Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۱۳۳-۱۲۳ (۱۳۹۵)

ریزازدیادی گیاه دارویی آنغوزه (*Ferula assa- foetida* L.)

احمد نوروزیان[۱]، مجید معصومیان[۲*]، محمدعلی ابراهیمی[۳] و غلامرضا بخشی خانیکی[۴]

۱- کارشناس ارشد پژوهشی، گروه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران. تهران

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران. تهران

پست الکترونیک: masoumian200@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۹

چکیده

این تحقیق با هدف بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه دارویی آنغوزه (*Ferula assa- foetida* L.) انجام شد. اثرات سیتوکینین‌ها (BAP, 2ip, Kin)، اکسین‌ها (IBA، NAA و Pic) و تاثیر متقابل این هورمون‌ها در غلظت‌های مختلف (صفر تا ۲/۵ میلی‌گرم درلیتر) بر روی محیط MS و در شرایط کشت درون شیشه ارزیابی شد. نتایج حاکی از تاثیر بیشتر هورمون BAP بر ساقه‌زایی و رشد طولی گیاهچه‌ها بود و غلظت ۱ میلی‌گرم درلیتر این هورمون، با میانگین ۳ ساقه به ازای هر ریزنمونه، اختلاف معنی‌داری با دیگر غلظت‌های مورد بررسی نشان داد و افزایش ۶۶ درصد ساقه‌زایی نسبت به شاهد را در پی داشت. هم‌چنین بلندترین ساقه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP ایجاد شد. در این مطالعه، محیط MS حاوی یک میلی‌گرم برلیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، مناسب‌ترین تیمار به‌منظور ریزازدیادی گیاهچه و ایجاد ریشه‌های غده‌ای مطلوب برای تکثیر متوالی گیاهچه، تشخیص داده شد. در این ترکیب هورمونی، میانگین ارتفاع گیاهچه‌ها ۳/۹۶ سانتی‌متر بود که در مقایسه با شاهد (۲/۲۸ سانتی‌متر) ۵۷/۶ درصد افزایش نشان داد. تعداد ساقه جانبی نیز با میانگین ۳ عدد به ازای هر ریزنمونه در مقایسه با شاهد سه برابر افزایش داشت. این مطالعه نشان داد ریشه‌های غده‌ای در مقایسه با ریشه‌های طویل از توانایی ساقه‌زایی بیشتری برخوردارند. هم‌چنین به‌دلیل وجود ریشه‌های طویل هم در شرایط طبیعی و هم در کشت درون شیشه، مشخص شد آنغوزه حاوی اکسین درون‌زا است.

واژه‌های کلیدی: اکسین، آنغوزه، ریزازدیادی، ریشه‌زایی، سیتوکینین، کشت بافت.

مقدمه

آنغوزه *Ferula assa- foetida* L. گیاهی است از تیره چتریان (Apiaceae)، علفی، کرکدار و مونوکارپیک که تنها راه تجدید حیات طبیعی آن، از طریق تولید و پراکنش بذر است. مونوکارپیک بودن این گیاه باعث می‌شود تا شیره پرورده در سال‌های آخر صرف تشکیل بذر شده و پس از گل‌دهی و تولید بذر، گیاه برای همیشه خشک شده، از بین برود (Omidbeigi *et al*., 2006). منابع ژنتیکی اصلی آنغوزه همواره از عرصه‌های طبیعی تامین شده و برداشت صمغ از ریشه گیاه با روش‌های سنتی تیغ زنی نامناسب که گاهی به‌دلیل سودجویی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

اقتصادی بر روی بوته‌های کمتر از ۴ سال نیز صورت می‌گیرد، منجر به از بین رفتن گیاه و کاهش شدید باردهی در سال‌های بعد می‌شود. با توجه به‌دوره رشد رویشی طولانی ۵ تا ۷ ساله آنغوزه و هم‌چنین میزان تولید اندک بذرهای دارای خواب این گیاه، کاربرد ریزازدیادی، به‌منظور حفظ این گونه ارزشمند، امری ضروری است. ریزازدیادی امکان تکثیر سریع گیاهانی که ازدیاد آنها با روش‌های معمول غیرممکن و یا مشکل است را فراهم می‌سازد (Haaj Najari, 1994). هدف از ریزازدیادی، بیشینه تولید یک گیاه در زمانی معین و در عین حال ایجاد مجموعه‌ای از گیاهان با ویژگی‌های ژنتیکی یکسان با صفات کمّی و کیفی مورد نظر است (Jafari Mofidabadi & Tabaei Aghdaei, 2001). سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها از مهم‌ترین هورمون‌های مورد استفاده در کشت بافت گیاهی‌اند که نقش مهمی در القای ساقه‌زایی و ریشه‌زایی دارند. این تحقیق با هدف مقایسه اثرات بهترین هورمون و در عین حال مناسب‌ترین غلظت هورمون‌های سیتوکینینی شامل BAP، کینتین و 2iP، به‌منظور ساقه‌زایی آنغوزه و هم‌چنین بررسی اثر متقابل بهترین هورمون اکسین و سیتوکینین بر ریزازدیادی این گیاه در شرایط کشت درون شیشه انجام شده است. در خصوص پرآوری این گیاه با استفاده از هورمون‌های گیاهی، تحقیقات جامعی صورت نگرفته است. در عین حال می‌توان به مطالعات جنین‌زایی سوماتیکی (Hassani & Rajabian, 2008) و باززایی از طریق کالوس (Zare *et al*., 2011) و اندام‌زایی و جنین‌زایی آنغوزه (Otroshi *et al*., 2013) اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی مواد گیاهی

