنظیم کننده رشد است.

ریزنمونه پهنک برگ				ریزنمونه دمبرگ				تنظیم کننده های رشد mgL^{-1}					
درصد کالوس زایی	درصد شاخه‌زایی	درصد ریشه‌زایی	رنگ کالوس	درصد کالوس زایی	درصد شاخه‌زایی	درصد ریشه‌زایی	رنگ کالوس	IAA	Kin	NAA	BAP	محیط کشت	
۰	۰	۰	قهوه‌ای	۲۹/۲	۹/۷	۲۲/۲	قهوه‌ای	۰	۰	۰	۱	MS	۱
۵۸/۳	۵	۳۳/۳	سبز	۹۱/۶	۹۴	۷۳/۲	سبز	۰	۰	۰/۱	۱	MS	۲
۰	۰	۰	قهوه‌ای	۰	۰	۰	قهوه‌ای	۰	۱	۰/۱	۰	MS	۳
۶۲/۵	۵/۳۳	۶۱	قهوه ای	۳۰	۰	۳۰/۳	قهوه‌ای	۰/۱	۰	۰	۱	MS	۴
۱۰۰	۱۹/۵	۶۶/۷	سبز/سفید	۱۰۰	۹۲/۸	۷۱/۲	سبز	۰	۰	۰/۱	۱	MS۱/۲	۵
۱۰۰	۵۹/۱	۴۴/۵	سبز/سفید	۱۰۰	۴۳/۳	۳۹/۴	سبز/سفید	۰	۰	۱	۱	MS۱/۲	۶
۶۲	۳۴	۵۹/۵	سبز	۷۰	۷۳	۳۹	سبز	۰	۰	۰/۱	۱	MS۱/۴	۷
۶۵/۳	۳۳/۷	۳۳/۳	سبز	۹۰	۶۴	۰	سبز	۰	۰	۱	۱	MS۱/۴	۸

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197



شکل ۵ – مراحل ریز ازدیادی گیاه چوچاق ، A :نمونه‌ی گیاه برداشت شده از رویشگاه طبیعی برای تهیه ریز نمونه، B.: کالوس زایی سریع دمبرگ در مقایسه با قطعات پهنک برگ در محیط شماره دو، C : رشد توده کالوس حاصل از دمبرگ و سبز شدن کالوس ها در محیط ۲ mgL^{-1} (۰/۱ BAP۱+NAA)، D : باززایی و رشد نوشاخه ها از کالوسهای ریز نمونه دمبرگ در محیط۲، E: باززایی نوشاخه از ریزنمونه پهنک درمحیط شماره ۶ و تشکیل ریشه های نابه‌جا در سطح کالوس ، F: انتقال نوشاخه‌های تشکیل شده در محیط شماره دو به محیط ریشه‌زایی(MS بدون تنظیم کننده رشد) برای ایجاد ریشه و پاجوش.



شکل۶- مراحل انتقال و سازگاری گیاهچه‌های چوچاق حاصل از کشت بافت به شرایط خاک و گلخانه A: گیاه کامل حاصل از باززایی در محیط کشت شماره دو B: گیاهچه کامل با ریشه راست و مناسب برای انتقال به مخلوط خاک پرلیت و کوکوپیت C: استقرار گیاه در خاک و سازش تدریجی با شرایط گلخانه D: استقرار و رشد گیاهان حاصل از هر یک از محیطهای شاخه زایی پس از سازش با شرایط گلخانه E: یکی از گیاهان حاصل از محیط کشت شماره دو پس از دو ماه نگهداری در فضای گلخانه.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

