

ارزیابی فیتوشیمیایی و ژنومی گیاه دارویی چویر (*Ferulago angulata*) در شرایط مختلف کشت درون شیشه‌ای

لیا شوشتری^{۱*}، منصور امیدی^۲، اردشیر قادری^۳، امیررضا زارع کاریزی^۳، علی مهرآفرین^۳

۱- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

* آدرس مکاتبه: کرمانشاه، میدان فردوسی، انتهای شهرک متخصصین، مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی امام خمینی

(ره)، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کدپستی: ۶۷۱۸۹۹۷۵۵۱

تلفن: ۳۷۲۴۳۱۸۱ (۰۸۳)، نمابر: ۳۷۲۴۳۱۸۱ (۰۸۳)

پست الکترونیک: L_Shoostary@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۶/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۴

چکیده

مقدمه: چویر (*Ferulago angulata*) گیاهی در معرض انقراض است که با دارا بودن اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی به عنوان محافظ طبیعی مواد غذایی کاربرد دارد.

هدف: اثر شرایط مختلف کشت درون شیشه‌ای و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی بر تنوع سوماکلونال و همچنین میزان متابولیت‌های ثانویه گیاه چویر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: پس از بهینه‌سازی کالزایی، از محیط MS واجد NAA و BAP جهت باززایی استفاده شد. اسانس گیاهان باززاشده و رشد یافته در طبیعت استخراج و برای تعیین نسبت اجزای اسانس از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. به منظور بررسی تنوع سوماکلونال از نشانگرهای SCOT، CDBP و ISSR استفاده شد.

نتایج: بیشترین درصد کالزایی از ریزنمونه ریشه‌چه در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. بهترین نرخ باززایی مربوط به کالوس حاصل از هیپوکوتیل در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. گیاهان حاصل از باززایی حاوی متابولیت‌های ثانویه با مقادیر متفاوتی نسبت به گیاهان در رویشگاه طبیعی بودند. سطح زیر منحنی برای ترکیب α -Pinene در گیاهان رشد یافته در شرایط طبیعی و حاصل از کشت بافت به ترتیب ۲۷ و ۱/۵۳ درصد به دست آمد. عملکرد اسانس در گیاهان وحشی و حاصل از باززایی به ترتیب برابر ۲/۲۶ و ۰/۶۴ میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم ماده خشک بود. بررسی الگوهای بانندی حاصل از PCR بیانگر تفاوت ژنتیکی نمونه‌ها بود که ناشی از وقوع تنوع حاصل از کشت بافت می باشد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی، محیط درون شیشه‌ای باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در ژنوم و متابولوم این گیاه شده است.

کل واژگان: *Ferulago Angulata*، اسانس، تنظیم‌کننده‌های رشد، تنوع سوماکلونال



مقدمه

ترکیبات متعددی در گیاهان یافت می‌شوند که دارای اثرات درمانی بوده و به عنوان متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند. امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است زیرا مزیت‌های زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیبات از گیاهان تحت شرایط طبیعی دارد. برای نمونه، کنترل دقیق پارامترهای مختلف، سبب می‌شود تا کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند در حالی که ویژگی‌های کیفی در شرایط طبیعی مرتباً تحت تأثیر شرایط مختلف زیست-محیطی دستخوش تغییر قرار می‌گیرد [۱].

جنس *Ferulago* دارای حدود ۳۵ گونه در جهان می‌باشد که ۷ گونه آن بومی ایران است که سه گونه آن به صورت طبیعی رشد می‌کند [۲]. چویر با نام علمی *Ferulago angulate* از گیاهان دارویی چندساله و مهم ایران و متعلق خانواده *Apiaceae* می‌باشد [۳]. ویژگی‌های اقلیمی و آب و هوایی رویشگاه، ارتفاع از سطح دریا، شیب زمین و عمق خاک از عوامل محدودکننده فراوانی و پراکنش گونه‌ی *Ferulago angulate* محسوب می‌شوند که در مجموع این عوامل سبب ایجاد رویشگاه محدود از این گونه شده است [۴]. امروزه به علت بهره‌برداری بی‌رویه به خاطر ارزش دارویی و در نتیجه تخریب رویشگاه‌های طبیعی آن به دلیل چرای بیش از حد دام، این گیاه به طور جدی در معرض انقراض قرار گرفته است [۳].

گیاه چویر، یک گیاه دارویی محلی مورد توجه ساکنان بومی مناطق پراکنش آن بوده و مطالعات اندکی در مورد آن انجام گرفته است. برای این گیاه تاکنون اثرات بیولوژیک مختلفی نظیر اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌دیابتی [۵]، ضدانگلی، ضدقارچی، ضدباکتریایی [۶] و همچنین نگهدارنده مواد غذایی گزارش شده است [۷].

در تحقیقی در راستای شناسایی اجزای اسانس اندام هوایی گیاه *F. angulata*، تعداد سی و سه ترکیب که ۸۹/۷ درصد اجزا را تشکیل می‌داد، شناسایی شدند که ۷۷/۱ درصد آن مونوترپن‌ها و ۱۲/۶ درصد آن سزکویی‌ترین‌ها بودند. آلفاپینن (۱۷/۳ درصد)، بورنیل‌استات (۱۴/۴۵ درصد) و سیس‌اوسیمین (۱۴/۴ درصد) از ترکیبات اصلی اسانس گیاه بودند. در تحقیق

دیگری، بازده اسانس گیاه چویر ۰/۵ درصد گزارش شد و در مجموع از ۲۴ ترکیب شناسایی شده این گیاه، سیس‌بتا‌اوسیمین (۴۱/۳۵ درصد)، آلفاپینن (۱۸/۱۲ درصد)، گاماترپینن (۱۵/۶۱۳ درصد)، میرسن (۳/۲۸۳ درصد) و پاراسیمین (۳/۲۴۱ درصد) ترکیب‌های اصلی اسانس آن را تشکیل دادند [۸].

به هرحال گیاه چویر بومی ایران می‌باشد و در مناطق غربی ایران و نیز بخش‌های کوچکی از عراق و ترکیه پراکنش دارد [۴]. با توجه به پراکنش محدود و در معرض انقراض بودن این گیاه، امکان‌سنجی تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند آن در شرایط کشت درون شیشه‌ای و بهره‌گیری از راهکارهای زیست‌فناورانه در جهت بهبود و توسعه تولید ترکیبات دارویی این گیاه می‌تواند بسیار مهم باشد. بنابراین انجام مطالعات در راستای امکان‌سنجی تولید متابولیت‌های ثانویه آن در شرایط درون شیشه‌ای ارزشمند می‌باشد.

