بررسی کشت جنین درون شیشه و تاثیرمحیط کشت و سطوح مختلف هورمونی و ریز نمونه در کالزایی و ساقه‌زایی گیاه باریجه

راضیه سرابادانی‌تفرشی[1]*، منصور امیدی[2]، محمدرضا بی‌همتا[3]، سعید دوازده‌امامی[4]

۱- کارشناس ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
٤- عضو هیأت علمی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان
*آدرس مکاتبه: تهران، کدپستی: ١٤٥٦٨٧٣٦٥٣
تلفن: ۰۹۱۲۲۹٦٦۰۲۹
پست الکترونیک: r.sarabadani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۲/۲۵ **تاریخ تصویب:** ۸۷/۳/۲٦

چکیده

مقدمه: باریجه از گیاهان بسیار ارزشمند دارویی- صنعتی بومی ایران است و از اقلام مهم صادراتی ایران محسوب می‌شود. تکثیر محدود بذور گیاه به علت منوکارپیک بودن آن و همین‌طور داشتن دوره طولانی خواب بذر، تولید انبوه این گیاه را با مشکل جدی مواجه کرده است.

هدف: به منظور به حداقل رساندن دوره خواب بذر، کشت جنین در محیط درون شیشه و همین‌طور جهت تکثیر و ریزازدیادی، کالزایی و باززایی آن بررسی شده است.

روش بررسی: محور جنینی پس از ضدعفونی سطحی در محیط‌های پایه MS ۱/۸، MS ۱/٤، MS کشت شدند. پس از گذشت ۲۰ روز، از گیاهچه‌های با بنیه‌های مناسب ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل، کوتیلدون، برگ اصلی، جنین کامل و جنین برش یافته تهیه شد و به محیط کشت پایه $1/_4$MS به همراه ترکیبات مختلف کنترل‌کننده‌های رشد شامل هورمون‌های kin، BAP، NAA، D ،٤-۲ منتقل شدند. در فاز باززایی از محیط کشت پایه B5 و MS ۱/٤ به همراه ترکیبات هورمونی مختلف شامل هورمون‌های ABA، ADS، BAP استفاده شد و کال‌های با منشای ریشه، هیپوکوتیل و جنین برش یافته واکشت شدند.

نتایج: جنین‌ها، ۳-۲ روز پس از قرار گرفتن در محیط MS ۱/٤ جوانه زدند و گیاهچه کامل ۲۰ روز پس از کشت حاصل شد. در فاز کالزایی ترکیب هورمونی BAP ۲ mg/l^{-1} و NAA ۱۰ mg/l^{-1} و ریز نمونه‌های ریشه و جنین برش یافته نتایج مناسبی را به همراه داشت. در فاز باززایی ترکیب هورمونی BAP ۱/۵ mg/l^{-1} و ADS ۰/۵ mg/l^{-1} نتیجه‌بخش بود. از میان کال‌های با منشای مختلف، کال‌های با منشای ریشه نتیجه بهتری در ارتباط با درصد باززایی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بر این اساس کشت جنین درون شیشه به منظور به حداقل رساندن دوره خواب بذر و جوانه‌زنی آن و همین‌طور استفاده از محیط‌های هورمونی و ریز نمونه مذکور در فاز کالزایی و فاز باز زایی جهت تولید کال‌های قوی و با کیفیت و هم‌چنین ریز ازدیادی و در نتیجه تولید انبوه و جلوگیری از انقراض آن توصیه می‌شود.

گل‌واژگان: باریجه، گیاهچه، ریز نمونه، محور جنینی

www.SID.ir

مقدمه

باریجه[1]، با نام انگلیسی Galbanum، گیاه ارزشمند دارویی – صنعتی از خانواده چتریان، بومی ایران بوده و از لحاظ پراکنش، در ارتفاعات شمال و غرب ایران به صورت طبیعی یافت می‌شود. این گیاه چندساله و منوکارپیک بوده (در طول عمر خود تنها یک‌بار گل می‌دهد) و در چند سال اول رویش (۷ – ۵ سال) برگ‌های طوقه‌ای تولید می‌کند، در سال آخر رویش به ساقه می‌رود و گل و میوه نیز روی آن تشکیل می‌شود، سپس ریشه گیاه می‌پوسد و گیاه از بین می‌رود. ترکیبات آن عبارتند از ۹/۵ درصد اسانس، ۶۳/۵ درصد رزین، ۲۷ درصد صمغ و اسانس آن دارای پینن، کادینن، کادی نول و والریناتدوبورنیل است. اثرات دارویی این گیاه از مدت‌ها پیش در طب سنتی کشورمان استفاده شده است. همین‌طور از لحاظ صنعتی دارای مصارف بسیار ارزشمندی است به طوری که در بازار کشورهای صنعتی خواهان زیادی دارد و شیرابه این گیاه از اقلام مهم صادراتی ایران محسوب می‌شود [۱].

عصاره این گیاه دارای ترکیباتی است که می‌تواند در جهت تسکین سندروم محرومیت مورفین سودمند باشد [۲]. فعالیت ضدصرع روغن موجود در میوه [۳] و همین‌طور فعالیت ضدصرع و ضدتشنج بذر این گیاه بر روی موش ثابت شده است [٤].