بذر آنغوزه گونه *F.assa-foetida* L. از اداره منابع طبیعی جهاد کشاورزی طبس تهیه شد. با هدف از بین بردن آلودگی‌های سطحی در ابتدا بذرها با آب جاری به‌خوبی شسته شده، سپس با الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ضد عفونی شده و مجددا" با آب مقطر در سه مرحله زمانی ۲، ۳ و ۵ دقیقه‌ای زیر هود لامینار شستشو شدند. در ادامه، بذرها در ظروف شیشه‌ای حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط MS تحت تیمارهای هورمونی BAP، Kin و 2iP در غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم درلیتر) و تیمارهای هورمونی IBA، NAA و Pic به منظور ریشه‌زایی در غلظت‌های (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی‌گرم درلیتر) با شرایط نوری ۳۰۰۰ لوکس، دمای۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این آزمایش، هر هفته صفات مرتبط با پرآوری شامل طول (ارتفاع) گیاهچه و تعداد ساقه جانبی و صفات ریشه‌زایی شامل طول ریشه و تعداد ریشه جانبی اندازه‌گیری شدند. این صفات در هفته چهارم به حداکثر میزان خود رسیدند. تجزیه آماری داده‌ها نیز بر اساس بیشترین رشد انجام شد. تجزیه داده‌ها در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با ۳ تکرار برای هر تیمار که هر تکرار حاوی۳ ریزنمونه بود، انجام شد. به‌منظور بررسی اثرات همزمان بهترین ترکیب‌های هورمونی نیز آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی، با ۳ تکرار برای هر تیمار، انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن به‌کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام و گراف‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار EXCEL نسخه ۲۰۰۷ رسم شد. روش نمونه‌گیری نیز بر اساس مشاهده مستقیم از تمام گیاهان داخل تکرار بود.

نتایج

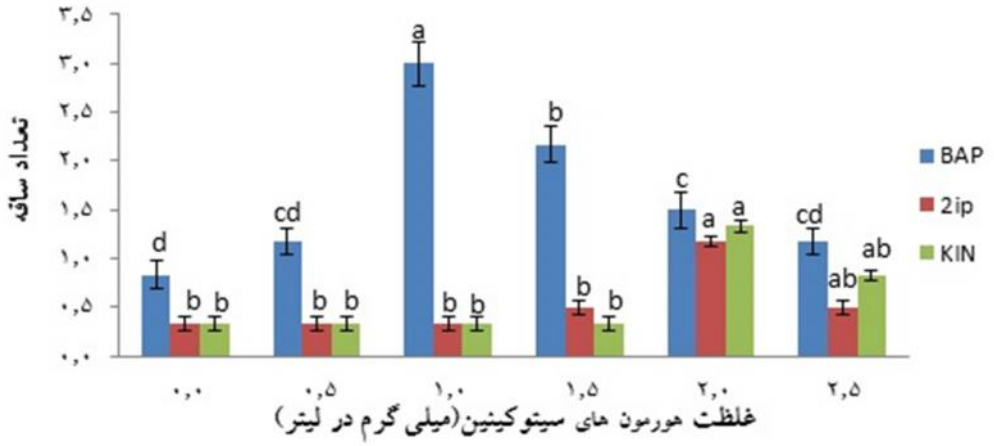
اثر هورمون‌های سیتوکینینی بر ساقه‌زایی گیاهچه آنغوزه

به‌طور کلی نتایج حاصل از بررسی اثرات هورمون‌های سیتوکینینی شامل(Kin, 2iP, BAP)، بر ساقه‌زایی گیاهچه آنغوزه در کشت درون شیشه نشان داد، هورمون BAP در مقایسه با دو هورمون دیگر از کارآمدی و اثرگذاری بیشتری بر ساقه‌زایی و رشد طولی این گیاه برخوردار بود. همان‌گونه