بحث

غلظت مناسب هورمون‌ها برای القاء کالوس در ریزنمونه ها و شاخه زایی و ریشه زایی از این کالوس‌ها، بر اساس گونه گیاه، ژنوتیپ، نوع تنظیم کننده رشد استفاده شده در محیط کشت، مرحله رشد گیاه مادری و نوع ریزنمونه متفاوت است، بنابراین بر اساس هدف مورد نظر در فرایندهای کشت بافت و نوع ریزنمونه استفاده شده، محیط‌های با تنظیم کننده های رشد مناسب باید استفاده کرد (۳۲). بهترین کالوس زایی از جدا کشت دمبرگ در محیط کشت شماره دو انجام شد که می تواند به توزیع قطبی و نامتقارن اکسین در این اندام مرتبط باشد (۱). تفاوت پاسخها به کالوس زایی در دو ریزنمونه موردی است که در نتایج پژوهش‌هایی که روی *Eryngium foetidum* ، *Eryngium campester* و *Eryngium maritimum*نیز مشاهده شد(۱۵،۱۳،۱۱) و در منابع کشت بافت هم به این مورد تاکید شده که پاسخ متفاوت بر حسب نوع ریزنمونه ها در محیط مشابه، نشان دهنده قابلیت و توان بافتها و سلولهای متفاوت ریزنمونه ها است (۳). برای شاخه زایی و پرآوری حضور حداقل یک سیتوکینین ضروریست که با کاهش سرچیرگی مریستم راس ظهور نوشاخه‌های متعدد را موجب می شوند(۸،۶). استفاده از BAP در غلظت مؤثر می‌تواند محیط مناسبی برای ایجاد کالوس و شاخه‌زایی و رشد مناسب شاخه‌های ایجاد شده فراهم کند (۱۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از بین دو سیتوکینین BAP و Kin برای القای کالوس توسط ریز نمونه دمبرگ، BAP پاسخ مناسبی داده که با نتایج قدیری سردرود و همکاران بر روی کشت در شیشه گیاه *Centella asiatical* L. موافقت دارد(۲). ترکیب NAA و BAP توانست ضمن کالوس‌زایی، اندام‌زایی موفقی هم داشته باشد که مشابه نتایج در گیاهان*Eryngium vivparum* ، *E.foetidum* و *E.maritimum* است(۱۴). تنظیم سطح اکسین و سیتوکینن نقش مهمی در شاخه زایی، نمو آنها و ریخت‌زایی و اندام‌زایی دارد (۲۷). غلظتهای بالاتر سیتوکینین ممکن است منجر به تشکیل نوشاخه های کوچک با بافتهای آبدار شود که نتیجه مطلوبی نیست و ضمنا در مرحله ریشه زایی ایجاد مشکل می کند (۱۷). اهمیت تعادل اکسین و سیتوکینن در شکل‌گیری شاخه و تکثیر آن در سایر گونه های *Eryngium* گزارش شده است (۱۴،۱۱). بررسی نتایج این پژوهش نشان داد که اندام‌های نوپدید ابتدا و با فراوانی بیشتر در حاشیه کالوس و در محل ارتباط کالوس با محیط کشت به وجود می‌آیند و به تدریج در سطح کالوس‌ها نیز اندام‌های نوپدید تشکیل می‌شود که احتمالا به دلیل تماس مستقیم با محیط غذایی و دسترسی بیشتر به عوامل رشد، اکسیژن و تحمل فشار و استرس کمتر می‌باشد (۷).

تشکیل ریشه و فرایند ریشه زایی مرحله سوم در دستورکارهای ریزازدیادی گیاهان است و برای نمو صحیح گیاهچه های تازه تشکیل شده طی پرآوری ضروری است و اغلب با حضور یکی از انواع اکسین تشکیل ریشه القاء شده و ریشه‌زایی صورت می گیرد(۳). نتایج پژوهش حاضر نشان داد تشکیل و رشد سیستم ریشه ای در گیاه چوچاق می‌تواند بدون حضور اکسین با موفقیت انجام شود، استفاده از محیط MS پایه بدون اکسین و تشکیل و رشد موفق ریشه را می توان به مقادیر فراوان اکسین درونی این گیاه نسبت داد(۱۲). بعلاوه این احتمال نیز وجود دارد که مقادیر اکسینی که در محیط کالوس‌زایی و شاخه زایی وجود داشته به حدی کافی بوده که برای ایجاد و رشد ریشه در این مرحله نیز مؤثر واقع شده است این نتیجه همسویی با نتایج بدست آمده در *Eryngium foetidum*(۱۷) ولی بر خلاف نتایج، Thiem Kikowska در دو گونه دیگر از *Eryngium* است که با حضور IBA ریشه زایی مناسب انجام شد، آنها گزارش کردند اگر چه ریشه زایی بدون اکسین هم انجام می شود اما در حضورIBA سرعت تشکیل و تعداد ریشه بیشتر است (۲۸،۱۲،۲). نتایج نشان داد نوع و ترکیب محیطهای کشت مرحله شاخه زایی می تواند بر روند تشکیل ریشه در محیط ریشه زایی اثر بگذارد که با نتایج Bhattacharyaa و Kikowska همسویی دارد که احتمالا ترکیب محیط کشت