فعالیت بالای آنتی‌باکتریالی روغن موجود در این گیاه روی تمامی میکروارگان‌ها به جز Pseudamonas aeroginosa (در فعالیت کمتر) به اثبات رسیده است [۵]. با تجزیه GC/MS روغن میوه این گیاه، مشخص شده است که بتا پینن با ٤۳/۷۸ درصد، بیشترین ترکیب و پس از آن آلفا پینن با ۲۷/۲۷ درصد و میرسن با ۳/۳۷ درصد از ترکیبات مهم روغن میوه محسوب می‌شوند. همین‌طور نشان داده شده است که روغن موجود در این گیاه دارای خاصیت محدودکنندگی رشد در میکروارگانیسم‌ها است. ضمن این‌که میوه این گیاه پتانسیل استفاده به عنوان شوینده‌های آنتی‌باکتریال خوشبو را دارد [٦]. در بررسی ترکیبات این گیاه ثابت شده است صمغ این گیاه می‌تواند به عنوان چسب‌های نامرئی برای چسباندن سنگ‌های قیمتی نظیر الماس و یا جواهرات استفاده شود، همین‌طور شیرابه آن در صنعت چاپ، نساجی و عطرسازی کاربرد دارد [۷]. لذا با در نظر گرفتن اهمیت گیاه باریجه از نظر دارویی و صنعتی که آن را به عنوان یک مقوله صادراتی ارزشمند برای کشورمان معرفی می‌کند و از طرفی با توجه به ویژگی خاص گیاه مذکور به علت منوکارپیک بودن آن و دوره خواب طولانی بذر، تولید انبوه این گیاه با مشکل جدی مواجه است، ضمن این‌که با توجه به نتیجه تحقیقات سازمان جنگل‌ها و مراتع به دلیل برداشت نامناسب آن در مناطق رشد خودروی آن، خطر انقراض این گیاه مهم بومی ایران وجود دارد. لذا لزوم روش‌هایی برای به حداقل رساندن دوره خواب و جوانه‌زنی بذر از یک طرف و تکثیر و ریز ازدیادی این گیاه از طرف دیگر و همین‌طور افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه آن هرچه بیشتر احساس می‌شود. براین اساس چنین استنتاج می‌شود که بررسی این گیاه در حوزه مهندسی کشت بافت می‌تواند چه به عنوان یک روش منفرد و کاربردی برای تولید انبوه این گیاه و جلوگیری از انقراض آن و چه به عنوان یک قدم پایه و اساسی جهت ادامه تحقیقات و پژوهش‌ها در زمینه افزایش متابولیت‌های ثانویه، روشی موثر و مفید محسوب می‌شود. تحقیقات بر روی شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی این گیاه نشان داده است که حداقل زمان لازم برای انجام آن، با استفاده از پیش تیمارهای مختلف، ٤۰ روز است [۸]. ضمن این‌که در بررسی مجلات و انتشارات معتبر داخلی و خارجی، گزارشی مبتی بر به کارگیری تکنیک‌های کشت بافت بر روی این گیاه یافت نشده است، به این خاطر در بررسی حاضر، تلاش شده است تا با استفاده از کشت جنین در محیط *In vitro* زمان لازم برای شکستن خواب و جوانه‌زنی بذر این گیاه را به حداقل رسانده و با ایجاد گیاهچه کامل جهت تهیه ریز نمونه‌های مناسب برای القای کالوس، در نهایت با به کارگیری انواع محیط‌های کشت و سطوح هورمونی مختلف و ریزنمونه، کالزایی و ساقه‌زایی را در ارتباط با این گیاه بهینه کنیم.

[1] *Ferula gummosa* B.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

ضدعفونی و شکستن خواب بذر: بذر گیاه *F. gummosa*، از ارتفاعات استان مرکزی جمع‌آوری شدند. بذرها در ابتدا به مدت ٤٨ ساعت به منظور نرم شدن بافت آندوسپرم اطراف جنین در زیر آب جاری قرار داده شدند. سپس بذرها به جهت پاک‌سازی نسبی آلودگی‌ها و نیز بازدارنده‌های احتمالی موجود بر پوشش بذر، توسط مایع صابون (حاوی آمیزه سورفکتانت‌های آنیونی) و سپس با آب مقطر چندین بار شستشو داده شدند. سایر مراحل به منظور استریل کردن پوشش سطحی بذرها، در زیر لامینارفلو صورت گرفت. به این منظور، بذرها به صورت متوالی، به وسیله اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم (Nacl با ۲/۵ درصد کلر فعال) به مدت ۲۵ دقیقه با اضافه کردن چند قطره صابون مایع جهت افزایش جذب سطحی ضدعفونی شدند. سپس بذرها سه مرتبه با آب مقطر دوبار استریل شده، کاملاً شستشو داده شدند. محور جنینی توسط پنس و اسکارپل از پوشش بذر خارج شده و جنین‌ها در داخل لیوان‌های پیرکس حاوی محیط کشت‌های از قبل تهیه شده منتقل شدند و ظروف با نوار پارافیلم کاملاً ایزوله شدند و به اتاقک کشت با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰ lux برای ١٦ ساعت دوره روشنایی انتقال داده شدند. محیط کشت‌های استفاده شده جهت جوانه‌زنی جنین شامل محیط MS با غلظت کامل، ١/٨، ١/٤ از عناصر ماکرو و میکرو همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار در محیط ٦ – ٥/٨ = pH بود که با استفاده از اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ بار به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد.