جنین‌زایی سوماتیکی به دلیل امکان تولید بیشتر و تکثیر مداوم توده جنین‌زا، امروزه به عنوان روشی مناسب برای تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان مطرح است [۹] که امکان تکثیر انبوه گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه را با استفاده از بیورآکتورها فراهم می‌نماید [۱۰]. تاکنون در زمینه کشت بافت گیاهان خانواده چتریان مطالعات متعددی در خصوص القای کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی انجام شده است. از آن جمله می‌توان به جنین‌زایی سوماتیکی در گیاهان گلبر [۱۱]، چترگندمی [۱۲]، هویج [۱۳]، زیره‌سبز [۱۴] و آنغوزه [۱۵] اشاره نمود.

کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد بویژه اکسین‌ها، انجام واکنش‌های متوالی، کمبود عناصر ضروری مانند کلسیم و اکسیژن، جهش‌زایی خودبخودی و تنش در شرایط آزمایشگاهی از عوامل احتمالی تنوع سوماکلونال محسوب می‌شوند. این تغییرات طیف کاملی از تغییرات ژنتیکی از سطح پلی‌پلوئیدی و آنیوپلوئیدی تا شکستگی‌های کروموزومی، نوتریبی ژن، از دست رفتن ژن، تحرک ترانسپوزونی و جهش‌های نقطه‌ای را شامل می‌شود [۱۶]. این پدیده بخصوص در کشت کالوس، کشت تعلیقی، کشت سلول و پرتوپلاست بیشتر دیده می‌شود [۱۷]. تنوع سوماکلونی طیف گسترده‌ای از خصوصیات ظاهری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را دربرمی‌گیرد که بعضی



با توجه به اهمیت اقتصادی گیاه چویر و همچنین خطر در انقراض بودن بخصوص کاهش تنوع زیستی آن در طبیعت، این تحقیق در راستای مقایسه تولید متابولیت‌های ثانویه چویر بین گیاهان رشد یافته در رویشگاه طبیعی و گیاهان حاصل از بازاریابی در شرایط کشت بافت و همچنین بهینه‌سازی غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت درون شیشه‌ای جهت کنترل تغییرات ژنتیکی ناخواسته بر اساس بررسی پایداری ژنتیکی گیاهان رشد یافته در شرایط کشت بافت با استفاده از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR به اجرا درآمده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور گیاه دارویی چویر در شهریورماه ۱۳۹۳ از ارتفاعات رشته کوه‌های شاهو (عرض جغرافیایی ۳۵،۱۱N؛ طول جغرافیایی ۴۶،۲۶E) واقع در استان کرمانشاه جمع‌آوری شد. بذرها جمع‌آوری شده به مدت ۴۸ ساعت در معرض آب جاری قرار گرفت و سپس با اتانول ۷۰٪ به مدت ۹۰ ثانیه، و توسط هیپوکلیت سدیم (۲/۵ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. در نهایت بذرها سه مرتبه با آب مقطر شستشو شدند.

کشت بافت

در مرحله القای کالوس، اثر سه فاکتور ریزنمونه (ریشه‌چه، هیپوکوتیل، کوتیلدون) و تنظیم‌کننده‌های اکسین 2,4-D (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و سیتوکینین BAP (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار بر ویژگی‌های کالوس چویر مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور انجام فرایند تمایززدایی و القای کالوس، نمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. القای کالوس حدوداً پس از گذشت ۱۵ روز از کشت ریزنمونه‌ها شروع و بعد از ۵ هفته در تمام واحدهای آزمایشی تشکیل کالوس قابل مشاهده بود. در این مرحله صفات درصد کلزایی، وزن تر و وزن خشک کالوس اندازه‌گیری شد. به

از آنها ممکن است در اصلاح گیاهان مهم باشد [۱۸]. اما از آنجاکه این تنوع معمولاً با برخی ناهنجاری‌های ظاهری و فیزیولوژیکی همراه است در روش‌های تولید درون شیشه‌ای مانند ریزازدیادی و کشت کالوس به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه سعی بر آن است که تا حد امکان با کنترل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و تعداد واکشت از بروز تغییرات ژنتیکی احتمالی جلوگیری شود. شناسایی تنوع سوماکلونال ممکن است بر اساس بررسی خصوصیات ظاهری کالوس یا گیاهان باززا شده امکان‌پذیر باشد اما در بسیاری از موارد نمی‌توان با اطمینان در خصوص وقوع تنوع سوماکلونال اظهار نظر نمود. از این رو، استفاده از روش‌های ملکولی در شناسایی تغییرات ژنتیکی روی داده در شرایط کشت بافت می‌تواند بسیار کارآمد باشد. یکی از این روش‌ها، استفاده از تکنیک PCR بر اساس پرایمرهای اختصاصی یا غیر اختصاصی ژنوم است. تحقیقات متعددی نشان داده که استفاده از نشانگرهای DNA می‌تواند در شناسایی وقوع تنوع سوماکلونال کارآمد باشد. فیروزی و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی در مورد میزان تنوع سوماکلونال در کشت‌های سوسپانسیون گیاه دارویی ماریتیغال با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR نشان داد الگوی نواری ریزنمونه‌های مختلف و حتی تکرارهای یک واکشت متفاوت بودند [۱۹]. در پژوهش دیگری تغییرات سوماکلونال در گیاهان باززا شده از کشت کالوس گیاه دارویی *Ducrosia anethifolia* با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP مورد بررسی قرار گرفت. در این روش بررسی از دو سیستم هضم آنزیمی حساس و غیرحساس به متیلاسیون استفاده شد و نتایج نشان داد که نشانگرهای AFLP به عنوان دسته دیگری از نشانگرهای مبتنی بر PCR نشانگرهایی مطمئن در بررسی تنوع سوماکلونال هستند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که پدیده متیلاسیون می‌تواند به عنوان یکی از عوامل بروز تغییرات سوماکلونال در کشت بافت مطرح باشد [۲۰]. در نتایج تحقیق دیگری که تغییرات ژنتیکی در کشت بافت ریزنمونه‌های جنین گندم دووم با استفاده از شش آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت و کارایی این نشانگرها در ارزیابی تنوعات سوماکلونال گزارش شد [۲۱].



