ریزازدیادی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) با استفاده از قطعات کوتیلدون و هیپوکوتیل

علیرضا زبرجدی[۱،۲و*]، محمد جواد معتمدی[۱و۴]، الهام طراوت[۳] و احمد اسماعیلی[۵و۶]

[۱] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] کرمانشاه، دانشگاه رازی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی

[۳] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۴] کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان

[۵] خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی

[۶] خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۸

چکیده

سرخارگل گیاهی علفی و چندساله بوده و به لحاظ تجاری گونه‌ای بسیار ارزشمند محسوب می‌شود. ترکیبات فعال دارویی آن عمدتاً شامل اسیدهای فنولیک و آلکامیدها هستند. به منظور بررسی شرایط ریزازدیادی این گیاه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل ریزنمونه (هیپوکوتیل و کوتیلدون)، هورمون BAP (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) و هورمون NAA (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) در سه تکرار اجرا گردید. نتایج تجزیه واریانس ساده برای صفات کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین برخی از عوامل مورد مطالعه بود. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل بین عوامل مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون و با تیمار ترکیبی BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰ میلی‌گرم در لیتر) به میزان ۹۷ درصد و در ریزنمونه هیپوکوتیل با تیمار ترکیبی BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) به میزان ۹۱ درصد بود. تیمار BAP (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰ میلی‌گرم در لیتر) با میانگین ۵/۳ نوساقه در هر ریزنمونه، بیشترین درصد باززایی نوساقه (۳۱/۵ و ۳۲/۵ ٪) را به ترتیب در ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل داشت.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل، ریزازدیادی، کوتیلدون، هیپوکوتیل، NAA، BAP.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۱۳۲۱۸۰۹ ، پست الکترونیکی:Zebarjadiali@yahoo.com

مقدمه

سرخارگل ارغوانی با نام علمی *Echinacea purpurea* L. عضو خانواده *Asteraceae* بوده و به لحاظ جغرافیایی بومی آمریکای شمالی است. تولید کنندگان عمده آن در اروپا، کشورهای آلمان، سویس، هلند، ایتالیا و اسپانیا هستند. فروش جزئی محصولات این گیاه در آمریکا سالانه بالغ بر ۱۵۸ میلیون دلار است و در سطح جهانی سالانه ۱/۳ میلیون دلار تخمین زده شده است. پژوهشهای اخیر مؤسسه NAPRALERT، حضور ۲۱۶ ترکیب فعال

دارویی در *E. purpurea* را اثبات کرده است (۴). سه گونه از جنس *Echinacea* که عموماً دارای مصارف دارویی هستند عبارتند از: *E. purpurea* (با مصرف ریشه و قسمتهای هوایی)، *E. angustifolia* (با مصرف ریشه) و *E. pallida* (با مصرف ریشه) (۱۷). اسیدهای فنولیک، آلکامیدها ، پلی استیلن‌ها ، گلیکوپروتئین‌ها و پلی ساکاریدها به عنوان ترکیبات فعال بیولوژیکی در گونه‌های مختلف *Echinacea* شناسایی شده‌اند (۵ و ۸). به لحاظ دارویی، عقیده بر این است که گیاه سرخارگل می‌تواند سیستم ایمنی را از طریق تحریک تولید سلولهای T و تنفس سلولی (خاصیت آنتی اکسیداسیونی) در برابر سلولهای تومورزا، فعال کند (۵).

برای تحقق بخشیدن به افزایش تقاضا برای این گیاه دارویی مهم، روش‌ها و راهکارهای مختلفی ابداع شده است که شامل تکثیر سریع گیاه در شرایط استریل و به دست آوردن گیاهان سالم و معرفی سریع‌تر ارقام جدید با صفات مطلوب است (۱۹). در این خصوص، تکنیکهای کشت بافت در محیط *in vitro* بسیار ارزشمند هستند. اندامهای تمایز یافته در کشت بافت، سیستم کارآمدی را برای تولید مواد فیتوشیمیایی گیاه سرخارگل ارائه کرده است. در کل، سلول، کالوس و ریشه‌های مویی کشت شده در محیط *in vitro* می‌توانند برای مطالعه مسیر بیوسنتزی مواد فیتوشیمیایی مهم، مورد بهره‌برداری قرار گیرند (۸).