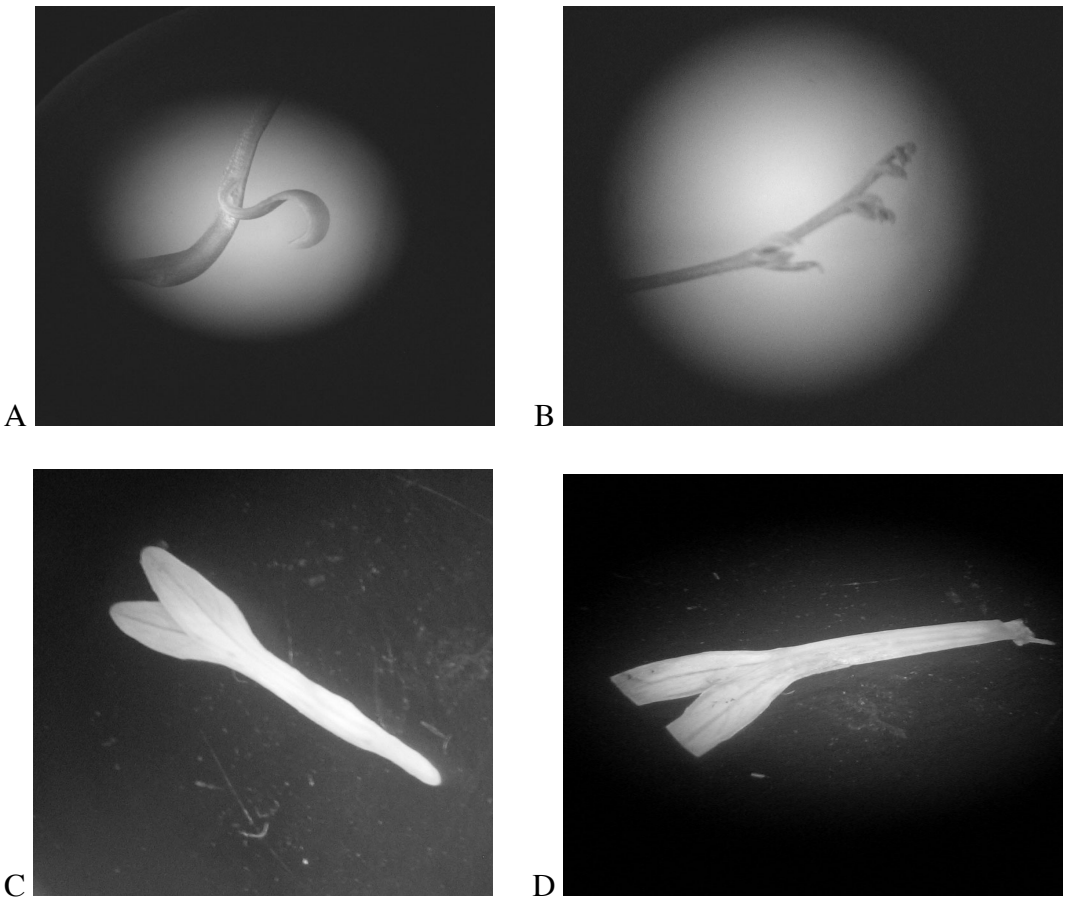
انواع ریزنمونه و سطوح هورمونی جهت القای کالوس: پس از دستیابی به گیاهچه‌های با بنیه مناسب (گیاهچه ٤٠ –۳۰ روزه) جهت تهیه ریزنمونه، از قسمت‌های مختلف گیاه: هیپوکوتیل، کوتیلدون‌ها، برگ اصلی، ریشه، جنین کامل و جنین برش یافته، ریز نمونه تهیه شد تا در فاز کالزایی استفاده شوند (شکل شماره ۱).

شرایط مختلف جهت ساقه‌زایی: کالوس‌های مناسب (۳۵ – ۳۰روزه) با منشای ریشه، هیپوکوتیل و جنین برش یافته به محیط‌های باززایی شامل محیط کشت‌های پایه MS ١/٤ همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار و B5 با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار، به همراه سطوح مختلف هورمونی شامل ١/٥ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ADS به تنهایی یا همراه با هم و یا هر کدام به تنهایی در ترکیب با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ABA و یا هر دوی آن‌ها (BAP, ADS) به همراه ABA (٦ تیمار هورمونی) منتقل شدند. به منظور تحریک ساقه‌زایی، پتری‌ها در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ١٦ ساعت روشنایی و شدت نور ۳۵۰۰ LUX و دمای ۲۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

درصد ساقه‌زایی، تعداد ساقه و طول ساقه، ۳۰ روز پس از قرار گرفتن کال‌ها در محیط ساقه‌زایی اندازه‌گیری شدند و در نهایت گیاهان باززا شده به محیط ریشه‌زایی داده شدند.

آنالیزهای آماری: در فاز کالزایی، آزمایش به صورت فاکتوریل (۲ فاکتوره) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در فاز باززایی، به دلیل پاسخ مثبت تنها در یکی از تیمارهای هومونی به کار برده شده، به تجزیه واریانس در ارتباط با منشای کالوس بسنده شد و برای این منظور از طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار استفاده شد. تجزیه آماری داده‌های حاصل، پس از انجام تست نرمال بودن داده‌ها و عدم نیاز به تبدیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای Excel، Minitab و MSTATC صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها در هر دو فاز با استفاده از آزمون توکی انجام شد. محیط کشت پایه در فاز کالزایی، محیط MS ١/٤ همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار، به علت پاسخ مثبت در فاز جوانه‌زنی بذر، انتخاب شد. سطوح مختلف کنترل‌کننده‌های رشد به کار برده جهت القای کالوس شامل ٢،٤،٦ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بودند. محیط کشت‌های تهیه شده با ٦– ٥/٨ =pH در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ بار و به مدت ۲۰ دقیقه استریل و سپس درون پتری تحت شرایط استریل در زیر لامینار ایر فلو توزیع شدند. پس از انتقال ریزنمونه‌های تهیه شده در

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱- ریزنمونه‌های A (کوتیلدون)، B (برگ اصلی)، C (جنین) و D (جنین برش یافته)

پتری‌های حاوی محیط کشت، پتری‌ها با نوار پارافیلم کاملاً ایزوله شده و به اتاق کشت با شرایط نور ممتد ضعیف (۱۲۰ lux) و دمای ۲۵ – ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در طی دوره رشد، کالوس‌ها با توجه به علایم نکروزه شدن به علت پخش مواد زائد گیاه از جمله فنل در محیط کشت و یا توقف در رشد کالوس، هر ۱٤–۱۰ روز یک‌بار واکشت می‌شدند.