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲
DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

شاخه زایی تغییراتی در ماهیت فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلولها ایجاد می‌کند(۱۴،۹). بررسی اثر سه نوع محیط MS ، MS۱/۲ و MS۱/۴ نشان داد که در مجموع فرآیندهای کالوس زایی، شاخه زایی و ایجاد ریشه، محیط MS بهترین عملکرد را دارد ، با توجه به اینکه محیط MS عناصر میکرو، ماکرو و ویتامین ها را بطور کامل دارد اثر قدرت کامل این محیط می تواند بر فرایندهای اندامزایی در شیشه موثر باشد(۲۰،۱۶).

پدیده سازش و عادت به شرایط گلخانه مرحله آخر و حساس از روش ریزازدیادی است، که اگر با دقت انجام نشود تعداد زیادی از گیاهان حاصل شده از بین می روند. نقش سیستم ریشه ای قوی و استفاده از بستر مناسب و کاهش تدریجی رطوبت برای خوگیری بسیار مهم است (۱۷). نتیجه حاصل شده در این پژوهش که زنده ماندن و بقاء و زیست پذیری ۷۰ درصدی گیاهان انتقال یافته به خاک را نشان داد در مقایسه با سایر گونه های *Eryngium* نتیجه مطلوب و پذیرفته شده‌ای است(۸،۱۱،۲۸).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ریزازدیادی گیاه چوچاق به دلایلی مانند دشواری تکثیر گیاه از طریق بذر و کند بودن فرایند رشد گیاه حاصل از بذر، دارویی و خوراکی بودن گیاه، دسترسی آسان و همیشگی به گیاه چوچاق در تمام فصول سال و فراهم کردن نمونه گیاهی برای سایر پژوهش ها ازجمله بررسیهای فیتوشیمیایی گیاه از روش کشت در شیشه ارزیابی شد.. در این پژوهش کالوس زایی و شاخه زایی در محیطی مشترک با مقادیر کم از تنظیم کننده های رشد و بازدهی مطلوب انجام شد و ریشه زایی در محیط فاقد تنظیم کننده رشد با درصد بالا و در مدت زمان کم اتفاق افتاد. سازش و عادت گیاهچه های کامل حاصل از کشت بافت در خاک باغچه و گلدان مطلوب گزارش شد. دستور کار به دست آمده می‌تواند بصورت موفقیت آمیز برای تکثیر این گیاه مورد استفاده قرارگیرد. روش معرفی شده در گیاه مورد بررسی کارآمد و تکرار پذیر بوده و به ازدیاد گیاهان کامل و سالم می انجامد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای حمایت‌های مادی و معنوی در انجام این پژوهش تشکر می‌نمایند.

منابع

۱. احمدآبادی، م، پشم‌فروش، ن، ۱۳۹۹، بهینه سازی کشت بافت و باززایی گیاه دارویی سنبل الطیب *Valeriana officinalis*، مجله پژوهش های گیاهی، جلد۳۳ ، شماره ۱.

۲. قدیری سردرود، س، سعادتمند، س، عصاره، م ح، نژاد ستاری، ط، ۱۳۹۸، ریز ازدیادی گیاه دارویی بشقاب آبی *Centella asiatica* L. ، مجله پژوهش های گیاهی، جلد ۲۲، شماره ۱.