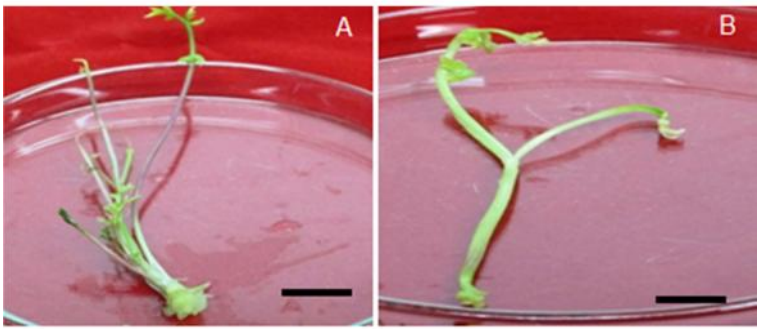
www.SID.ir

Archive of SID

که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، نتایج جدول تجزیه واریانس حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد میان غلظت‌های مختلف هورمون BAP و اثر آن بر پرآوری آنغوزه می‌باشد. بدین‌معنی که در بین غلظت‌های مورد آزمون برای صفت ساقه‌زایی، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین ۳ ساقه درگیاه، اختلاف معنی‌داری با دیگر غلظت‌های مورد بررسی نشان داد. کمترین میزان ساقه‌زایی نیز مربوط به محیط شاهد بود. با افزایش میزان هورمون BAP، میزان ساقه‌زایی نیز کاهش یافت. به‌طوری که در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم درلیتر، میانگین ساقه‌زایی، به ازای هر ریزنمونه یک بود. هم‌چنین، میزان بهینه غلظت BAP، توانایی افزایش ۶۶ درصد ساقه‌زایی را نسبت به شاهد داشت (نمودار۱). مقایسه ساقه‌زایی آنغوزه در محیط حاوی غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در (شکل۱) نشان داده شده است. اثر هورمون 2ip بر ساقه‌زایی گیاه آنغوزه نیز نشان داد، بیشترین ساقه‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر این هورمون با میانگین ۱/۱۶ ایجاد شد. هم‌چنین نتایج جدول تجزیه واریانس نیز بیانگر معنی‌دار بودن اثر غلظت 2ip در سطح احتمال یک درصد می‌باشد. هورمون کینتین نیز همچون 2iP اثر مثبتی بر ساقه‌زایی گیاهچه‌های آنغوزه در شرایط کشت درون شیشه داشت و در غلظت ۲ میلی‌گرم درلیتر این هورمون میانگین تعداد ساقه در مقایسه با سایر غلظت‌های مورد بررسی، بیشتر بود. کمترین میانگین ساقه‌زایی نیز در محیط شاهد (بدون هورمون) مشاهده شد. هم‌چنین نتایج بررسی جدول تجزیه واریانس نیز حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در خصوص بررسی اثر هورمون کینتین بر ساقه‌زایی آنغوزه می‌باشد.



نمودار۱- مقایسه میانگین ساقه‌زایی آنغوزه بر حسب غلظت هورمون‌های سیتوکینین



شکل۱- ساقه‌زایی آنغوزه (**A: BAP**۱ و **B: BAP**۰/۵)(غلظت میلی‌گرم در لیتر) (شاخص برابر یک سانتی‌متر)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس تعداد ساقه(ساقه‌زایی) گیاه آنغوزه بر حسب غلظت هورمون‌های سیتوکینین

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fآزمون
BAPتیمار	۹/۷۳۶	۵	۱/۹۴۷	**۲۰/۰۲۹
خطای آزمایش	۱/۱۶۷	۱۲	۰/۰۹۷	
کل	۱۰/۹۰۳	۱۷		
2iPتیمار	۱/۵۶۹	۵	۰/۳۱۴	**۵/۶۵۰
خطای آزمایش	۰/۶۶۷	۱۲	۰/۰۵۶	
کل	۲/۲۳۶	۱۷		
KINتیمار	۲/۶۲۵	۵	۰/۵۲۵	**۶/۳۰۰
خطای آزمایش	۱/۰۰۰	۱۲	۰/۰۸۳	
کل	۳/۶۲۵	۱۷		

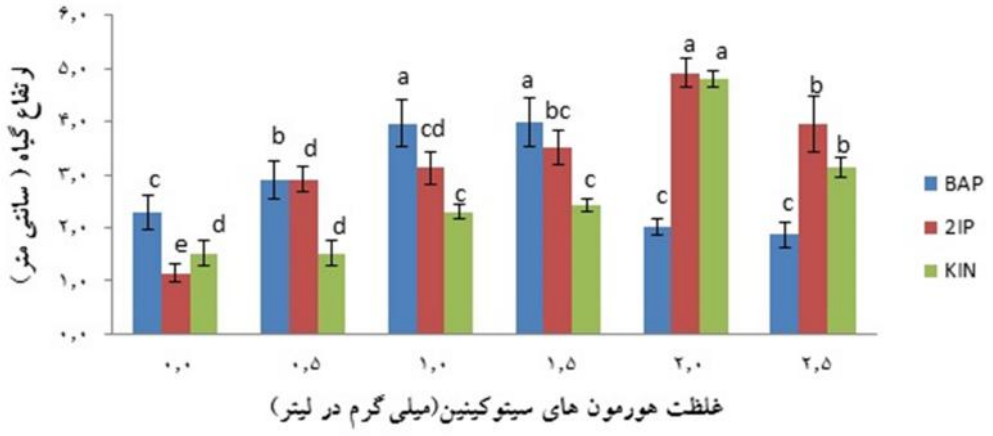
اثر هورمون‌های سیتوکینینی بر ارتفاع گیاهچه آنغوزه