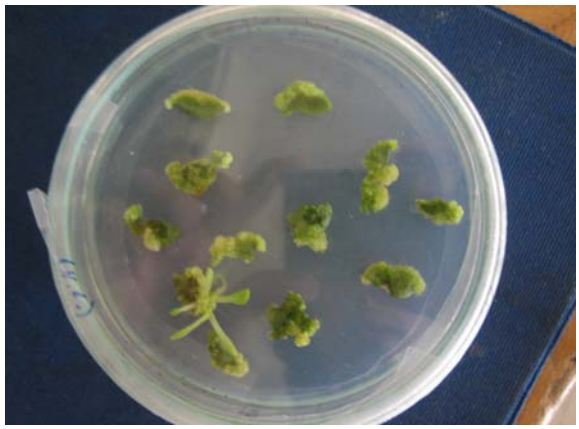
مطالعات متعددی در زمینه جنبه‌های مختلف بهینه‌سازی سیستم کشت بافت سرخارگل وجود دارد. Koroch و همکاران (۱۰ و ۱۱) کالوس‌زایی و اندام‌زایی غیر مستقیم از ریزنمونه برگ *E. purpurea* و *E. pallida* را در غلظتهای مختلف نفتالن استیک اسید (NAA) و ۶-بنزیل آمینو پورین (BAP) مورد بررسی قرار دادند. در گزارش دیگر، Mechanda و همکاران (۱۴)، باززایی مستقیم ساقه از قطعات برگی گیاهان بالغ *E. purpurea* را با استفاده از هورمونهای NAA و BAP مورد مطالعه قرار دادند. آنها دریافتند که باززایی در تمامی غلظتهای BAP که در ترکیب با غلظتهای پایین NAA بوده رخ داده و غلظتهای بالاتر NAA نیز کاهش تولید کالوس و عدم باززایی را به دنبال داشته است. باززایی از طریق هورمون TDZ نیز در مورد گیاه سرخارگل در سیستمهای کشت مایع و جامد گزارش شده که هدف، بررسی نقش هورمون TDZ در القاء باززایی و همچنین توسعه ریزازدیادی در شرایط کشت مایع و جامد برای این گیاه بود (۹).

هدف از تحقیق حاضر که برای اولین بار در کشور اجرا شده است، بهینه‌سازی شرایط ریزازدیادی و مطالعه تأثیر غلظتهای مختلف هورمونهای اکسین (NAA) و سیتوکنین (BAP) در میزان کالوس‌زایی و باززایی گیاه سرخارگل به منظور بررسی پتانسیل نوع ریزنمونه‌های این گیاه برای مطالعات آتی در زمینه انتقال ژن به این گونه دارویی مهم بود.