بررسی ترکیبات اسانس

قسمت‌های هوایی گیاه جمع‌آوری شده از رویشگاه طبیعی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بدور از تابش مستقیم نور خورشید به مدت یک هفته خشک شد. استخراج اسانس از بافت گیاهان باززا شده و رشد یافته در شرایط طبیعی با استفاده از روش زیر انجام شد؛ به منظور بررسی روغن فرار گیاهان جمع‌آوری شده از عرصه از روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر با زمان ۱۵۰ دقیقه صورت گرفت. سپس اسانس حاصل از تقطیر با هگزان نرمال استخراج و سپس با سولفات سدیم انیدر خشک شد. برای استخراج اسانس از نمونه‌های حاصل از کشت بافت، ۱۰ گرم از بافت گیاهان باززاشده با پنج میلی‌لیتر دی کلرومتان در هاون چینی ساییده شد. ترکیب حاصل به فالكون انتقال داده شد و به منظور جداسازی سانتریفیوژ (g × ۴۰۰۰) به مدت ۱۰ دقیقه دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) شد و سپس محلول رویی جدا و تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر تغلیظ و سپس یک میکرولیتر از به دستگاه GC/MS تزریق شد [۲۴]. برای شناسایی اجزای اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی GC/MS استفاده شد. دستگاه کروماتوگرافی مورد استفاده از نوع Agilent 6890 با ستون به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی آن به این صورت تنظیم شد که دمای ابتدایی آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، دمای انتهایی ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و ۳ دقیقه توقف در این دما بود. دمای اتافک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت (فلو) ۰/۵ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده مدل Agilent 5973c با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون به ترتیب ۲۲۰ و ۲۹۰

منظور باززایی گیاهچه، کالوس‌های جنین‌زای حاصل از مرحله قبل به محیط‌های باززایی شامل ترکیبات مختلفی از غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و NAA در ترکیب با BA، انتقال یافته و کشت‌ها در اتافک رشد تحت درجه حرارت 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. گیاهان کامل باززا شده به آرامی از آگار جدا شده و پس از شستشوی ریشه گیاه با آب ولرم، ۲۴ ساعت در آب معمولی نگهداری شده و سپس، در گلدان‌های حاوی ترکیب خاکی کوکوپیت، پرلیت و ورمی‌کولیت با نسبت ۱:۲:۱ کشت شدند. سپس به ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درصد انتقال یافت.

ارزیابی ملکولی

استخراج DNA ژنومی از کالوس‌های رشد یافته در غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر اساس روش CTAB [۲۲] انجام و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد. واکنش‌های PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر DNA ژنومی، دو میکرولیتر آغازگر الیگو نوکلئوتیدی، شش میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس 2x (شرکت سینا کلون) در دستگاه ترموسایکلر Biorad- T-100 انجام شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE (Tris, Boric Acid, EDTA) تفکیک شدند. امتیازدهی الگوهای به دست آمده بر اساس مقیاس صفر و یک صورت گرفت و تجزیه‌های آماری شامل تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی پس از برآورد فواصل ژنتیکی بر اساس ضریب فاصله دایس با استفاده از نرم‌افزار DARwin 6.1 انجام شد. همچنین شاخص‌های نشانگر (MI) و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) آغازگرهای مختلف بر اساس فرمول‌های مربوطه برآورد شد [۲۳]. در این تحقیق از سه نشانگر JSSR، SCoT و CBDP استفاده شد که توالی‌های آغازگرهای انتخابی برای هریک از سیستم‌های نشانگری در جدول شماره ۱ ارایه شده است.



جدول شماره ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده و مقادیر تعداد باند چند شکل (PB)، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و

شاخص نشانگر (MI) مربوط به هر آغازگر

| MI | PIC | PB | توالی (5' _ 3') | آغازگر |
|------|------|----|--------------------|--------|
| ۱/۶ | ۰/۳۲ | ۵ | DBDACACACACACACACA | ISSR-1 |
| ۰/۹۹ | ۰/۳۳ | ۳ | GGATGGATGGATGGAT | ISSR-2 |
| ۱/۴ | ۰/۳۵ | ۴ | GACAGACAGACAGACA | ISSR-3 |
| ۰/۸ | ۰/۲ | ۴ | AGAGAGAGAGAGAGAGY | ISSR-4 |
| ۱/۶۸ | ۰/۴۲ | ۴ | TGAGCACGATCCAATCTA | CBDP-1 |
| ۱/۸۴ | ۰/۴۶ | ۴ | TGAGCACGATCCAATCAG | CBDP-2 |
| ۱/۲ | ۰/۳ | ۴ | TGAGCACGATCCAATCGA | CBDP-3 |
| ۱/۲۳ | ۰/۴۱ | ۳ | TGAGCACGATCCAATCGG | CBDP-4 |
| ۱/۹۶ | ۰/۲۸ | ۷ | CAACAATGGCTACCACCA | SCoT-1 |
| ۱/۱۴ | ۰/۳۸ | ۳ | CAACAATGGCTACCACCC | SCoT-2 |
| ۰/۷۵ | ۰/۲۵ | ۳ | CAACAATGGCTACCACCG | SCoT-3 |
| ۱/۴۸ | ۰/۳۷ | ۴ | CAACAATGGCTACCACCT | SCoT-4 |

(D=A, G, T, B=C, G, T, Y=C, T)

ریزنمونه برگ لپه‌ای به تشکیل کالوس در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در مقایسه با دو ریزنمونه دیگر ضعیف‌تر بود. حداکثر میزان تشکیل کالوس در ریزنمونه برگ لپه‌ای (۸۳/۳۳ درصد) در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. با افزایش غلظت هورمون 2,4-D در محیط کشت، وزن تر کالوس افزایش اما وزن خشک کالوس کاهش یافت که این موضوع می‌تواند به نقش این هورمون در سرعت انجام تقسیمات سلولی و تولید سلول‌های جوان و آبکی شدن کالوس مربوط باشد. همچنین ارزیابی کالوس‌ها بر اساس مشاهدات میکروسکوپی حاکی از تشکیل ساختارهای کروی جنین‌زا در تیمارهای هورمونی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود.

کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف (ریشه‌چه، هیپوکوتیل، برگ کوتیلدون) در بخش کالزایی، به منظور بررسی میزان تشکیل نوساقه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BA و NAA واگشت شد. بر اساس نتایج حاصل تنها در چند مورد از محیط‌های کشت، تولید نوساقه از کالوس حاصل از هیپوکوتیل مشاهده شد و محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به عنوان بهترین محیط برای تولید نوساقه شناسایی شد (شکل شماره ۱).

درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌سنج جرمی و ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه دیجیتالی صورت گرفت [۲۵].