مقایسه نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینینی مورد بررسی در این تحقیق بر افزایش رشد طولی (ارتفاع) گیاهچه آنغوزه نشان داد که BAP مناسب‌ترین هورمون به‌منظور پرآوری گیاهچه آنغوزه در مقایسه با دو هورمون دیگر می‌باشد. اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP، بر رشد طولی گیاهچه نشان داد بلندترین ساقه در غلظت ۱ میلی‌گرم برلیتر این هورمون ایجاد شد. مقایسه میانگین‌ها تفاوت معنی‌داری میان غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP در سطح احتمال یک درصد نشان نداد و در بین غلظت‌های مورد آزمون غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم برلیتر BAP با میانگین ۳/۹۶ و ۳/۹۸ سانتی‌متر، بیشترین میانگین طول را نشان داده و در یک گروه قرارگرفتند (جدول ۲). هم‌چنین با افزایش غلظت هورمون به‌طور معنی‌داری از ارتفاع گیاهچه کاسته شد. به‌طوری که درغلظت ۲/۵ میلی‌گرم درلیتر این هورمون، طول گیاه با حدود ۲ سانتی‌متر به‌میزان ۴۶ درصد کاهش داشت (نمودار۲).

هورمون 2iP نیز همانند BAP تاثیر مثبتی بر رشد طولی ساقه و افزایش ارتفاع گیاه نشان داد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشانگر معنی‌دار بودن اختلاف در سطح احتمال یک‌درصد بین غلظت‌های مختلف هورمون 2iP بود. بیشترین رشد طولی و افزایش ارتفاع گیاه به‌میزان ۴/۹۱ سانتی‌متر در غلظت ۲ میلی‌گرم درلیتر 2iP به‌دست آمد. هم‌چنین محیط شاهد (بدون هورمون)، نیز کمترین رشد طولی با میانگین ۱/۱۵ سانتی‌متر را نشان داد. در این پژوهش، طویل‌ترین ساقه با ارتفاع ۴/۸ سانتی‌متر در غلظت۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌دست آمد. سایر غلظت‌های این هورمون اثر مثبتی بر افزایش طول گیاهچه نداشتند. به‌گونه‌ای که حتی با افزایش غلظت هورمون به‌سطح ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر از ارتفاع گیاه نیز کاسته شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نیز نشان‌دهنده معنی‌داری اثر هورمون کینتین بر ارتفاع گیاه در سطح احتمال یک درصد بود (جدول۲). مقایسه ساقه‌زایی و ارتفاع گیاهچه آنغوزه در غلظت‌های مختلف سیتوکینینی در شکل ۲ نشان داده شده است.

www.SID.ir

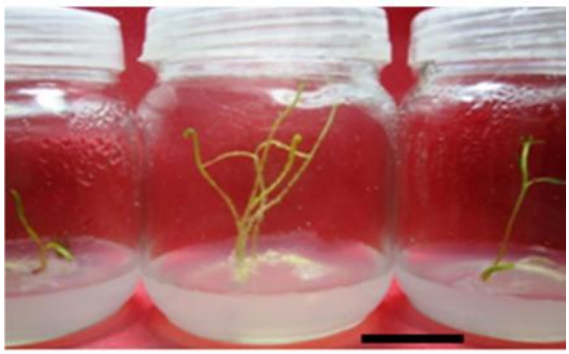
Archive of SID



نمودار۲- مقایسه میانگین طول ساقه (ارتفاع) آنغوزه بر حسب غلظت هورمون‌های سیتوکینین

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس طول ساقه (ارتفاع)گیاهچه آنغوزه بر حسب غلظت هورمون‌های سیتوکینین

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آزمونF
تیمارBAP	۱۳/۵۵	۵	۲/۷۱	۳۹/۲۵**
خطای آزمایش	۰/۸۳	۱۲	۰/۰۷	
کل	۱۴/۳۷	۱۷		
تیمار2iP	۲۳/۶۲	۵	۴/۷۲	۶۹/۴۱**
خطای آزمایش	۰/۸۲	۱۲	۰/۰۷	
کل	۲۴/۴۳	۱۷		
تیمارKIN	۲۲/۷۶	۵	۴/۵۵	۳۷۲/۴۹**
خطای آزمایش	۰/۱۵	۱۲	۰/۰۱	
کل	۲۲/۹۱	۱۷		



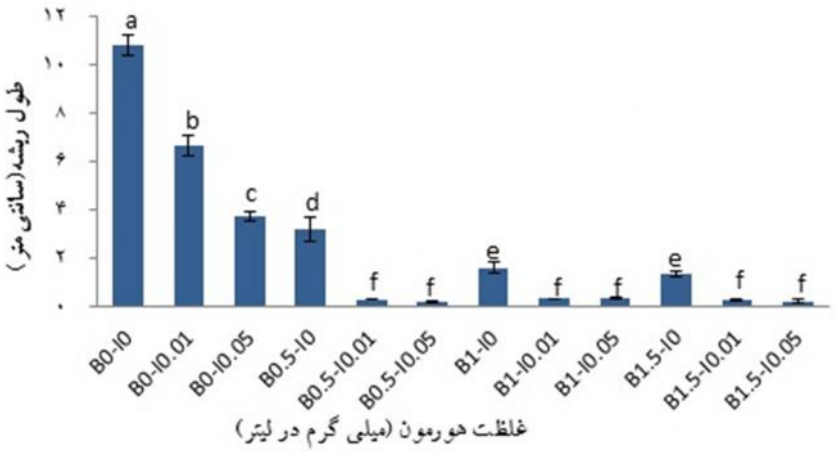
شکل۲- مقایسه ساقه‌زایی و ارتفاع گیاهچه آنغوزه به‌ترتیب از چپ (Kin۲، BAP۱، 2ip۲)
(غلظت میلی‌گرم در لیتر) (شاخص برابر یک سانتی‌متر)