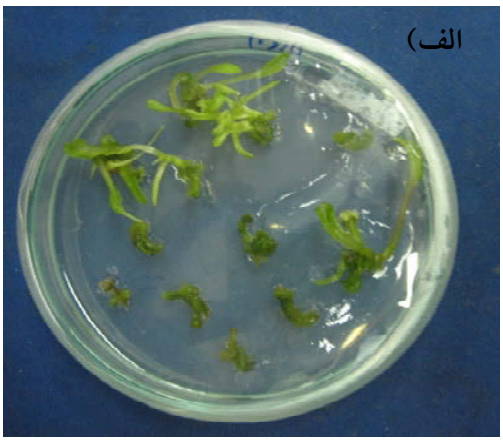
مواد و روشها

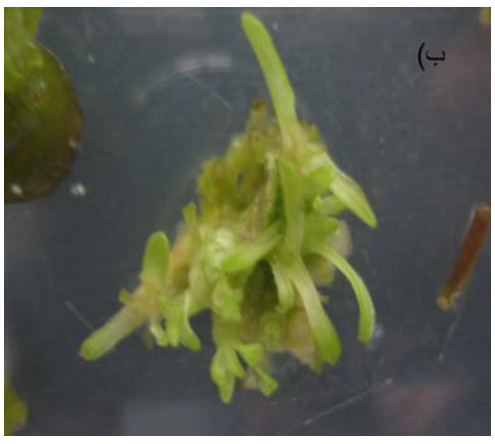
برای ضد عفونی، ابتدا بذرهای سرخارگل (جمع آوری شده از ناحیه مرکزی ایران) در اتانول ۷۰ درصد بمدت ۲ دقیقه و پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۷ دقیقه در محلول کلرید جیوه ($HgCl_2$) ۰/۱ درصد قرار گرفتند. پس از ضد عفونی، بذور ۳ الی ۴ مرتبه با آب مقطر استریل در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای، تحت شرایط استریل شستشو داده شدند. بذرهای این گیاه روی محیط کشت MS (Murashige and Skoog medium)(۱۶) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH برابر ۵/۸ قرار گرفتند. سپس، نمونه‌ها به اتاقک رشد تحت شرایط ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۰۰ لوکس و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. مراحل این تحقیق در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام گرفت. در فاصله زمانی ۱۵ تا ۲۰ روز، گیاهچه‌هایی به طول ۸-۵ سانتیمتر به دست آمدند. گیاهچه‌های مذکور به زیر لامینار ایرفلو منتقل شده

و سپس ریزنمونه هیپوکوتیل به قطعات ۱-۰/۵ و کوتیلدون به قطعات ۱×۱ سانتیمتری برش داده شده و به طور متوسط در هر پتری‌دیش، ۱۰ عدد ریز نمونه کشت داده شد (هر تکرار شامل ۶ پتری‌دیش). تمامی تیمارها پس از ۱۴ روز در محیط مشابه واکشت شدند. پس از گذشت ۱۰ روز از واکشت و ایجاد کالوس، کالوسها به محیط باززایی (تولید نوساقه) منتقل شدند (شکل ۱). میزان کالوس‌زایی با شمارش تعداد قطعات کال داده به تعداد کل ریزنمونه-های کشت شده به دست آمد. کالوسها به مدت ۱۵ روز در محیط‌های باززایی نگه داشته شدند و سپس نوساقه‌های باززایی شده (شکل ۲) به طور متناوب تحت شرایط استریل از کالوسها جدا و به محیط کشت MS عاری از هورمون منتقل شدند تا در این محیط به حداکثر رشد خود برسند. فراوانی باززایی نوساقه با شمارش تعداد نوساقه تولید شده به تعداد ریزنمونه کشت شده در هر پتری دیش محاسبه گردید. پس از ۲۵-۳۵ روز، گیاهچه‌هایی با طول حدود ۱۰ سانتیمتر به دست آمدند. گیاهچه‌های مذکور به منظور تولید ریشه تحت شرایط استریل به محیط کشت MS حاوی هورمون اندول بوتیریک اسید (IBA به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند (شکل ۳ الف).