نتایج

القای کالوس و باززایی گیاهچه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد تشکیل کالوس، وزن تر و وزن خشک کالوس بر روی هر ریزنمونه نشان داد که اثر هر یک از عوامل ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی و نوع ریزنمونه و همچنین اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه معنی‌دار بود (جدول شماره ۲). بیشترین مدت زمان برای تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای مشاهده شد، به طوری که القای کالوس از این ریزنمونه در بیشتر تیمارهای هورمونی ۳-۴ هفته پس از کشت، قابل مشاهده بود. نتایج نشان داد تشکیل کالوس کاملاً به ترکیبات هورمونی و نوع ریزنمونه وابسته بود. بیشترین درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه‌های ریشه‌چه (۱۰۰٪) در تیمار هورمونی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. پاسخ



جدول شماره ۲- تجزیه واریانس اثر عامل‌های اکسین، سیتوکینین و ریزنمونه بر درصد تشکیل کالوس، وزن تر و وزن خشک کالوس

| میانگین مربعات صفات مورد مطالعه | | | درجه آزادی | منابع تغییر |
|---------------------------------|--------------|--------------|------------|------------------------------|
| وزن خشک | وزن تر | درصد کالزایی | | |
| ۹۷۵۶/۵۶** | ۴۳۸۰۰۷/۷۲** | ۱۷۸۹/۳۵** | ۲ | اکسین (A) |
| ۷۰۴۶۳/۱۷** | ۳۷۶۷۱۷۶/۶۴** | ۱۶۲۰/۳۷* | ۲ | سیتوکینین (B) |
| ۱۵۹۱۹/۱۶** | ۸۹۰۴۷۸/۶۸** | ۸۴۹۱۶/۱۰** | ۲ | ریزنمونه (C) |
| ۸۰۹۴/۳۴** | ۸۱۸۷۰۶/۶۴** | ۱۳۷۲/۶۹** | ۴ | اکسین × سیتوکینین |
| ۱۸۱۹/۱۰** | ۸۲۶۱۶/۴۵** | ۸۹۵/۲۶* | ۴ | اکسین × ریزنمونه |
| ۵۳۵۹/۵۶** | ۲۶۲۳۶۳/۹۱** | ۳۸۵۶/۸۳** | ۴ | سیتوکینین × ریزنمونه |
| ۴۷۳۳/۴۲** | ۳۶۸۴۹۰/۳۱** | ۷۲۸/۵۹* | ۸ | اکسین × سیتوکینین × ریزنمونه |
| ۴۳/۱۲ | ۶۱/۷۶ | ۴۲۲/۴۵ | ۵۴ | خطا |

**وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد، * وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد



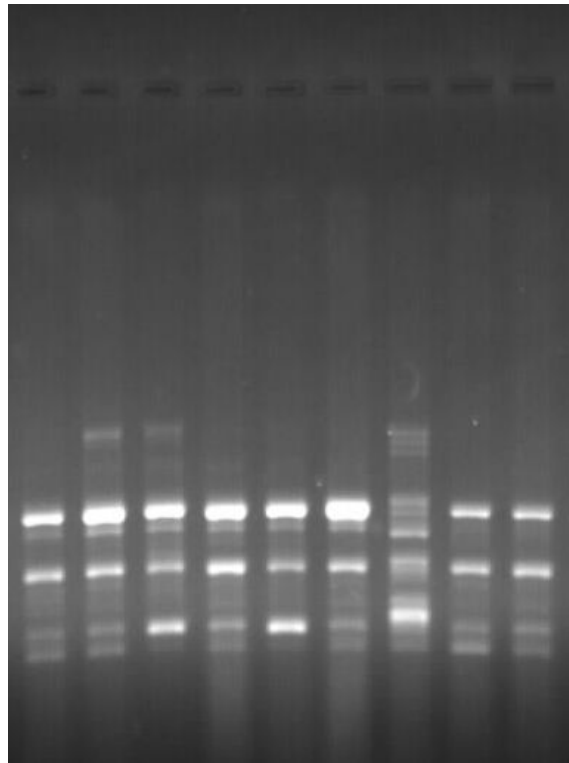
شکل شماره ۱- کالوس‌های تشکیل شده در مرحله کالزایی گیاه *Ferulago angulata*

ارزیابی مولکولی

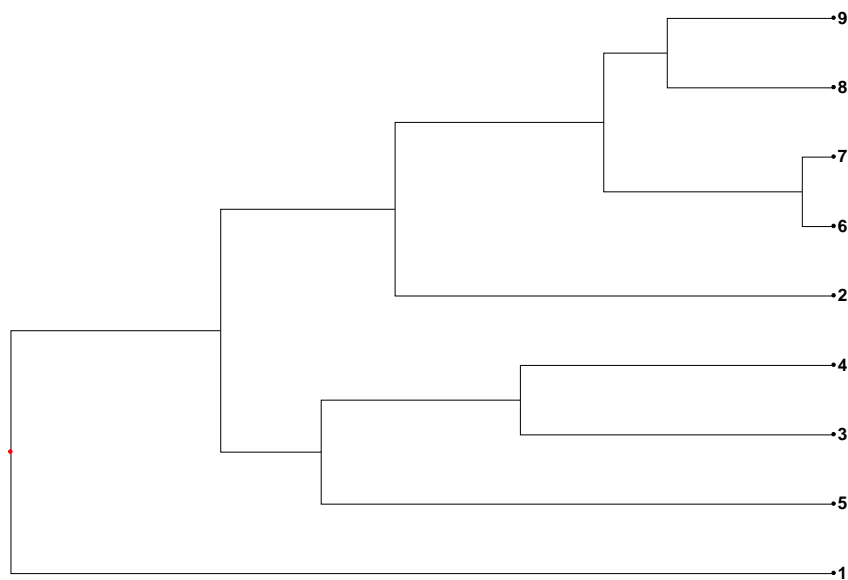
جهت بررسی تنوع سوماکلونال در ۹ تیمار مورد بررسی، ۱۲ آغازگر مختلف شامل سه گروه از آغازگرهای ISSR، CBDP و SCoT مورد استفاده قرار گرفت که همه آغازگرها، باندهای چندشکل قابل امتیازدهی تولید نمودند. متوسط تعداد باندهای چند شکل برای نشانگرهای ISSR، CBDP و SCoT به ترتیب ۴، ۳/۷۵ و ۴/۲۵ باند به ازای هر آغازگر بود. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای حاصل از سه نشانگر ISSR، CBDP و SCoT (شکل شماره ۲)، میانگین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد ارزیابی بر اساس ضریب فاصله دایس [۲۶]. برابر

۰/۳۵ به دست آمد که این مقدار فاصله ژنتیکی بیانگر تنوع نسبتاً پایین در بین مواد ژنتیکی مورد بررسی می‌باشد. دامنه تغییرات فاصله ژنتیکی بین ۲ تا ۶۴ درصد متغیر بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله دایس و الگوریتم UPGMA بیانگر گروه‌بندی نمونه شاهد در فاصله دورتری از سایر نمونه‌ها بود (شکل شماره ۳). همچنین نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی ضمن تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها از پوشش ژنومی مناسبی برخوردار بوده‌اند (شکل شماره ۴).