درصد کالزایی، سطح کال و وزن کال‌ها به عنوان پارامترهای رشد کالوس، ۳۰ روز پس از قرار گرفتن ریز نمونه‌ها در محیط کشت کالزایی اندازه‌گیری شدند.

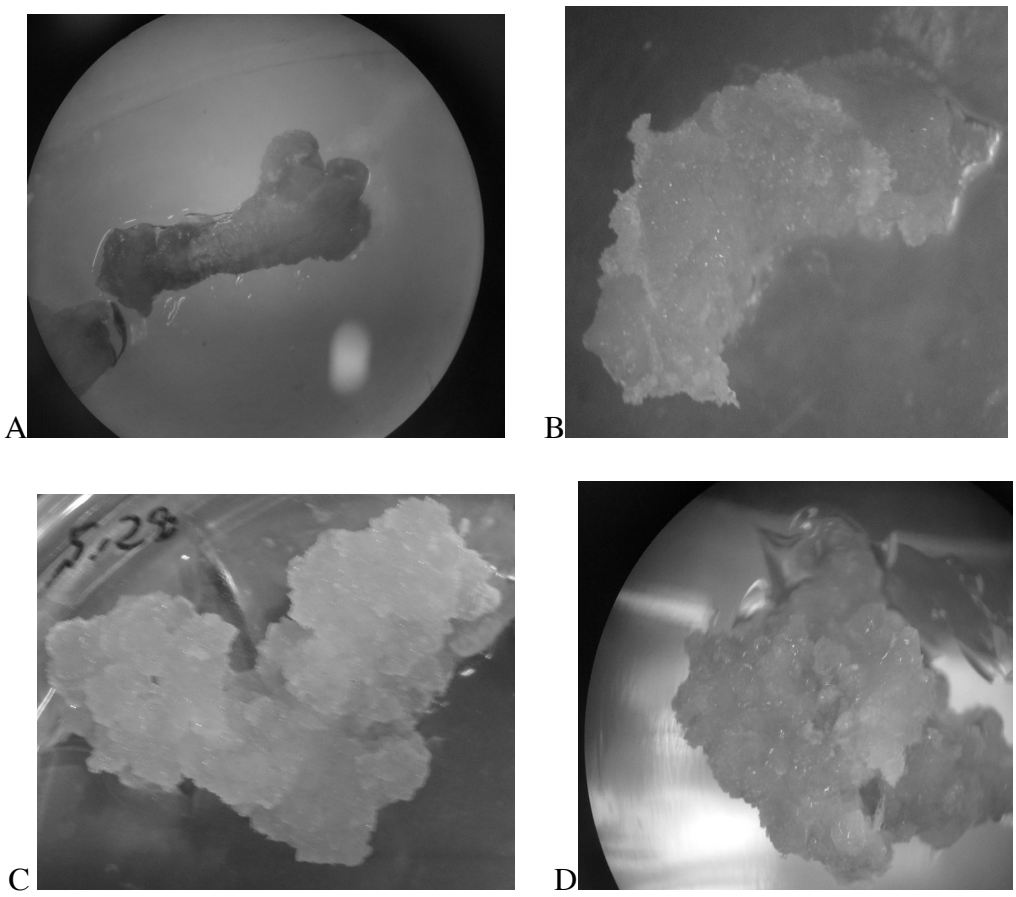
نتایج

جوانه‌زنی بذر: ۳-۲ روز پس از قرارگرفتن جنین‌ها در محیط کشت، جوانه‌زنی صورت گرفت. از میان محیط کشت‌های به کار برده شده تنها محیط کشت MS ۱/٤، پاسخ مناسبی جهت جوانه‌زنی جنین نشان داد و در دو محیط کشت دیگر جنین‌ها یا جوانه نزدند و یا پس از ۲–۱ روز از بین می‌رفتند. گیاهچه‌های کامل و با بنیه مناسب، ۳۰ – ۲۰ روز پس از کشت جنین ایجاد شدند.

القاء کالوس: اولین علایم مربوط به تورم و تکثیر سلولی در ریز نمونه‌های کشت شده، ۱۰ – ۷ روز پس از قرار دادن آنها در محیط کالزایی مشاهده شد (شکل شماره A ۲). اولین توده‌های کامل از هفته دوم تا سوم پدیدار شدند و بعد از گذشت ۳۵ – ۳۰ روز کالوس مناسب از لحاظ کیفیت و اندازه جهت انتقال به محیط ساقه‌زایی ایجاد می‌شد (شکل شماره ۲B,C,D) .

از میان ریز نمونه‌های استفاده شده، ریشه، جنین برش یافته، هیپوکوتیل و کوتیلدون‌ها، در تمامی تیمارهای هورمونی تولید کالوس نمودند. این در حالی بود که ریز نمونه‌های جنین

Archive
www.SID.ir



شکل شماره ۲– A ، آغاز تورم در ریزنمونه با منشا جنین برش یافته در محیط کالزایی، B نمونه‌ای از کال ۳۰ روزه با منشا هیپوکوتیل، C نمونه‌ای از کالوس حاصل از ریزنمونه با منشا ریشه ٤٠ روز پس از انتقال به محیط کالزایی،D نمونه‌ای از کال با منشا جنین برش یافته ۳۰ روز پس از انتقال به محیط

کامل و برگ اصلی در هیچ‌کدام از تیمارهای هورمونی پاسخی در جهت القای کالوس نشان ندادند.