www.SID.ir

Archive of SID

اثر متقابل هورمون‌های BAP /IBA بر ریشه‌زایی و پرآوری گیاهچه آنغوزه

نتایج حاصل از تیمارهای ریشه‌زایی گیاهچه آنغوزه با استفاده از اکسین‌های IBA، NAA و پیکلورام در غلظت صفر تا ۱/۲ میلی‌گرم درلیتر نشان داد، هر سه هورمون مورد بررسی در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر، منجر به القاء کالوس شدند. بنابر این به‌منظور القاء همزمان ریشه‌زایی و پرآوری گیاه آنغوزه، بهترین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین که در آزمایش‌های جداگانه انتخاب شده بود، ترکیب شدند. در این رابطه هورمون BAP با غلظت‌های (۰/۵، ۱ و۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر تحت تیمارهای ترکیبی قرار گرفتند. نتایج جدول تجزیه واریانس حاکی از معنی‌داری تاثیر متقابل هورمون‌های مورد بررسی بر ریشه‌زایی گیاه در سطح احتمال ۱ درصد بود (جدول ۳). با افزایش میزان غلظت IBA، طول ریشه کاهش یافت. در ترکیب IBA با BAP تشکیل ریشه‌های طویل متوقف و گیاه به‌سمت تولید ریشه‌های غده‌ای شکل رفت (شکل ۳). بهترین ترکیب برای ایجاد ریشه‌های غده‌ای که توانایی تولید گیاهچه‌های جدید را نیز داشته باشد، ۰/۰۱ میلی‌گرم IBA و ۱ میلی‌گرم BAP بود. ریشه‌های غده‌ای تشکیل شده در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، درشت‌تر و کمی کوتاه‌تر از غده‌های تشکیل شده در غلظت ۱/۵ این هورمون بود. این غده‌ها پس از اعمال یک دوره سرمادهی مجدد شروع به تولید گیاهچه کردند که نشان می‌دهد، سرمادهی در القاء ساقه و ایجاد گیاهچه موثر می‌باشد (شکل ۴).



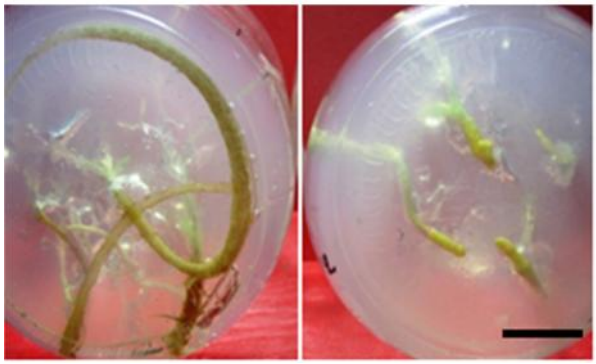
نمودار۳- تاثیرمتقابل هورمونهای (**IBA/BAP**) بر طول ریشه آنغوزه

جدول۳- تجزیه واریانس تاثیر متقابل هورمونهای (IBA/BAP) بر طول ریشه آنغوزه

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آزمون**F**
اثر**BAP**	۲۶۱/۷۷	۳	۸۷/۲۶	۱/۴۶**
اثر**IBA**	۶۳/۹۲	۲	۳۱/۹۶	۵۳۵/۳۱**
اثر متقابل**BAP*IBA**	۳۵/۹۴	۶	۵/۹۹	۱۰۰/۳۳**
خطای آزمایش	۱/۴۳	۲۴	۰/۰۶	
کل	۳۶۳/۰۶	۳۵		

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- ایجاد ریشه‌های غده‌ای شکل درمقایسه با ریشه‌های طویل. چپ: (شاهد، بدون هورمون)

راست: (IBA۰/۰۱-BAP۱، غلظت میلی‌گرم در لیتر، شاخص یک سانتی‌متر)

شکل۴- راست: گیاهچه آنغوزه در محیط BAP ۱/۵ چپ: همان گیاهچه بعد از تیمارسرمایی مجدد

(غلظت میلی‌گرم در لیتر، شاخص یک سانتی‌متر)