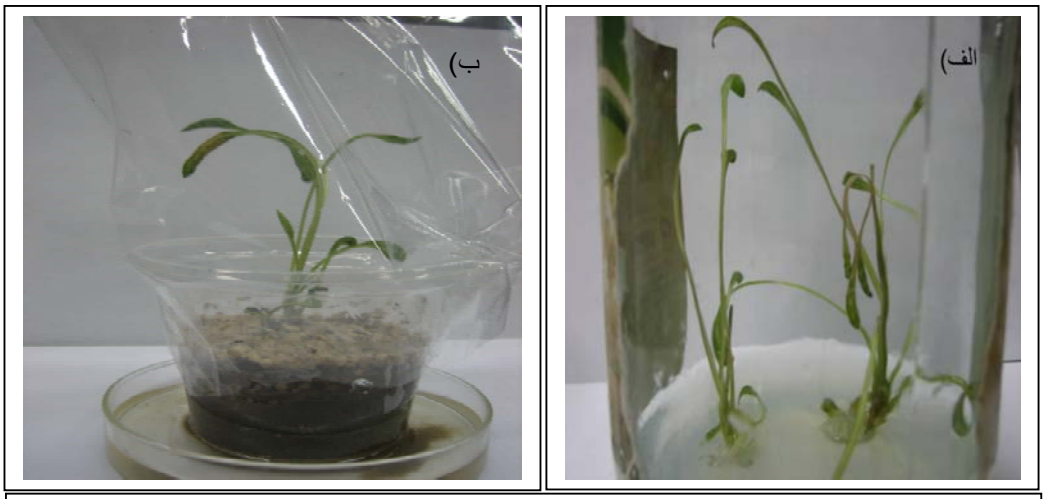


شکل ۱- کالوسهای در حال باززایی از ریزنمونه کوتیلدون





شکل ۲ الف و ب- نمای نزدیکی از نوساقه‌های تشکیل شده از ریزنمونه کوتیلدون پس از ۵ هفته در محیط باززایی. توجه داشته باشید که پدیده باززایی چندگانه نوساقه‌ها کاملاً قابل تشخیص است.



شکل ۳ – الف) نوساقه‌های منتقل شده به محیط MS حاوی هورمون IBA جهت ریشه‌دار شدن. ب) انتقال گیاهچه‌ها به گلدانهای بزرگ جهت رشد و سازگاری بیشتر به محیط آزمایشگاه

سرانجام، پس از گذشت ۶-۴ هفته، گیاهان ریشه دارشده به آرامی از شیشه خارج شده و در زیر شیر آب شستشو داده شدند تا هیچ گونه آگار و بقایای محیط کشت روی آنها باقی نماند و سپس به گلدانهایی به قطر ۱۰ سانتیمتر شامل ماسه، پرلایت و خاک (به صورت استریل) منتقل شده و در شرایط کنترل شده از نظر میزان رطوبت و حرارت نگهداری شدند (شکل ۳ ب). قابل ذکر است که در چند روز اول می‌بایست مقدار رطوبت نسبی محفظه بالا نگه داشته شود (۹۰-۸۰ درصد) و از آب مقطر استریل جهت آبیاری گلدانها، استفاده گردد.

محیط کالوس‌زایی و باززایی شامل ترکیبات مختلف هورمون ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP; ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) هر کدام در سه سطح (برای هر یک از آزمایشات) و هورمون نفتالین استیک اسید (NAA; ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) هر کدام در سه سطح (برای هر یک از آزمایشات) به عنوان عاملهای اول و دوم و نوع ریزنمونه (هیپوکوتیل و کوتیلدون) به عنوان عامل سوم بود. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجراء گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام شد. قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تبدیل داده‌ها (Arcsin √X) انجام شد. برای انجام آزمون مقایسات میانگین نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس ساده برای صفات کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. این نتایج نشان داد که از نظر میزان کالوس‌زایی بین ریزنمونه‌ها، انواع هورمون و برخی اثرات متقابل آنها از جمله اثر متقابل سه گانه (ریزنمونه × NAA × BAP) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس این جدول فقط برای اثر متقابل ریزنمونه × NAA از نظر کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار دیده نشد. این در حالی است که از نظر باززایی نوساقه بین ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید امّا بین سطوح مختلف هورمونهای مورد استفاده، اثر متقابل ریزنمونه × BAP و اثر متقابل هورمونهای NAA × BAP اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس برای صفات میزان کالوس‌زایی و باززایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کالوس زایی	باززایی
ریزنمونه	۱	۰/۲۱۰ **	۰/۰۳۱ ns
NAA	۲	۰/۲۲۴ **	۳/۱۳۳ **
BAP	۲	۰/۱۹۱ **	۱۴/۷۵۷ **
ریزنمونه × NAA	۲	۰/۰۳۳ ns	۰/۰۰۳ ns
ریزنمونه × BAP	۲	۰/۱۳۳ **	۱/۴۶۰ *
NAA × BAP	۴	۰/۰۶۲ *	۵/۲۷۱ **
ریزنمونه × NAA × BAP	۴	۰/۰۸۴ **	۰/۲۵۱ ns
خطای آزمایش	۳۶	۰/۰۲۱	۰/۴۱۱
ضریب تغییرات (CV ٪)		۱۰/۲۵	۱۰/۱۲

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار، * و ** بترتیب اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