مقایسه نتایج حاصل از دو ریزنمونه جنین کامل و جنین برش یافته نشان می‌دهد که برش ایجاد شده در قسمت‌های انتهایی می‌تواند القای کالوس را تحریک نماید و لزوم ایجاد یک تماس مستقیم از قسمت برش یافته جنین با محیط حاوی هورمون جهت تحریک کالزایی اثبات می‌شود.

براساس جدول تجزیه واریانس مربوط به بخش کالزایی، برای تمامی صفات اندازه‌گیری شده (درصد کالزایی، سطح کالوس و وزن کال‌ها) در سطح ۱ درصد، هم اثر نوع ریز نمونه و هم اثر نوع تیمارهای هورمونی به کار برده شده معنی‌دار تشخیص داده شده است (جدول شماره ۱).

مقایسه میانگین‌های انجام شده توسط آزمون توکی نشان داد که از میان ریز نمونه‌های القاء کننده کالوس، ریز نمونه جنین برش یافته بالاترین درصد کالزایی و ریز نمونه جنین برش یافته و ریشه بالاترین سطح کالوس و ریز نمونه ریشه سنگین‌ترین کالوس را داشته‌اند (جدول شماره ۲).

تفاوت قابل‌توجهی که در ارتباط با صفت وزن کالوس و سطح کالوس دیده می‌شود، نشان می‌دهد که کالوس‌های با منشای ریزنمونه ریشه فشرده‌تر بوده و دارای کیفیت بالاتری نسبت به کالوس‌های با منشای جنین برش یافته هستند. این ادعا از آن جهت عنوان می‌شود که اگرچه کالوس‌های حاصل از ریشه و جنین برش یافته هر دو دارای نتایج مشابهی در ارتباط با صفت سطح کالوس هستند، ولی در کالوس‌های با

Archive
www.SID.ir

جدول شماره ۱- تجزیه واریانس صفات درصد کالزایی، سطح و وزن کالوس در ۱۰ تیمار هورمونی

S.O.V		درصد کالزایی		سطح کالوس		وزن کالوس	
	DF	MS	F	MS	F	MS	F
ریزنمونه	۳	۱/۱۱	۷۸/۷۲**	٦٥/۰۹	۲۷/۹**	۰/۱۱۷	۳۳/٥۹۷**
هورمون	۹	۰/۳۲	۲۲/٦**	۱۲٦/۸	٥٤/۳٦**	۰/۱۱٥	۳۲/۹٤**
ریزنمونه × هورمون	۲۷	۰/۰۳	۲/۱۱٥**	۹/۱۱	۳/۹**	۰/۰٤٥	۱۲/۸٤**
خطا	۸۰	۰/۰۱٤		۲/۳۳		۰/۰۰۳	

**: معنی‌دار در سطح احتمالی ۰/۰۱

جدول شماره ۲- تاثیر انواع ریز نمونه بر صفات درصد کالزایی، سطح و وزن کالوس

	درصد کالزایی	سطح کالوس	وزن کالوس
ریشه	۰/۷۱۸[b]	۱۲/۰۰۰[a]	۰/۱۳۸[a]
هیپوکوتیل	۰/٥۹٥[c]	۹/٤٥٦[b]	۰/۰۲٦[bc]
کوتیلدون	۰/٤۰۹[d]	۸/۷۷٤[b]	۰/۰۱۹[c]
جنین برش یافته	۰/۸٦٤[a]	۱۰/۸۲۰[a]	۰/۰٤۹[b]

a: بیشترین سطح معنی‌دار بودن

d: کمترین سطح معنی‌دار بودن

منشای ریشه وزن بالاتری مشاهده می‌شود که این با نتایج آمده در فاز باززایی مبتنی بر درصد بالاتر ساقه‌زایی کالوس‌های با منشای ریشه تایید می‌شود. همین‌طور بر مبنای مقایسه میانگین‌ها، از میان سطوح هورمونی مختلف به کار برده شده، استفاده از هورمون NAA۱۰mg/l به همراه BAP ۲ mg/l بهترین نتیجه را در ارتباط با صفت وزن کالوس ایجاد کرد. این در حالی بود که ترکیبات هورمونی NAA ۱۰ mg/l به همراه BAP ۲ و ۱ از هورمون BAP بالاترین سطح کالوس را ایجاد کردند. در ارتباط با صفت درصد کالزایی، اکثر سطوح هورمونی شامل NAA و BAP بالاترین درصد کالزایی را نشان دادند. همین‌طور 2,4-D ٤ mg/l به همراه Kin ۱ mg/l درصد کالزایی قابل توجهی را نشان دادند (جدول شماره ۳).

هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد که استفاده از غلظت‌های بالای 2,4-D، القای کالوس را کاهش می‌دهد و غلظت پایین‌تر 2,4-D، صرف‌نظر از غلظت Kin به کار برده شده به همراه آن در ترکیب هورمونی، نتیجه بهتری را دربرداشت. همین‌طور غلظت ۱۰ mg/l از NAA صرف‌نظر از غلظت BAP، در ارتباط با صفات وزن و سطح کالوس نتیجه بهتری را نسبت به غلظت ٥ mg/l نشان می‌دهد.