بحث

در پژوهش حاضر، اثر هورمون‌های سیتوکینینی (BAP Kin, 2iP) بر پرآوری (ساقه‌زایی و رشد طولی) گیاهچه‌های آنغوزه و هم‌چنین اثر متقابل مناسب‌ترین هورمون اکسین و سیتوکینین بر ریزازدیادی این گیاه در شرایط کشت درون شیشه بررسی شد. نتایج نشان داد، بین اثر غلظت‌های مختلف این هورمون‌ها، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته و هورمون BAP در مقایسه با دو هورمون دیگر از کارآمدی بیشتری برای ساقه‌زایی و رشد طولی گیاه برخوردار بود. هم‌چنین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بهترین نتایج را برای پرآوری گیاهچه آنغوزه نشان داد. مطالعات انجام شده درباره اثرات هورمون‌های سیتوکینینی بر ریزازدیادی گیاهان مختلف حاکی از تاثیر بیشتر و بهتر هورمون BAP در مقایسه با سایر هورمون‌های مورد مطالعه بوده که موید نتایج به‌دست آمده است (Nowruzian *et al.*, 2014). مطالعات انجام شده توسط Sanchooli و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که هورمون BAP با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر بهترین نتیجه برای ساقه‌زایی آنغوزه در بین غلظت‌های ۰/۵ تا ۱/۵ بوده که صحت نتایج این تحقیق را تائید می‌نماید. در مطالعه Shafiee Hajiabad و همکاران (۲۰۰۸) پرآوری ریزنمونه‌های سرخس بوستونی، بیشترین تعداد شاخساره را در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم درلیتر BAP به‌دست آوردند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. بررسی‌های Karuppusamy و همکاران (۲۰۰۶)، نیز نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۵ میلی‌گرم درلیتر BAP تعداد ساقه‌ها را در گیاه *Vanasushava pedata* (از خانواده چتریان) کاهش داد، در عین حال بر رشد طولی ساقه نیز

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر منفی داشته است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. هم‌چنین از میان غلظت‌های ۱ تا ۷ میلی‌گرم در لیتر 2ip، بهترین غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود که با ۸۱/۲ درصد بیشترین فراوانی تولید ساقه در گیاه *V.pedata* را با ۲/۱ ساقه به ازای هر ریزنمونه داشته است. همچنین Alizadeh و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی اثر نوع توده و تیمار هورمونی BAP بر باززایی زوفا، بیشترین درصد جوانه‌زنی را در غلظت ۰/۹ میلی‌گرم درلیتر BAP و کمترین درصد آن را در غلظت صفر اعلام داشتند که با نتایج این تحقیق در خصوص نوع هورمون به‌کار رفته مطابقت دارد. نتایج مشابهی توسط Ewa و Wysokinska (۲۰۰۴) در بررسی ریزازدیادی گونه‌های مختلف گیاه نوروزک (شامل *Salvia.leriifolia* و *S.nemorosa*) به‌دست آمد که داده‌های حاصل از این تحقیق را تأیید می‌کند. در تحقیق Ziaee Fard و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از غلظت ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر kin بیشترین درصد ساقه‌زایی در گیاه جاشیر را از بین غلظت‌های صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند که صحت نتایج این تحقیق را اثبات می‌نماید. بیشترین درصد ساقه‌زایی و بیشترین تعداد ساقه به ازای هر ریزنمونه نوروزک در غلظت۲ میلی‌گرم برلیتر Kin و BAP به‌تنهایی، توسط Modarres و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شد که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. این نتیجه توسط Eva و Wysokinska, (۲۰۰۴) در گونه (*Salvia nemorosa*) نیز گزارش شد. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینینی بر ریزازدیادی گل آهار ظریف توسط Mahmoodzadeh و همکاران (۲۰۱۰) نیز، مشخص شد، کینتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تاثیر مثبتی بر جوانه‌زنی و افزایش ارتفاع گیاه داشت که با نتایج این تحقیق مشابهت داشته و نشان می‌دهد با افزایش غلظت کینتین، ارتفاع گیاه نیز افزایش یافته است. هم‌چنین Ziaee Fard (۲۰۱۳) در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر kin، بلندترین طول ساقه از یقه گیاه جاشیر را از بین غلظت‌های صفر تا دو میلی‌گرم درلیتر به‌دست آورد. در بررسی‌های Karuppusamy و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از هورمون‌های BAP، 2iP و Kin موفق به ساقه‌زایی در گیاه *V.pedata* شده و BAP را از کینتین و 2iP مؤثرتر دانست. هم‌چنین فراوانی تولید شاخه در هورمون BAP نسبت به ۲ هورمون دیگر بیشتر بود، که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت دارد. مطالعات Ameri و همکاران (۲۰۱۱) با مقایسه اثر هورمون‌های BAP و KIN بر باززایی مستقیم هندوانه نشان داد که BAP اثر بهتری در افزایش ساقه‌زایی داشته و افزایش غلظت این هورمون تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین ساقه‌زایی را موجب شده است که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. بررسی انجام شده توسط Paek و Hahn، (۲۰۰۰) توانست اثر هورمون‌های سیتوکینین، اکسین و زغال فعال بر ویژگی‌های آناتومیکی و اندام‌زایی گیاه لیسیانتوس [*Eustoma grandiflorum* (RAF) Shinn] با استفاده از هورمون BAP در مقایسه با Kin تعداد ساقه بیشتری به‌دست آورد. مشابه این نتایج را Leshem (۱۹۸۸) نیز در بررسی اثر سیتوکینین برشیشه‌ای شدن خربزه گزارش کرد. در تحقیق Karuppusamy و همکاران (۲۰۰۶)، کینتین و 2ip تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تعداد ساقه در گیاه *V.pedata* شد، اما غلظت بیش از ۴ میلی‌گرم در لیتر کاهش تعداد ساقه و هم‌چنین کاهش ارتفاع گیاه را در پی داشت. این نتایج توسط Nath و Buragohain (۲۰۰۳) بر روی گیاه *Centella asiatica* نیز مورد تائید قرار گرفته است. در تحقیق حاضر مشخص شد، ریشه‌های غده‌ای توانایی تولید گیاهچه جدید را داشته و این غده‌ها، پس از اعمال یک دوره سرمادهی مجدد، می‌توانند گیاهچه ایجاد نمایند. لذا در این تحقیق صفت غده‌زایی ملاک انتخاب تیمار برتر قرار گرفت. در بررسی Askari-Khorasgani و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی باززایی مستقیم گیاه کلوسیا *Kelussia odoratissima*، از بین غلظت‌های ۰/۲ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و غلظت‌های ۰/۵ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA، ترکیب ۰/۲ BAP و یک میلی‌گرم در لیتر IBA را به‌عنوان بهترین و موثرترین ترکیب برای ریشه‌زایی این گیاه اعلام داشتند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. این ترکیب هورمونی هم‌چنین باعث افزایش رشد طولی