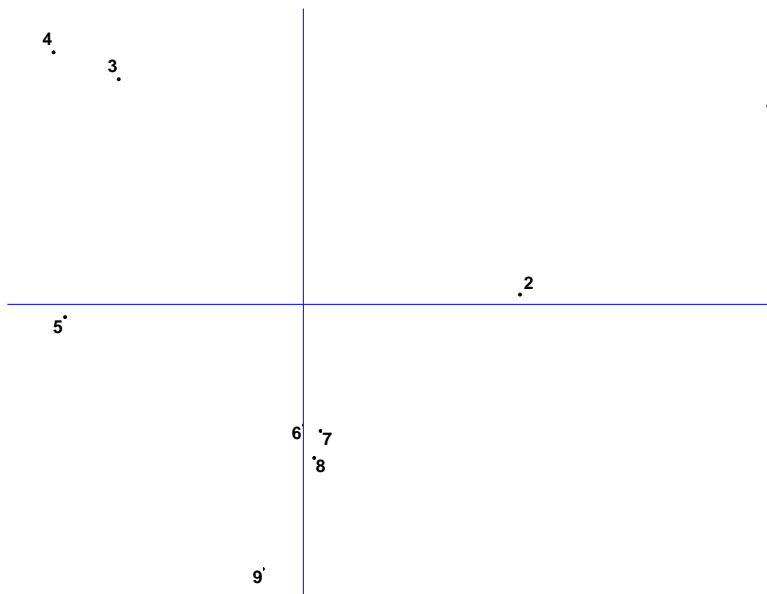


شکل شماره ۲- الگوی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگر CBDP



شکل شماره ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های مورد ارزیابی بر اساس چند شکلی حاصل از نشانگرهای ISSR، CBDP و SCoT با استفاده از ضریب دایس و الگوریتم UPGMA





شکل شماره ۴- تجزیه به مختصات اصلی نمونه‌های مورد ارزیابی بر اساس چند شکلی حاصل از نشانگرهای JSSR، CDBP و ScoT

بررسی ترکیبات اسانس

درصد اسانس در قسمت‌های هوایی گیاهان رشد یافته در طبیعت برابر ۲/۲۴ میلی‌لیتر اسانس به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک بود در حالی که این مقدار در گیاهان حاصل از کشت بافت بسیار کمتر و برابر ۰/۶۴ میلی‌لیتر اسانس به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک بود. همچنین ۳۴ ترکیب (۹۶/۴ درصد اسانس) در اسانس حاصل از گیاهان رشد یافته در رویشگاه طبیعی و ۱۴ ترکیب (۱۷ درصد کل بافت گیاه) از گیاهان حاصل از بازرایی از کالوس در شرایط درون شیشه‌ای شناسایی شدند. مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده اسانس در گیاهان رشد

یافته در شرایط طبیعی شامل Ocimene (α - β) (۲۹/۸ درصد)، gamma- α -Pinene (۲۷ درصد)، Isobornyl (۷/۷ درصد)، gamma-Terpinene (۴/۹ درصد) بود. از سوی دیگر، ترکیبات (E)- α -Farnesene (۳/۸۰ درصد)، gamma-Murolene (۲/۶۰ درصد)، 2, 3, 6 – trimethylbenzaldehyde (۲/۷۵ درصد)، α -Pinene (۱/۵۳ درصد)، Cis-Chrystanthenyl (۱/۱۳ درصد) و gamma-Terpinene (۰/۵۶ درصد) از اجزای اصلی اسانس در گیاهان حاصل از ریزازدیادی در شرایط درون شیشه‌ای شناسایی شدند (جدول شماره ۳).



جدول شماره ۳- اجزای تشکیل دهنده اسانس در گیاه دارویی چویر در دو شرایط رشد یافته در طبیعت و حاصل از ریزازدیادی

| Samples KI | اسانس گیاه رشد یافته در طبیعت | | گیاه باززا شده * | | نام ترکیب | شماره |
|---------------|-------------------------------|-------------|------------------|-------------|----------------------------------|-------|
| | Area (%) | شناسایی شده | Area (%) | شناسایی شده | | |
| ۹۲۴ | ۰/۰۷ | ✓ | - | - | Tricyclene | ۱ |
| ۹۲۷ | ۰/۱۹ | ✓ | - | - | α -Thujene | ۲ |
| ۹۳۵ | ۲۷/۰۱ | ✓ | ۱/۵۳ | ✓ | α -Pinene | ۳ |
| ۹۵۲ | ۲/۸۰ | ✓ | - | - | Camphene | ۴ |
| ۱۲۶۴ | - | - | ۱/۱۳ | ✓ | Cis-Chrysanthenyl acetate | ۵ |
| ۱۲۸۸ | - | - | ۰/۵۱ | ✓ | Cis-Verbenyl acetate | ۶ |
| ۹۵۷ | ۰/۲۱ | ✓ | - | - | Thuja-2,4(10)-diene | ۷ |
| ۹۷۵ | ۰/۶۰ | ✓ | - | - | Sabinene | ۸ |
| ۹۸۱ | ۱/۲۲ | ✓ | - | - | β -Pinene | ۹ |
| ۱۳۷۵ | - | - | ۲/۶۰ | ✓ | 2, 3, 6 – trimethyl benzaldehyde | ۱۰ |
| ۱۴۲۶ | - | - | ۰/۵۴ | ✓ | β -Ylangene | ۱۱ |
| ۱۴۹۱ | - | - | ۲/۷۵ | ✓ | gamma-Murolene | ۱۲ |
| ۹۹۲ | ۳/۵۶ | ✓ | ۰/۶۵ | ✓ | Myrcene | ۱۳ |
| ۱۰۱۱ | ۰/۶۷ | ✓ | - | - | α -Phellandrene | ۱۴ |
| ۱۰۲۱ | ۱/۱۰ | ✓ | - | - | α -Terpinene | ۱۵ |
| ۱۰۳۰ | ۲/۴۶ | ✓ | - | - | p-Cymene | ۱۶ |
| ۱۰۳۳ | ۲/۶۴ | ✓ | - | - | Limonene | ۱۷ |
| ۱۰۳۶ | ۰/۱۸ | ✓ | - | - | β -Phellandrene | ۱۸ |
| ۱۰۴۱ | ۲۹/۸۴ | ✓ | ۰/۴۶ | ✓ | (z- β)Ocimene | ۱۹ |
| ۱۰۵۰ | ۱/۵۱ | ✓ | - | - | (E- β)Ocimene | ۲۰ |
| ۱۰۶۳ | ۴/۸۵ | ✓ | ۰/۵۶ | ✓ | gamma-Terpinene | ۲۱ |
| ۱۰۸۹ | ۰/۵۷ | ✓ | - | - | Terpinolene | ۲۲ |
| ۱۱۳۳ | ۳/۲۲ | ✓ | - | - | allo-Ocimene | ۲۳ |
| ۱۱۵۱ | ۰/۳۹ | ✓ | - | - | cis-Verbenol | ۲۴ |
| ۱۱۵۵ | ۱/۲۰ | ✓ | - | - | trans-Verbenol | ۲۵ |
| ۱۱۸۹ | ۰/۱۸ | ✓ | - | - | Terpinene-4-ol | ۲۶ |
| ۱۲۲۰ | ۰/۰۸ | ✓ | - | - | Verbenone | ۲۷ |
| ۱۲۳۰ | ۰/۰۷ | ✓ | - | - | trans-Carvacrol | ۲۸ |
| ۱۲۹۱ | ۷/۷۰ | ✓ | ۰/۳۹ | ✓ | Isobornyl | ۲۹ |
| ۱۳۸۱ | ۰/۱۸ | ✓ | - | - | α -Copaene | ۳۰ |
| ۱۳۸۹ | ۰/۰۸ | ✓ | - | - | β -Bourbonene | ۳۱ |
| ۱۴۳۴ | ۰/۲۹ | ✓ | - | - | gamma-Elementene | ۳۲ |