ساقه‌زایی: کال‌های زنده و با بنیه مناسب با منشای ریشه،

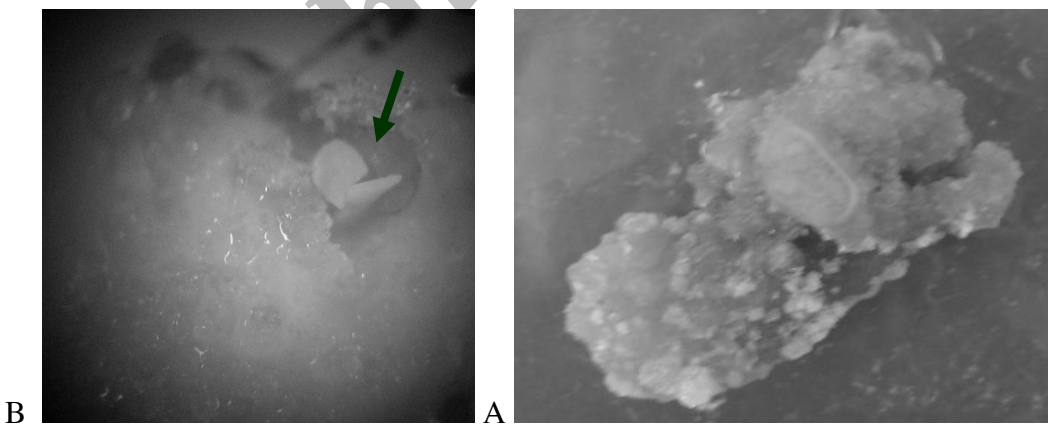
Archive of SID
www.SID.ir

هیپوکوتیل و جنین برش داده شده پس از انتقال به محیط باززایی، پس از ۷ – ۵ روز شروع به تشکیل گره‌های سفید رنگی می‌کردند که در حقیقت این نقاط قسمت‌های جنین‌زا برای شروع باززایی محسوب می‌شوند (شکل شماره A ۳). به طوری که با بررسی گره‌ها در زیر بینی کولار، جنین قلبی شکل به وضوح دیده می‌شود (شکل شماره B ۳).

جدول شماره ۳- تاثیر سطوح مختلف هورمونی بر صفات درصد کالزایی، سطح و وزن کالوس

24Dmg/l	Kin mg/l	درصد کالزایی	سطح کالوس	وزن کالوس
٤	١	٠/٧٦٣^{abc}	١١/١١٠^{b}	٠/٠٣١^{c}
٦	١	٠/٤٣٧^{e}	٧/٩٣٩^{de}	٠/٠٠٨^{c}
٨	١	٠/٤١٢^{e}	٦/٠٠٠^{e}	٠/٠٠٤^{c}
٤	٠/٥	٠/٦٥^{bcd}	١٠/٥٨٠^{bc}	٠/٠٢٥^{c}
٦	٠/٥	٠/٤٧٩^{de}	٩/٠٩٢^{bcd}	٠/٠١٥^{c}
٨	٠/٥	٠/٥٨١^{cde}	٩/٠٤٠^{bcd}	٠/٠١٤^{c}
BAP	**NAA**			
١	٥	٠/٦٧٧^{bc}	٨/٧٣٣^{cd}	٠/٠١٤^{c}
١	١٠	٠/٨٠٣^{ab}	١٥/٠٢^{a}	٠/١٤٩^{b}
٢	٥	٠/٧٩٧^{ab}	٨/٣٤٢^{cde}	٠/٠٠٩^{c}
٢	١٠	٠/٨٦٤^{a}	١٦/٥٢٠^{a}	٠/٣١١^{a}

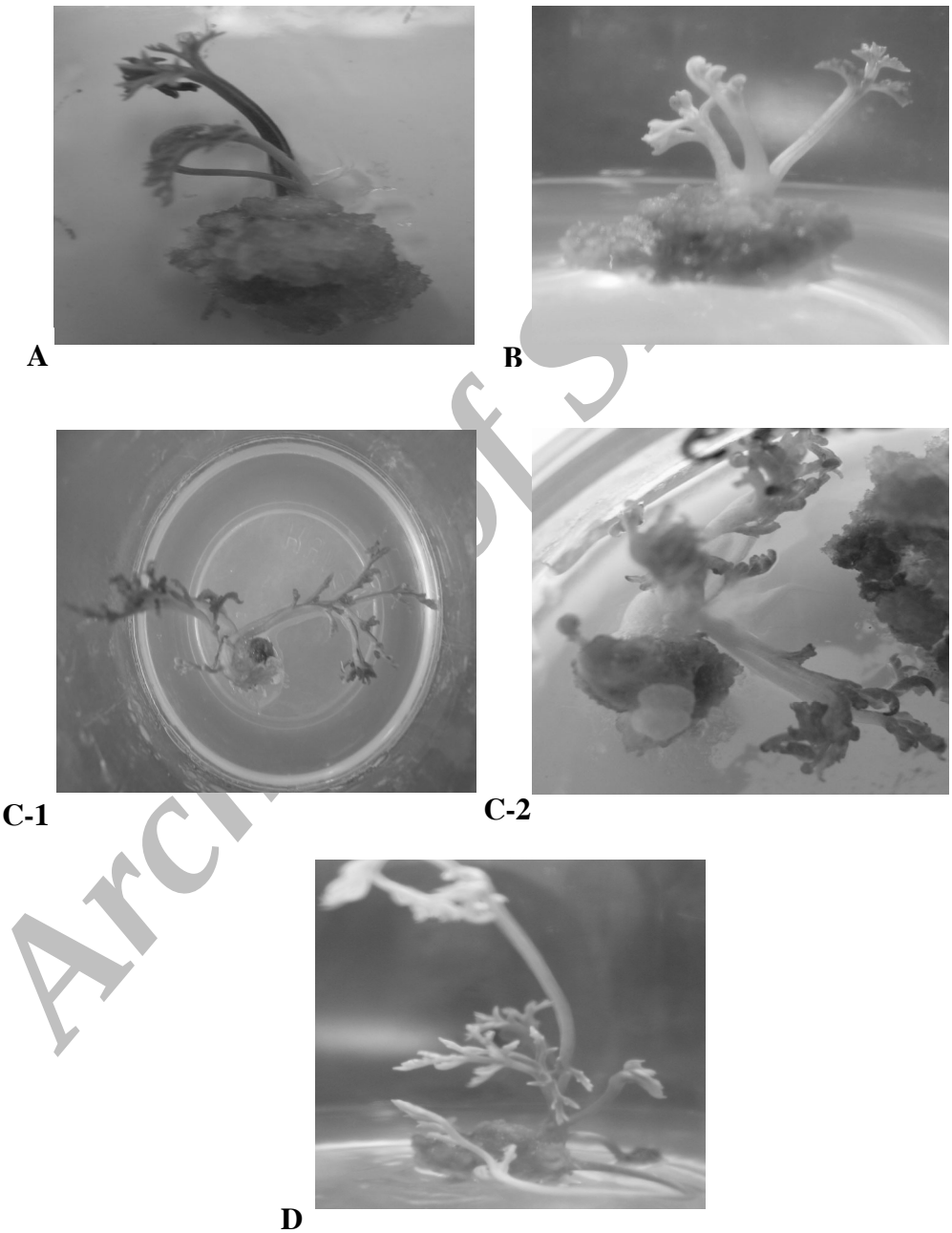
a: بیشترین سطح معنی‌دار بودن، e: کمترین سطح معنی‌دار بودن