جدول ۲- اثر ترکیبات مختلف هورمونهای NAA و BAP روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل

غلظت هورمون (میلی‌گرم در لیتر)		ریزنمونه‌های تولید کننده کالوس (٪)	
NAA	BAP	کوتیلدون	هیپوکوتیل
۰	۰	۲۷/۳۳ f *	۵۲/۰۰ def *
	۰/۲	۹۷/۰۰ a	۶۳/۶۷ bcde
	۱/۲	۸۸/۶۷ abc	۳۸/۶۷ ef
۰/۱	۰	۶۰/۶۷ cde	۶۳/۳۳ bcde
	۰/۲	۹۴/۳۳ a	۵۵/۳۰ de
	۱/۲	۷۷/۶۷ abcd	۷۴/۶۷ abcd
۰/۶	۰	۸۵/۶۷ abc	۸۰/۰۰ abcd
	۰/۲	۹۱/۳۳ ab	۹۱/۰۰ ab
	۱/۲	۷۷/۶۷ abcd	۶۹/۳۳ abcd

* اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌دار با هم ندارند.

جدول ۳- اثر ترکیبات مختلف هورمونهای NAA و BAP روی باززایی نوساقه‌های گیاه سرخارگل

غلظت هورمون (میلی‌گرم در لیتر)		ریزنمونه‌های تولید کننده نوساقه (٪)	
NAA	BAP	کوتیلدون	هیپوکوتیل
۰	۰	۴/۲ e	۲/۶ e
	۰/۴	۳۱/۵ a	۳۲/۵ a
	۲/۴	۲۱/۷ bc	۲۱/۳ bc
۰/۰۵	۰	۷/۳ de	۶/۷ de
	۰/۴	۱۷/۲ cd	۱۵/۸ cd
	۲/۴	۲۵/۹ b	۲۴/۱ b
۰/۳	۰	۷/۶ de	۵/۴ de
	۰/۴	۲۰/۹ c	۱۹/۱ c
	۲/۴	۱۷/۹ cd	۱۶/۱ cd

* اعداد موجود در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند، تفاوت معنی‌دار با هم ندارند.

با توجه به نتایج جدول فوق به‌منظور فهم بهتر اثر عوامل مورد بررسی اقدام به مقایسه میانگین بروش دانکن شد که نتایج آن برای کالوس‌زایی (جدول ۲) و باززایی (جدول ۳) ارائه شده است. میانگین کل کالوس‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون ۷۷/۸۱ درصد و در هیپوکوتیل ۶۵/۳۳ درصد بود. در این رابطه، بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون در تیمار BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰ میلی‌گرم در لیتر) به میزان ۹۷ درصد و در ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار BAP (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) بمیزان ۹۱ درصد مشاهده گردید (جدول۲).

در رابطه با اثر هورمونهای BAP و NAA در میزان باززایی، بیشترین تأثیر در غلظت (۰) NAA و (۰/۴) BAP مشاهده گردید. هورمون BAP به تنهایی یا در ترکیب با غلظتهای مختلف NAA ، تولید نوساقه های متعدد کردند که از این میان تیمار (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) BAP و (۰ میلی‌گرم در لیتر) NAA با بیشترین میزان باززایی (۳۱/۵ درصد و ۳۲/۵ درصد) بترتیب در ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل، موثرترین تیمار در باززایی نوساقه‌ها بوده است (جدول ۳).

پس از پنج هفته، نوساقه‌های متعددی از هر کالوس ایجاد گردید (شکل ۲). پس از سازگار نمودن گیاهان با شرایط طبیعی به مدت ۲-۱ هفته، آن‌ها به گلدانهای بزرگ‌تر با قطر ۲۰ سانتیمتر منتقل شدند (شکل ۳). سطوح و نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به کار رفته در محیط کشت، موفقیت یک کار کشت بافت را تعیین می کنند. با استفاده از محرکهای رشدی برون زا یا کاربرد تنظیم کننده های رشد درون زا به محیط کشت می‌توان تقسیم سلولی، رشد سلولی و تمایز بافتها را تحریک کرد. از طرفی، تعادل بین اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفوژنیک مهم محسوب می‌شود و رشد اولیه ریشه و نوساقه و همچنین فرآیند تمایززایی از بافتهای سازمان نیافته مانند کالوس، توسط غلظت نسبی اکسین و سیتوکنین در محیط کشت تنظیم می شوند (۱۸). در این رابطه، Murashige (۱۵) اظهار داشته است که نسبت اکسین/سیتوکنین نزدیک به ۱۰ برای رشد سریع کالوسهای تمایز نیافته، نسبتهای نزدیک به ۱۰۰ برای نمو ریشه و نسبتهای نزدیک به ۴ برای رشد نوساقه‌ها مناسب هستند.