ادامه جدول شماره ۳-

| Samples KI | اسانس گیاه رشد یافته در طبیعت | | گیاه باززا شده * | | نام ترکیب | شماره |
|---------------|-------------------------------|-------------|------------------|-------------|---------------------|-------|
| | Area (%) | شناسایی شده | Area (%) | شناسایی شده | | |
| ۱۴۵۶ | ۰/۰۹ | ✓ | - | - | (z,β) Farnesene | ۳۳ |
| ۱۵۱۶ | - | - | ۳/۸۰ | ✓ | (E, E)- α-Farnesene | ۳۴ |
| ۱۷۱۶ | - | - | ۲/۳۰ | ✓ | (E)-gamma-Atlantone | ۳۵ |
| ۱۴۷۴ | ۰/۰۵ | ✓ | - | - | β-Acroadiene | ۳۶ |
| ۱۴۸۳ | ۰/۸۸ | ✓ | - | - | gamma-Curcumene | ۳۷ |
| ۱۴۸۹ | ۲/۹۲ | ✓ | - | - | Germacrene D | ۳۸ |
| ۱۵۰۴ | ۰/۲۰ | ✓ | ۰/۳۵ | ✓ | Bicyclogermacrene | ۳۹ |
| ۱۵۲۶ | ۰/۲۵ | ✓ | ۰/۲۵ | ✓ | delta-Cadinene | ۴۰ |
| ۱۵۷۰ | ۰/۱۴ | ✓ | - | - | Germacrene B | ۴۱ |

*: درصد شناسایی شده نسبت به کل بافت گیاه باززا شده از کالوس بیان شده است.

بحث

ریزنمونه هیپوکوتیل جهت القای کالوس در گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) نیز گزارش شده است [۲۹]. تفاوت در توان کالزایی ریزنمونه‌ها می‌تواند مربوط به تفاوت فعالیت‌های متابولیکی و مقدار هورمون‌های درون‌زا باشد و تیمار با اکسین برون‌زا شاید بتواند به عنوان یک وضعیت تنش‌زا توسط بافت تلقی شده و روند تقسیمات سلولی را به سوی جنین زایی تغییر دهد [۳۰]. ترکیباتی که باعث القا و رشد کالوس می‌شوند از طریق گیرنده‌های خاصی در غشا یا سیتوپلاسم شناسایی شده و در نتیجه برهم‌کنش این ترکیبات با جایگاه‌های شناسایی آنها در بافت هدف، نوع پاسخ تعیین خواهد شد. بدین ترتیب ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، میزان متفاوتی از کالزایی را نشان می‌دهند [۳۱، ۳۲].

در بررسی اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر وزن کالوس مشخص شد که غلظت 2,4-D با وزن تر کالوس دارای رابطه مستقیم و با وزن خشک کالوس دارای رابطه معکوس می‌باشد که این موضوع را می‌توان به نقش 2,4-D در افزایش حجم سلول‌ها به دلیل آبکی شدن مرتبط دانست. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در محیط‌های کشت MS فاقد اکسین میزان القای کالوس بسیار پایین بود که این موضوع بیانگر نقش کلیدی اکسین در فرایند کالزایی می‌باشد. تناسب در غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد جهت القای کالوس در بسیاری از گیاهان

گیاه چویر (*Ferulago angulate*) یکی از گیاهان بومی غرب ایران است که در ارتفاعات زاگرس رشد می‌کند و از لحاظ ترکیبات مؤثره دارویی دارای ارزش خاصی می‌باشد. تکثیر این گیاه به علت وجود دوره‌ی خواب بذر و منوکارپیک بودن آن با محدودیت زیادی مواجه بوده و همه ساله بخش بزرگی از رویشگاه‌های آن به سبب برداشت بی‌رویه در حال تخریب می‌باشد. لذا تکثیر سریع این گیاه با تکیه بر روش‌های زیست فناوریانه و بهره‌گیری از روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند آن می‌تواند راهکاری برای حفظ تنوع زیستی و جلوگیری از انقراض این گونه دارویی خاص باشد.

نتایج بررسی القای کالوس در مطالعه حاضر نشان داد اگرچه همه سلول‌های گیاه حاوی تمام اطلاعات ژنتیکی لازم برای به وجود آوردن یک گیاه کامل هستند [۲۷]، اما ریزنمونه‌های مختلف برای تولید کالوس توانایی یکسانی ندارند. بر اساس نتایج این تحقیق بافت ریشه ریزنمونه مناسب‌تری در مقایسه با دو ریزنمونه دیگر برای القای کالوس شناسایی شد که مشابه با نتایج تحقیقات مشابه در زمینه القای کالوس در گیاه چویر می‌باشد [۲۸]. اگر چه در این تحقیق ریزنمونه هیپوکوتیل نیز کالزایی قابل قبولی را نشان داد. مناسب بودن



همچنین گیاهان باززا شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای، فاقد تعدادی از متابولیت‌های ثانویه بودند. در گیاهان رشد یافته در رویشگاه طبیعی و گیاهان حاصل از ریزازدیادی به ترتیب ۳۴ و ۱۴ ترکیب شناسایی شد که نشان‌دهنده تفاوت زیادی میان این دو گروه از گیاهان مورد بررسی است. با وجود موارد مذکور، تولید دو ترکیب مهم α -Pinene و gamma-Terpinen در گیاهان حاصل از ریزازدیادی، نشان می‌دهد که روش کشت بافت می‌تواند به عنوان یکی از راهکارهای تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه مهم در این گیاه مورد استفاده قرار گیرد. وجود تفاوت‌های معنی‌دار بین ترکیبات موجود در اسانس گیاهان حاصل از کشت بافت و گیاهان رشد یافته در شرایط طبیعی در تحقیقات زیادی گزارش شده است [۳۸، ۳۹، ۴۰]. این تفاوت فاحش میان ترکیب و محتوای اسانس گیاهان رشد یافته در شرایط طبیعی و گیاهان حاصل از ریزازدیادی ممکن است به دلایل مختلفی باشد. از جمله عوامل مؤثر بر این اختلافات می‌توان به تنوع ژنتیکی، شرایط محیطی، مواد غذایی موجود در خاک و محیط کشت اشاره نمود. این عوامل می‌توانند نقش مهمی بر مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های گیاهی داشته باشند [۴۱].