۳. سید طباطبایی، ب ا، امیدی، ر، ۱۳۹۴، کشت بافت و سلول گیاهی، انتشارات دانشگاه تهران

۴. مازندرانی، م، مطلبی ریکنده، ث، ابراهیم‌زاده، م، ۱۳۹۲، اوت اکولوژی، اتنوفارماکولوژی، عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره متانولی گیاه دارویی زولنگ (*Eryngium caucasicum* Trauv.) ، معرفی طیف فلورستیک گیاهان دارویی رویشگاه لاریم مازندران. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، شماره پیاپی ۴، سال اول، شماره ۴.

۵. مظفریان، و، فرهنگ نام‌های گیاهان ایران، ۱۳۷۷، انتشارات فرهنگ معاصر، ص:۲۱۴-۲۱۵.

۶. نظریان فیروزآبادی، ف، اسماعیلی، ف، زمانی‌فر، م، ۱۳۹۵. بررسی تاثیر دو نوع هورمون سیتوکینن بر باززایی مستقیم ریزنمونه های مختلف گیاه چغندرقند در شرایط کشت بافت، پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، سال هشتم، شماره ۱۹.

7. Abbasi BH., Guo B., Zeb A., Xu L L., Wei YH., (2011), Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator, *African Journal of Biotechnology, 10(45), 84-89*.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲ DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

8. Ayuso M., Rego PR., Gallego PP, (2019), In vitro culture of the endangered plant *Eryngium viviparum* as dual strategy for its ex situ conservation and source of bioactive compounds. *Plant cell tissue org. cult.13 813, 427-435.*

9. Bhattacharyya R., (2001), High frequency invitro propagation of *Phylanthus amarus* by shoot tip culture. *Indian J.Exp.Biol.39:1184-1187.*

10. Catapan E., Luis B., et al (2002), micropropagation and root culture *Phylanthus uriaria, plant cell tissue.org.cult. 70(3):301-309.*

11. Chandrika R., Vyshalii P., Sarawathi K, (2011), Rapid multiplication of mature flowering plants of *Eryngium foetidum* by in vitro technique. *Int J Biotechnol App. 3:114-117.*

12. Davis Ph., (1972) Eryngium. *In: Davis KH, Flora of Turkey, Edinburgh University Press 4:292– 304.*

13. Kikowska M., Siliwinska E., Thiem B., (2016), Micropropagation of *Eryngium campestre* via shoot culture provides valuable uniform plant material with enhanced contents of phenolic acids and antimicrobial activity, *Acta Biologica Cracoviensia series botanica, 58:1, 89-102.*

14. Kikowska M., Siliwinska E., Thiem B., (2020), Micropropagation and production of somatic seeds for short term storage of the endangered species *Eryngium alpinum, Plants, 9-498(1-10).*

15. Kikowska M., Thiem B., Sliwinska E and et al., (2014) The Effect of Nutritional Factors and Plant Growth Regulators on Micropropagation and Production of Phenolic Acids and Saponins from Plantlets and Adventitious Root Cultures of *Eryngium maritimum, J Plant Growth Regul,* 33:809–819.

16. Kuruppusamy S, (2009) A review. On trends in production secondary metabolites from higher plants by invitro tissue, organ and cell culture. *J Med plants Res, 3:1222-1239.*

17. Martin KP., (2008), Organogenesis on root, leaf, stem-disc and escape explants of *Eryngium foetidum* a rare medicinal plant. *Journal of herbs, spice and medicinal plants. 11:4,9-17.*

18. Murashige T., Skoog F., (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum, 15(3), 473-497.*

19. Nabavi SM., Nabavi SF., Alinezhad H., Zare M., and Azimi R., (2012), Biological activities of flavonoid rich fraction of *Eryngium caucasicum* Trautv, Eur. Rev. Med, *Pharmcol. Sci. 16: 81-87.*

20. Nur Inani R., Norrizah JS., Azani S., (2017), The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on in vitro growth of *Typhonium felagelliform. Asian pac.J.trop biomed, 7(2), 151-156.*