www.SID.ir

Archive of SID

ریشه نیز شد. در بررسی ریشه‌زایی گیاه زیره پارسی توسط Valizadeh و همکاران (۲۰۰۸)، نشان داده شد که از بین هورمون‌های NAA، 2,4-D و Kin، ترکیب ۲ میلی‌گرم درلیتر NAA و ۲ میلی‌گرم درلیتر Kin، بیشترین تعداد ریشه را ایجاد کرد که با نتایج این تحقیق مطابقت ندارد. زیرا آنغوزه به‌طور معمول دارای ریشه مستقیمی است که تیمار بدون هورمون، باعث افزایش طول ریشه آن می‌شود. هم‌چنین اثرات مثبت IBA به‌منظور ریشه‌زایی برخی گیاهان خانواده چتریان نظیر *V.pedata* توسط Karuppusamy و همکاران (۲۰۰۶)، *Anethum graveolens* توسط Sharma و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده که با نتایج این تحقیق نیز مشابهت دارد. همچنین Bari و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی اثرات متقابل هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به‌منظور القاء ریشه در گیاه *Olea europea* L، دریافتند، ترکیب ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام IBA به‌علاوه ۱۵۰ پی‌پی‌ام BAP به‌طور معنی‌داری تولید ریشه را افزایش داد. هم‌چنین تعداد ریشه‌ها نیز در این ترکیب هورمونی بیشتر از سایر نسبت‌های هورمونی بود. در عین حال این ترکیب، بیشتر از کاربرد تنهای IBA به‌منظور ریشه‌زایی، عمل کرده که مؤید نتایج حاصل از این تحقیق می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- Alizadeh, M. and Hoseini, B., 2013. The effect of BAP on regeneration of *Hyssopus officinalis* L. *in vitro* Journal of Horticultural Science .27: 201-207.
- Ameri, M., Lahooti, M., Bagheri, A.R. and Sharifi, A. 2011. Comparing the effect of hormones (NAA , Kin, BA and IBA) on direct regeneration of *Citrullus lanatus* L. (cv. Crismon sweet) *In vitro*. 2th National Conference on Science and Technology Seed, Islamic Azad University of Mshhad.4-5 Aban.
- Askari-Khorasgani, O. Mortazaeinezhad, F., Otroshy, M., Golparvar, A.R. and Moeini, A., 2013. Direct regeneration of an endangered medicinal plant *Kelussia odoratissima*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5 (17):1969-1974.
- Bari, H., Ramaj, P., lazaj, A. and Kukali, E., 2013. interaction of benzylaminopurine (BAP) and indol butiric acid (IBA) on root induction in *olea europea* L. IV International Symposium Agrosym 2013.796-799.
- Eva, S. and Wysokinska, H., 2004. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 40:596-602.
- Haaj Najari, H.,1994. Micropropagation. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran.176 pp.
- Hassani, B., Saboora, A., Radjabian, T. and Fallah Husseini, H., 2008. Somatic embryogenesis of *Ferula assa-foetida*. JUST, 33(4): 15-23.
- Jafari Mofidabadi, A., Tabaei Aghdaei, R., 2001. Plant Biotechnology (Methods and Applications). Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran.
- Karuppusamy, S., Kiranmai, C., Aruna V. and Pullaiah, T., 2006. Micropropagation of *Vanasushava pedata* – an endangered medicinal plant of South India. *Plant Tissue Cult. & Biotech*. 16: 85-94.
- Leshem, B., Shalev, D.P., Izhar, S., 1988. The effect of cytokinins on vitrification in melon. Annals of Botany, 61:255–260.
- Mahmoodzadeh, H., Abbasi, F. and Rohani, Sh., 2010 The effect of different concentrations of cytokinins on micropropagation of *Zinnia elegans Thumbelina*. Journal of Biological Sciences, Islamic Azad University of Zanjan, 2: 61-65.
- Modarres, M., Lahouti, M., Gangeali, A. and Asili, J., 2012. Study of micropropagation of *Salvia leriifolia* Benth using shoot tip. Journal of Plant Biology, 4(14):30-38
- Nath, S. and Buragohain, A. K., 2003. *In vitro* method for propagation of *Centella asiatica* (L.) Urban by shoot tip culture. J. Plant Biochem & Biotech.,12: 167-169.
- Nowruzian, A., Masoumian, M., Ebrahimi, M.A. and Bakhshi Khaniki, G.R., 2014. Optimization of Cytokinin Concentration on *Ferula assa-foetida* height. First International & 13th Iranian Crop & Plant Breeding Sciences Congress and 3rd Seed Science and Technology Conference. Karaj, August 26-28.
- Omidbeigi, R. and Pirmoradei, M., 2006. A study of the effect of root diameter and incision times on the gum yield of medicinal- rangeland asafoetida (*Ferula assa-foetida* L.) plant Iranian Journal of Natural Resources, 59: 261–269.
- Otroshy, M., Edrisi, S. and Enteshary, S., 2013. Propagation of medicinal plant *Ferula assa foetida* L. through indirect somatic embryogenesis. International Journal of Medicinal Plant Research, 2: 179-186.