پدیده شیشه‌ای شدن کالوسها در غلظت ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده گردید؛ این مشکل قبلاً توسط Ziv (۲۱)، Koroch و همکاران (۱۰ و ۱۱) و موافقی و همکاران (۳) در رابطه با غلظتهای بالای هورمون BAP گزارش شده است و کالوسها در این غلظت بالا هورمون قهوه‌ای رنگ شده و شروع به نکروزه شدن کردند. قهوه‌ای شدن محیط کشت در نتیجه اکسیداسیون پلی فنولهای ترشح شده توسط ریزنمونه‌ها می‌باشد که یکی از راههای غلبه بر این مشکل، واکشت کردن ریزنمونه‌ها در فواصل منظم است (۱۸). همچنین، در مقایسه‌ای که بین نحوه قرارگرفتن دو سطح ریزنمونه کوتیلدون روی محیط کشت و تأثیر آن بر باززایی نوساقه‌ها این گیاه انجام گرفت، سطح پشتی کوتیلدون بسیار مؤثرتر از سطح رویی عمل کرد. در این تحقیق صحت این پدیده به صورت تجربی مشاهده گردید و مطابق با نتایج Zobayed and Saxena (۲۲) در مورد گیاه سرخارگل می‌باشد. علت این امر، تا حدودی به وجود سلولهای مریستمی تولیدکننده جوانه ساقه در سطح رویی کوتیلدون برمی‌گردد. در واقع، تقسیمات مکرر سلولهای زیرپوستی برگی اولیه منجر به تشکیل سلولهای مریستمی و متعاقب آن جوانه‌های ساقه می‌شوند (۱۳).

نتایج به دست آمده در این تحقیق به لحاظ نوع ریزنمونه مورد استفاده با نتایج Koroch و همکاران (۱۰ و ۱۱) مطابقت داشت و این مسئله را اثبات می‌کند که ریزنمونه کوتیلدون گیاه سرخارگل پتانسیل ارگانوژنیکی زیادی برای تولید نوساقه دارد و ترکیب هورمونهای رشد برون‌زا در محیط کشت روی باززایی ریزنمونه‌ها دارای تأثیر به سزایی