شکل شماره ۳ A – گره‌های اولیه بر روی کال حاصل از هیپوکوتیل ۵ روز پس از انتقال به محیط باززایی و B تصویری مستقیم از تشکیل جنین قلبی شکل بر روی کال حاصل از جنین برش یافته که نشان‌دهنده مراحل اولیه تشکیل ساقه بر روی کال است.

Archive of SID
www.SID.ir

اولین ساقه‌های ایجاد شده روزهای هفتم الی دهم ظاهر می‌شوند. بعد از ایجاد اولین ساقه، ساقه‌های دیگر نیز با سرعت ایجاد می‌شوند به طوری‌که بعد از گذشت ۲۰ – ۱۵ روز، سه الی چهار ساقه و پس از سپری شدن ۳۰ روز حداکثر تعداد ساقه تشکیل شدند (شکل شماره ٤). در بررسی تاثیر محیط کشت پایه در القای ساقه مشاهده شد که از بین دو محیط کشت استفاده شده MS ۱/٤ و B5 تنها محیط B5 نتیجه‌بخش بود.



شکل شماره ٤– وجود سه ساقه بر روی کال‌های با منشا ریشه (A)، منشا هیپوکوتیل (B) و منشا جنین برش یافته (C-1,2)، ۲۰ روز پس از انتقال به محیط باززایی؛ وجود ۷ ساقه بر روی کالوس با منشا ریشه ۳۰ روز پس از انتقال به محیط باززایی (D)

www.SID.ir

از میان تیمارهای مختلف هورمونی به کار برده شده تنها ترکیب هورمونی BAP ۱/۵ mg/l به همراه ۰/۵ mg/l از هورمون ADS توانست باعث ایجاد ساقه بر روی کالوس‌ها شود.

در بررسی تجزیه واریانس منبع تغییر دیگر (منشای کالوس)، نتایج نشان داد که تفاوت بین ۳ منشای کالوس (ریشه، هیپوکوتیل و جنین برش یافته) فقط برای صفت درصد ساقه‌زایی معنی‌دار شد (جدول شماره ٤). آزمون توکی، کالوس با منشای ریشه را مناسب‌ترین کالوس به منظور درصد ساقه‌زایی بیشتر معرفی کرد (نمودار شماره ۱).

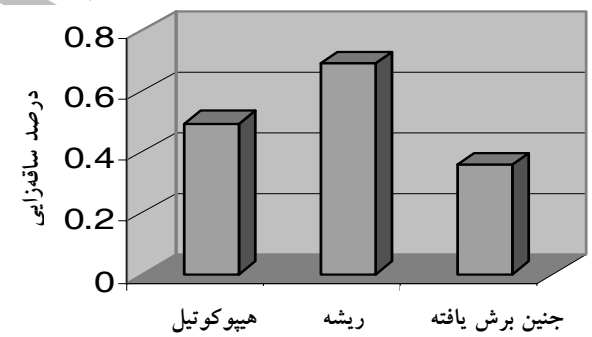
بحث

با توجه به نتایج به دست آمده، در بررسی کشت جنین درون شیشه جوانه‌زنی ۳ – ۲ روز بعد از کشت صورت گرفت که در مقایسه با روش کشت بذر تیمار شده با سرما به منظور کاهش دوره خواب بذر و جوانه‌زنی [۸] سرعت قابل توجهی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که با برداشتن پوشش جنین، عوامل بازدارنده رشد برطرف شده و جوانه‌زنی در مقایسه با روش انجام شده در بررسی نجفی و همکاران سریع‌تر انجام می‌شود. در فاز کال‌زایی تشکیل کالوس در ابتدا و بیشتر در لبه‌های برش یافته که تماس مستقیمی با محیط کشت داشتند صورت گرفت و به تدریج طی چند روز سرتاسر نمونه را فرا می‌گرفت که این نتایج با نتایج به دست آمده از گیاه *Cuminum cyminum* L. هم‌خوانی دارد [۹]. هم‌چنین پاسخ بهتر حاصل از به کارگیری ترکیب اکسین NAA به همراه سایتوکنین BAP، صرف‌نظر از غلظت‌های به کار برده شده، در ارتباط با سطح و وزن کالوس در پژوهش حاضر با نتایج بررسی‌های انجام شده بر روی گیاه Lavandula vera [۱۰] و