نتیجه‌گیری

به طور کلی این تحقیق نشان داده که شرایط محیط کشت از جمله غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، می‌تواند بر وقوع تغییرات ژنومی، میزان و نوع متابولیت‌های ثانویه گیاه چوبی مؤثر باشد. نشانگرهای CBDP به عنوان نشانگرهای هدفمند ژنی در شناسایی تنوع سوماکلونال از کارایی مناسبی برخوردار بوده‌اند. همچنین شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌تواند نوع و مقدار متابولیت‌های ثانویه را در گیاه چوبی دستخوش تغییر نماید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه به خاطر فراهم آوردن امکانات و حمایت مالی برای انجام این تحقیق سپاسگزار می‌شود.

گزارش شده است [۳۳]. هورمون 2,4-D در بسیاری از گیاهان با ایجاد سیگنال‌هایی در شروع جنین‌زایی نقش دارد [۳۴]. مکانیسم عمل اکسین‌ها در فرایندهای تنظیمی و فیزیولوژیکی سلول به حضور گیرنده‌های پروتئینی در سطح غشا، سیتوپلاسم و هسته بستگی دارد که در نهایت RNA پلی-مرازهای مسئول رونویسی از ژن‌های دخیل در تنظیم تقسیم سلولی را فعال می‌کنند [۳۵].

تفاوت‌های مشاهده شده در الگوهای بانندی حاصل از PCR و نیز باندهای اختصاصی در گیاه شاهد و تیمارهای هورمونی، بیانگر تفاوت ژنتیکی نمونه‌ها است که ناشی از تنوع حاصل از کشت بافت یا تنوع سوماکلونال می‌باشد. تشکیل باندهای اختصاصی در تیمارها، وجود تنوع ژنتیکی و تأثیر کشت بافت در ایجاد تنوع ژنتیکی در این نمونه‌ها را نشان می‌دهد. کاربرد نشانگرهای مبتنی بر PCR در بررسی تنوع سوماکلونال در مطالعات مختلفی گزارش شده است. از جمله می‌توان به کاربرد نشانگر RAPD در بررسی تنوع سوماکلونال در موز [۳۶]، استفاده از نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع سوماکلونال در کشت سوسپانسیون گیاه دارویی ماریتغال [۱۹] و استفاده از پلی مورفیسم حاصل از نشانگر AFLP در بررسی تنوع سوماکلونال در کشت بافت گیاه مارچوبه [۳۷] و گیاه وشا [۲۰] اشاره نمود.

در بررسی فواصل ژنتیکی بین نمونه‌های مختلف، بیشترین مقادیر فاصله ژنتیکی مربوط به فاصله بین نمونه رشد یافته در محیط شاهد با نمونه‌های رشد یافته در محیط‌های حاوی غلظت‌های بالاتر 2,4-D بود. این نتایج بیانگر آنست که استفاده از هورمون 2,4-D در غلظت‌های بالا می‌تواند منجر به تغییرات ژنومی جدی شود. مقایسه متوسط میزان شاخص محتوای اطلاعات چند شکل برای نشانگرهای مختلف نشان داد که نشانگرهای CBDP با محتوای اطلاعات چند شکل برابر با ۰/۴ در مقایسه با دو نشانگر دیگر از کارایی بیشتری جهت تفکیک نمونه‌ها برخوردار می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی فیتوشیمیایی نشان داد که میزان تولید اسانس در گیاهان حاصل از کشت بافت در مقایسه با گیاهان رشد یافته در رویشگاه طبیعی بسیار کمتر می‌باشد.



1. Chawla H.S. Introduction to Plant Biotechnology. 3th ed. Science Publishers, 2009, p: 451.
2. Mozaffarian V. A dictionary of Iranian plants name. Farhang Moaser. 1966, pp: 657-669.
3. Jalili A and Jamzad Z. A preliminary survey of endemic, rare and endangered plant Species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands IR. 1999, p: 675.
4. Rezazadeh S, Yazdani D and Shahnazi S. Chemical composition of essential oil of *Ferulago angulata* Boiss. Inflorescence From west of Iran. *J. Med. Plants* 2003; 3 (7): 49-52.
5. Sodefian GH, Ansari K, Bamoniri A and Mhrjalili B. Study of chemical composition of the essential oil of *Ferulago angulate* (SCHELCHT) BOISS. From Iran supercritical fluids extraction and nano scale injection. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2011; 6 (1): 161-168.
6. Taran M, Ghasempour H and Shirinpour E. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago carduchorum angulata* subsp. *Jundishapur J. Microbiol.* 2010; 3 (1): 10-14.
7. Ghasempour HR, Shirinpour E and Heidary H. The Constituents of essential oil of *Ferulago angulate* (Schlecht) boiss at two different habitate, nevakoh and shahoo, zagross mountain western Iran. *Iranian Journal of Science and Technol. Transaction A* 2007; 31 (3): 1-10.
8. Javidnia K, Miri R, Edraki N, Khoshneviszadeh M and Javidnia A. Constituents of the volatile oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. From Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2006; 18: 548-550.
9. Khosravi S, Azghandi AV, Hadad R and Mojtahedi N. In vitro micrpropagation of *Lilium longiflorum*. *J. Agricultural Research: Seed and Plant* 2007; 23: 159- 168.
10. Karkonen A. Plant tissue culture as models for tree: somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies, *Plant Physiol.* 2004; 3: 62-69.
11. Wakhlu AK and Sharma RK. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Heracleum candicans* Wall. *Plant Cell Rep.* 1998; 7: 866 - 869.
12. Bang J. W. In, D. S.; Chung S. H and Liu J. R. Plant regeneration from embryogenic cells-derived protoplasts of *Bupleurum falcatum*. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 1999; 55: 151 - 154.
13. Imani J, Thi L.T, Langen G, Arnholdt-Schmitt B, Roy S, Lein C, Kumar A and Neumann KH. Somatic embryogenesis and DNA organization of genomes from selected *Daucus* species. *Plant Cell Rep.* 2001; 20: 537 - 541.
14. Tawfik A.A and Noga G. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 2002; 69: 35 - 40.
15. Hassani B, Saboor A, Radjabia T and Fallah Hussein H. Somatic Embryogenesis of *Ferula assafoetida*. *JUST.* 2008; 33 (4): 15-23.
16. Larkin PJ, Ryan SA, Brettle RIS and Scowcroft WR. Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1984; 76: 443-455.
17. Etienne H and Bertrand B. Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol.* 2003; 23 (6): 419-426.
18. Ce lia Miguel and Liliana Marum. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 2011; 62 (11): 3713 - 3725.
19. Firouzi A, Mohammadi SA, Khosroshahli M, Movafeghi A, Hasanloo T and Khoramdel S. Applying elicitors and feeding with precursor in suspension cell cultures of milk thistle *Silybum marianum* and their effect on silymarin production.