است. زبرجدی و همکاران (۱ و ۲۰) از ریزنمونه‌های برگهای لپه‌ای (کوتیلدون) و هیپوکوتیل جهت ریزازدیادی گیاه کلزا استفاده نموده‌اند. طبق گزارشات ایشان کوتیلدون نسبت به هیپوکتیل برتری نشان داده است. به نظر می‌رسد که نوع ریزنمونه به طور قابل ملاحظه‌ای روی واکنش باززایی گونه‌های *Echinaceae* تأثیر داشته باشد. در این خصوص، اختلافات مشاهده شده می‌تواند در نتیجه اختلاف در روشهای کشت، زمینه ژنتیکی گیاهان والد و وضعیت فیزیولوژیکی بافت ریزنمونه مورد استفاده باشد (۱). در این خصوص، سلمانیان و کهریزی (۲) گزارش کردند نوساقه‌های حاصل از کشت کوتیلدون گیاه کلزا ناشی از اندام‌زایی مستقیم از انتهای بریده می‌باشد و انتظار می‌رود که کمترین تنوع سوماکلونال را داشته و در حقیقت گیاهچه‌های ایجاد شده یکنواختی ژنتیکی بالایی داشته باشند اما نوساقه‌هایی که از کشت هیپوکوتیل ایجاد می شوند، ابتدا مرحله کالوس‌زایی را طی کرده و سپس هنگام استقرار در محیطهای مناسب گیاهچه های سبز ایجاد می‌کنند که می‌تواند گیاهچه‌هایی با ساختار ژنتیکی متفاوت ایجاد نمایند. در واقع، انواع مختلف ریزنمونه‌های یک گیاه و سلولهای مختلف موجود در یک ریزنمونه در موقعیتهای متفاوتی به لحاظ رقابت مورفوژنیکی قرار دارند و در نتیجه نیازمند سیگنالهای متفاوتی برای ورود به یک مسیر مورفوژنیکی خاص می‌باشند. پس منطقی به نظر می‌رسد که واکنشهای باززایی متفاوت ریزنمونه‌ها نسبت به ترکیبات اکسین و سیتوکنین نیز حاصل موقعیتهای مختلف در رقابت مورفوژنیک سلولهای کوتیلدون، هیپوکوتیل و سایر بافتها باشد (۱۲). همچنین، یکی از نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، تأثیر هورمون BAP در مقادیر پایین روی باززایی ریزنمونه‌ها بود. نتایج این تحقیق با نتایج Choffe و همکاران (۷) مطابقت داشت. آنها در بخشی از آزمایش خود به این نتیجه رسیده بودند که هورمون BAP در مقادیر پایین مؤثرترین تنظیم کننده رشد گیاهی در باززایی ریزنمونه‌ها نسبت به سایر سیتوکنین‌ها در کشت بافت سرخارگل، محسوب می‌شود. در این زمینه Bhatti و همکاران (۶) دریافتند که ترکیبهای فاکتوریل BAP ، NAA در القاء اندام زایی ساقه از ریز نمونه های کوتیلدون گونه های *E. angustifolia* ، *E. purpurea* ، *E. pallida* مؤثر بوده است که نتایج تحقیق حاضر مشابه و در تأیید آزمایش فوق بوده است. در تحقیقی دیگر، Koroch و همکاران (۱۰) با مطالعه ترکیبات مختلف هورمونهای NAA و BAP را روی اندام‌زایی غیرمستقیم گونه *E. purpurea* گزارش کردند که استفاده از BAP به تنهایی در غلظتهای پایین (۱-۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) تشکیل نوساقه‌های نابه جا را تحریک کرده و تولید کالوس را افزایش داده است، در حالی که همزمان با افزایش غلظت NAA درصد باززایی نوساقه‌ها کاهش پیدا کرده است. در این رابطه، موافقی و همکاران (۳) اظهار داشتند که تولید مستقیم نوساقه‌های حاصل از قطعات هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شده است و افزایش مقدار NAA تولید نوساقه را مهار کرده و موجب تشکیل کالوس گردیده است. نتایج به دست آمده در این تحقیق (که برای اولین بار در کشور انجام شده است) در راستای تحقیقات قبلی اثبات کرده است که استفاده از ریزنمونه کوتیلدون، باززایی سریع و آسان را از گیاهان جوان برای اصلاح گران و همچنین بررسی متابولیتهای ثانویه این گیاه را فراهم می‌کند و زمینه را برای توسعه کاربرد روشهای انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم، هموار می‌سازد.

منابع

۱. زبرجدی، ع.، جلالی جواران، م.، سلمانیان، ع. ه.، کریم زاده، ق. و موسوی، ا. ۱۳۸۵. جداسازی و تهیه ساختار Antisense ژن *fae* و انتقال آن به گیاه کلزا (*Brassica napus*). مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۱-۳۷، شماره ۲. ص: ۲۵۷-۲۷۱.

۲. سلمانیان، ع. ه.، کهریزی، د. ۱۳۸۶. مطالعه تأثیر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه بر روی باززایی نوساقه گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus* L.). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۰، شماره ۳. ص: ۱۷۱-۱۷۹.

۳. موافقی، ع.، حبیبی، ق.، علی اصغر پور، م. ۱۳۸۷. باززایی گیاه دارویی کور *Capparis spinosa* L. با استفاده کشت قطعات هیپوکوتیل. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۲. ص: ۲۸۹-۲۹۷.