21. Ojima K., Gamborg OL., Miller RA., (1968), Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells, *Ex. Cell. Res.; 50: 151-158.*

22. Pimenov MG., (1983), Umbelliferae. *In: Vvedensky AI (ed), Opredelitel rastenij Srednej Azii. T. VII, Tas ¨kent: Izd. Fan. pp 167–322.*

23. Pimenov MG., Tamamschian SG., (1987), Eryngium. *In: Rechinger KH (ed): Flora Iranica 162: 45–60. Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz.*

24. Samantaray S., Kumar BA., Maiti S., (2013), Plant regeneration from callus cultures of *Vitex trifolia* (Lamiales: Lamiaceae): a potential medicinal plant, *Revista de biologia tropical, 61(3), 1083-1094.*

25. Shabanzadeh Delcheh K., Kashefi B., Mohammad hassan R., (2014), A review optimization of tissue culture medium medicinal plant: Thyme, *International Journal of Farming and Allied Sciences, 3(9), 1015-1019.*

26. Smith RH., (2013), Plant tissue culture: Techniques and experiment, *Second edition. Academic press.pp. 321-344.*

27. Taiz L., Zeiger E., (20١٥), Plant physiology. *sixth edition. Sinauer, Inc, Publish Ers Sunder lands Massachusetts.*

28. Thiem B., Kikowska M., Krawczyk A., Więckowska B., Sliwinska E., (2013), Phenolic acid and DNA contents of micropropagated *Eryngium planum* L, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 114(2), 197-206.*

29. Wo ¨rz A., (2004), On the distribution and relationships of the South-West Asian species of *Eryngium* L. (Apiaceae, Saniculoideae), *Turk J Bot 28:85–92.*

30. Wo ¨rz A., (2005), A new subgeneric classification of the genus *Eryngium* L. (Apiaceae, Saniculoideae*), Bot Jahrb Syst 126:253–259.*

31. Wo ¨rz A., Diekmann H., (2010), Classification and evolution of the genus Eryngium L. (Apiaceae, Saniculoideae): results of fruit anatomical and petal morphological studies, *Plant Div Evol 128:387–408.*

32. Zarrini SS., Lemraski MG., Eftekhari M., Faraji M (2014), Study of callus induction in common sage (*Salvia officinalis*), *7:7,386-389.*

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۰۹-۲۹۲ DOI: 10.22034/JPR.2024.2197

The study of micropropagation in Chuchaq (*Eryngium caucasicum* Trauv.) an edible-medicinal plant

Mahmoodi Kordi F., Ebadi Nahari M. and Gerami Z.

Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Chuchaq (*Eryngium caucasicum)*, is a perennial plant belonging to the Apiaceae, it has various medicinal properties such as analgesic, appetizing, diuretic, anti-inflammatory and antioxidant effects. The aim of this study was to investigate the effect of the combination of growth regulators on callus production, shoot induction, rhizogenesis and proliferation of Chuchaq in vitro condition. Young and healthy leaves and petioles were used as explants and were cultured in MS, MS1/2 and MS 1/4 with different concentrations of (BAP, NAA, KIN, IAA). In MS medium with 1BAP + 0.1NAA mgL^{-1}, the most callus induction and regeneration were performed. Fifteen days after placing the explants in the culture medium, white calli were formed. After 21 days, the first signs of the formation of new shoots were revealed. The emerging shoots with the height of 2-2.5 cm were transferred to MS medium for root induction, almost all were rooted in MS without growth regulators. Along with the formation of roots, they were formed propagules from the collar area of the plantlets. The plantlets were taken out of *invitro* condition and were transplanted into sterilized mixtures of a coco peat and Perlit, and to gradually reduce the humidity, they were kept in the greenhouse under special conditions. In MS1/2 and MS1/4 media, callus formation and processing were reported as favorable, however in final adaptation of plants to soil conditions, 70% of regenerated plants in culture medium (1BAP + 0.1NAA) mgL^{-1}, adapted well to the soil and grew well in pots.

Key words: Micropropagation, Regeneration, *in vitro* culture, *Eryngium cuacasicum*