- 6th National Biotech. Cong. of Iran, 13-15 Aug., 2009, Tehran-Iran.
- 20.** Shoostari L, Omidi M, Majidi E, Naghavi M, Ghorbanpour M and Etminan A. Assessment of somaclonal variation of regenerated *Ducrosia anethifolia* plants using AFLP markers. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnol.* 2013; 17 (4): 99-106.
- 21.** Shafiei S, Shoostari L and Etminan A. Assessment of the tissue-culture induced variation in durum wheat (*Triticum turgidum*) under normal and osmotic stress conditions. *Biological Forum – An International J.* 2015; 7 (1): 1760-1763.
- 22.** Doyle JJ and Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987; 19: 11-15.
- 23.** Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE and et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 1993; 36: 181 - 186.
- 24.** Shams Ardakani MR, Abdi KH, Jamshidi AH and Haji Akhondi A. The study of volatile oil of *Foeniculum Vulgar* Miller. In their tissue culture and omparison with the whole plant. *J. Med. Plants* 2005; 4 (15): 73 - 80.
- 25.** Naghdi Badi H, Salek Hashemi S, Nasrollahnezhad Qomi A, Navabpour S and Qaderi A. Phytochemical Evaluation and Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis of *Ferulago angulata* subsp. *Carduchorum* (Boiss. and Hausskn), an Endangered Medicinal Plant. *J. Med. Plants* 2017; 16 (63): 92-107.
- 26.** Nei M and Li WH. Mathematical modes for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1979; 76: 5269 - 5273.
- 27.** Dong JZ and Dunstan N. Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. In: Jan SM, Minocha SC, (eds). *Molecular Biology of Woody Plants* 2002; 1: 51-87.
- 28.** Mortazavi R, Dehdari M and Masoumiasl A. Study of Callus Induction of Medicinal Chavil Plant (*Ferulago angulata* B.) Using Types of Explants and Growth Regulators. *Agricultural Biotechnol.* 2016; 6 (2): 73-80.
- 29.** Zebarjadi AR, Motamedi MJ, Taravat E and Ismaili A. Micropropagation of Medicinal Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.) Using Cotyledon and Hypocotyl Segments. *Journal of Plant Researches* 2013; 26 (3): 311-319.
- 30.** Majd A, Poor Mohammad Fatali., Mirzaei M. Study effects of some plant growth regulators on somatic embryogenesis and its histological stages in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) var. Y. *J. Plant Reasearches* 2010; 20 (4): 49-56.
- 31.** Mockeviciute R, Anisimoviene N. Indole-3-acetic acid receptors in the cytosol. *Biologija* 1999; 4: 90-93.
- 32.** Khavar KM, Sarihan E, Sevimay C, Cucu S, Parmaksiz S, Uranbey S, Ipek A, Kaya MD, Sancak C and Ozcan S. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata*. *Period Biol.* 2005; 107: 113-116.
- 33.** Thomas TD and Maseena EA. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* Linn. an important medicinal plant. *Scientia Horti.* 2006; 108: 332-336.
- 34.** Nomura K and Komamine A. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht, 1995, 3: 249 - 266.
- 35.** Dudits D, Gyorgyey J, Bogre L and Bako L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro Embryogenesis in Plants* 1995; 3: 267 - 308.
- 36.** Sheidai M, Aminpoor H, Noormohammadi Z and Farahani F. RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musa acuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis* 2008; 52 (2): 307-311.
- 37.** Pontaroli AC and Camadro EL. Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term



callus cultures. *Genet. Mol. Biol.* 2005; 28 (3): 423-430.

38. Randriamampionona D, Diallo B, Rakotoniriana F, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Corbisier A, Mahillon J, Ratsimamanga S and Jaziri MJ. Comparative analysis of active constituents in *Centella asiatica* samples from Madagascar. *Application for ex situ conservation and clonal propagation Fitoterapia* 2007; 78 (7-8): 482-489.

39. Romani A, Vignolini P, Galardi C, Aroldi C, Vazzana C and Heimler D. Polyphenolic Content

in Different Plant Parts of Soy Cultivars Grown under Natural Conditions. *J. Agric. Food. Chem.* 2003; 51: 5301 - 5306.

40. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N. Antioxidant Activity of Some Algerian Medicinal Plants Extracts Containing Phenolic Compounds. *Food Chem.* 2006; 97: 654 - 660.

41. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 2001; 161: 839-851.



Genomic and Phytochemical Assessment of Chavir (*Ferulago angulate*) under Different *in vitro* Conditions

Shooshtari L (Ph.D.)^{1*}, Omid M (Ph.D.)², Qaderi A (Ph.D.)³, Zare Karizi AR (M.Sc.)³, Mehrafarin A (Ph.D.)³

1- Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

2- Department of Agronomy and Plant Breeding College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

*Corresponding author: Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Tel & Fax: +98-83-37243181

E-mail: L_shooshtary@yahoo.com

Abstract

Background: *Ferulago angulata* (Known in Iran as Chavir) is an endangered species with Anti fungal and anti-bacterial activity that can act as a natural preservator.

Objective: Evaluation the effect of *in vitro* culture conditions and plant growth regulators on somaclonal variation and the phytochemical content of *in vitro* regenerated plants.

Methods: Induced calli were transferred to Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-Benzylaminopurine (BAP) for regeneration stage. The essential oils were extracted by Clevenger apparatus and the yield and composition of essential oils were assayed by GC/Mass. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Start codon Targeted (SCoT) and CAAT Box Derived Polymorphism (CBDP) markers were used to assess somaclonal variation.

Results: The highest callus formation was obtained via radicle explant in MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 1mg/L BAP. Maximum percentage of regeneration was occurred via derived calli from hypocotyl in MS medium supplemented with 0.1 mg/L BAP and 0.5 NAA. The phytochemical assay revealed a considerable differences between natural habitats and *in vitro* regenerated plants. The percentage of α -Pinene in plants derived from natural habitats and *in vitro* conditions were 27 and 1.53 respectively. The yield of essential oils were 2.26 and 0.64 (ml/100g D.M.) in natural habitats and *in vitro* regenerated plants respectively. The result of PCR assay indicated genetic variation between tissue cultured samples.

Conclusion: The results indicated that *in vitro* culture conditions had a considerable effect on genome and metabolome of *Ferulago angulate*.

Keywords: *Ferulago angulata*, Callus induction, Plant growth regulator, Somatic embryogenesis