4. Abbasi, B., Saxena, P. K., Murch, S. J. and Liu, C. Z. 2007. *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 43: 481–492.

5. Bauer, R. and Wagner, H. 1991. *Echinacea* species as potential immunostimulatory drugs. In: Wagner, H. and Farnsworth, N. R. (Eds.). Economic and medicinal plant research. Academic, New York, pp. 253–321.

6. Bhatti, S. M., Myles, E. L., Long, D. E. and Sauve, R. 2002. *In vitro* regeneration of St. Johns wort and coneflowers. SNA research conference, 47: 340–342.

7. Choffe, K. L., Murch, S. J. and Saxena, P. K. 2000. Regeneration of *Echinacea purpurea*: Induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 62: 227–234.

8. Harborne, J. B. and Williams, C. A. 2004. Phytochemistry of the genus Echinacea. In: Miller, S. (Eds.). *Echinacea*. The genus *Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 55–71.

9. 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 Rep. 26: 13–19.

10. 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.

11. 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. Dev. Biol. Plant. 39: 415–418.

12. Lakshmanan, P., Danesh, M. and Taji, A. 2002. Production of four commercially cultivated Echinacea species by different methods of in vitro regeneration. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 77: 158-163.

13. Mandal, A. K. A. and Gupta, S. D. 2001. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 37(1): 50-54.

14. 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. Dev. Biol. Plant. 39: 505–509.

15. Murashige, T. 1980. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: Skoog, F. (Eds). Plant Growth Substances. Berlin: Springer-Verlag, pp. 426–434.

16. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.

17. Perry, B., Burges, E. and Glennie, V. 2001. *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. J. Agric Food Chem. 49:1702–1706.

18. Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnol. Advances. 18: 91–120.

19. Yu, H. C. and Kaarlas, M. 2004. Popularity, diversity, and quality of Echinacea, In: Miller, S. (Eds.). *Echinacea*. The genus *Echinacea*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 29–52.

20. Zebarjadi, A. R., Jalali Javaran, M., Salmanian, A. H., Karimzadeh, GH., Moeini, A. and Mousavi, A. 2006. Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. Iranian Journal of Biotechnology, 4 (2): 79-87.

21. Ziv, M. 1991. Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (Eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

22. 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* Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 605–612.

Micropropagation of Medicinal Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.) Using Cotyledon and Hypocotyl Segments

Zebarjadi A.R.[1,2], Motamedi M.J.[1,4], Taravat E.[3] and Ismaili A.[5,6]

[1] Plant Breeding and Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

[2] Biotechnology for Environmental Stress Dept., Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

[3] Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

[4] Young Researchers Club, Islamic Azad University, Branch of Kermanshah, Kermanshah, I.R. of Iran

[5] Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, I.R. of Iran

[6] Plant Breeding and Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, I.R. of Iran

Abstract

Purple coneflower is a herbaceous and perennial flowering plant and described as a traditional valuable species. It has several active compounds including phenolic acids and alkamides. In order to survey of micropropagation condition of this plant, an experiment was conducted as a factorial arrangment in completely randomized design with three replications. The factors were including explant type (hypocotyl and cotyledon), BAP hormone (0, 0.2, 0.4, 1.2 and 2.4 mg l^{-1}) and NAA hormone (0, 0.05, 0.1, 0.3 and 0.6 mg l^{-1}). Analysis of variance revealed significant differences among some studied treatments for callus induction and regeneration in explants. Results of means comparison for triple interaction among factors indicated that the highest percentage of callus induction occurred on a MS medium containing 0.2 mg l-1 BAP and 0 mg l^{-1} NAA (97%) in cotyledon and 0.2 mg l^{-1} BAP and 0.6 mg l^{-1} NAA (91%) in hypocotyl explant. Moreover, no significant differences observed between two explants. Combination of 0.4 mg l^{-1} BAP and 0 mg l^{-1} NAA) has the most effective, providing the highest frequency of shoot regeneration (31.5%) and (32.5%) in cotyledon and hypocotyl explants respectively.

Keywords: Purple coneflower, Micropropagation, Cotyledon, Hypocotyl, NAA, BAP.