جدول شماره ٤– جدول تجزیه واریانس صفت درصد ساقه‌زایی در ارتباط با ۳ نوع کالوس

S.O.V	df	MS	F
انواع کالوس	۲	۰/۰۸۲	۵/۳۵*
خطا	٦	۰/۰۱۵	

*: معنی‌دار در سطح احتمالی ۰/۰۵



نمودار شماره ۱– اثر منشای کالوس بر درصد ساقه‌زایی: کالوس با منشای ریشه باعث تشکیل بیشترین تعداد ساقه

Archive of SID
www.SID.ir

گیاه .*Tecrium polium* L [۱۱]، هماهنگی نشان می‌دهد. در بررسی فاز باززایی مشاهده شد که از بین دو محیط کشت استفاده شده MS ۱/٤ و B5 تنها محیط B5 نتیجه‌بخش بود که با نتایج حاصل از بررسی باززایی بر روی گیاه Cumin مطابقت دارد [۱۲]. نتیجه به دست آمده هم‌چنین نشان می‌دهد که استفاده یک سیتوکنین به تنهایی (ADS یا BAP هر کدام به تنهایی) نمی‌تواند در القای ساقه‌زایی نتیجه‌بخش باشد، این در حالی است که به کار بردن آن‌ها با هم می‌تواند باعث تحریک ساقه‌زایی شود که مشابه این نتیجه در بررسی باززایی گیاه .*Cichorium intybus* L، مبنی بر سودمندی استفاده از ADS به همراه BAP در ایجاد ساقه به دست آمده است [۱۳]. دلیل این امر احتمالاً به اثر تقویت‌کنندگی دو سیتوکنین مذکور روی هم، در القای ساقه برمی‌گردد.

با توجه به نتایج به دست آمده، کشت جنین درون شیشه به منظور سرعت دادن به جوانه‌زنی، می‌تواند مشکل خواب طولانی بذر را مرتفع سازد. همین‌طور استفاده از محیط کشت‌ها و سطوح مختلف هورمونی و ریز نمونه به کار برده شده در فاز کالزایی جهت تولید کال‌های قوی و با کیفیت، به عنوان یک پژوهش بنیادی، برای استفاده در کشت سوسپانسیون و افزایش متابولیت‌های ثانویه از آن طریق توصیه می‌شود. هم‌چنین به کارگیری تکنیک کشت بافت در این بررسی جهت باززایی و ریزازدیادی می‌تواند قدمی موثر در تولید انبوه و در نتیجه جلوگیری از انقراض این گیاه ارزشمند بومی کشورمان محسوب شود.

منابع

1. Zargari A Medicinal Plants 2. Tehran University Press. 1989; pp: 598 - 602.

2. Ramezani M, Hosseinzade H and Mojtahedi K. Effects of *Ferula gummosa* B. fraction on morphine dependence in mice. *J. of Ethnopharmacol.* 2001; vol 77 (1): 71 - 5.

3. Sayyah M, Kamalinejad M, Bahrami R and Rustaiyan A. Antiepileptic potential and composition of fruit essential oil of *Ferula gummosa* B. *Biomed. J*. 2001; 5: 69 - 72.

4. Sayyah M, Mandgary A and Kamalinejad M. Evaluation of the anticovulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* B. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. *J. of Ethnopharmacol*. 2002; vol. 82 (3): 105 - 9.

5. Eftekhar F, Yousefzadi M and Borhani K. Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* B. seed. *Fitoterapia* 2004; vol. 75, 7/8: 758 - 9.

6. Ghasemi Y, Faridi P, Mehregan I and Mohagheghzadeh A. *Ferula gummosa* B. Friuts: An Aromatic Antimicribial Agent. *Chem. of Natur. Compounds* 2005; vol. 41 (3): 311 - 4.

7. Mortazaienezhad F and Sadeghian MM. Investigation of Compounds from Galbanum (*Ferula gummosa* B.). *Asian J. of Plant Sci.* 2006; 5 (5): 905 - 6.

8. Nadjafi F, Bannayan M, Tabrizi L and Rastgoo M. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *J. of arid environment*. 2005; 64 (3): 542 - 7.

9. Azza A. T and Noga G. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2002; 69: 35 - 40.

10. Dronne S, Jullien F, Caissard J.C and Faure O.A simple and efficient meyhod for in vitro shoot regeneration from leaves of Lavandin. *Plant Cell Reports* 1999; 18: 429 - 33.

11. Seifi H. Evaluation of effect of Culture Medium, hormone levels and explant on callus induction and regeneration and suspension culture of *Teucrium polium* In press. 2006.

12. Valizadeh M and Nematzadeh GA. Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of Cumin (*Cuminum cyminum*). Asian *J. of Agr. Res*. 2007; 1 (1): 17-22.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Nandagopal S and Ranjitha kumari BD. Adenine sulphate induced high frequency shoot organogenesis in callus and in vitro flowering of Cichorium intybus L. CV. Focus- apotent medicinal plant. *Acta Agr. Sloven*. 2006; 87 (2): 415 - 25.

Archive of SID

www.SID.ir