www.SID.ir

Archive of SID

- Sharma, R.K., Wakhlu, A.K. and Boleria, M., 2004. Micropropagation of *Anethum graveolens* L through axillary shoot proliferation. Journal of plant Biochemistry and Biotechnology,13:157-159.
- Valizadeh, M., Safarnejad, A., Nematzadeh, Gh., Kazemi Tabaar, K. and Hamidi, H., 2008. Regeneration of plantlets from fragmented embryo explant of parsi zira (*Bunium persicum Boiss.*). Seed and Plant Journal, 24:389-398.
- Zare, A.R., Solouki, M., Omidi, M., Irvani, N., Mahdinezad, N. and Rezazadeh, Sh., 2010. Callus induction and plant regeneration in *Ferula assa foetida* L. (asafetida), an endangered medicinal plant. Trakia Journal of Sciences, 8: 11-18.
- Ziaee Fard, Z., Mianabadi, M. and Aghdasi, M., 2013. The role of hormone treatment on complete regeneration of Jashir (*Prangos ferulacea* Lindl), *in vitro* J. of Plant Production, 20:15-22.
- Paek, K.Y. and Hahn, E. J., 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflora* L.) 587 Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (RAF.) Shinn]. *in vitro* Cellular and Development Biology - Plant, 36:128-132.
- Sanchooli, M. and Khaleghi, D., 2012. The effect of different doses of auxin and cytokinin in plant organogenesis of *Ferula assa-foetida* in tissue culture. National conference on natural products and medicinal plants. Bojnourd, North Khorasan University of Medical Sciences
- Shafie Haji Abad, M., Hamid Oghli, Y. and Fatahi Moghadam, J., 2008. The effects of different nutrient media on shoot proliferation of Boston Fern (*Nephrolepis Exaltata Schott* Cv. 'Bostoniensis'). Journal of Horticultural Science and Technology. 9:139-144.

www.SID.ir

Archive of SID

Micropropagation of *Ferula assa-foetida* L.

A. Nowruzian[1], M. Masoumian[*2], M.A. Ebrahimi[3], and G.R. Bakhshi Khaniki[4]

1- M.Sc., Medicinal Plant Department, Agricultural Institute, (IROST), I.R. Iran
2*- Corresponding author, Assist. Prof., Medicinal Plant Department, Agricultural Institute, (IROST), I.R. Iran, Email: masoumian200@yahoo.com.
3- Assoc. Prof., Biotechnology Department of Payame Noor University of Tehran, I.R. Iran
4- Prof., Biotechnology Department of Payame Noor University of Tehran, I.R. Iran

Received: 14.12.2014 Accepted: 20.12.2015

Abstract

The present study optimized micropropagation protocol for *Ferula assa- foetida* L. The effect of cytokinins (BAP, 2ip and Kinetin), auxins (IBA, NAA and Picloram) and hormones combination was assayed in different concentrations (0 - 2.5 mg/l) on MS medium. Results showed that BAP, promoted the highest shoot elongation and shoot numbers. Concentration of 1 mg/l BAP enhanced three shoots per explants and compared to control and 66 percent shooting was increased. Effect of 1.5 mg/l BAP produced the highest shoot. MS media containing 1mg/l BAP and the 0.01 mg/l of IBA was the best treatment to micropropagate ferula and tuber production. Hormone combination enhanced 3.96 cm plant height, compared with control (2.28 cm) at the rate of 57.6 percent increase. Number of lateral shoots with an average of 3 per explants grew three fold higher than control. The study proved that root like tuber in compared to long roots had higher ability to shoot production. Endogenous auxin in ferula is the most important reason for the existence of root elongation *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: Auxin, cytokinin, *Ferula assa- foetida* L., micropropagation, rooting, tissue culture.

www.SID.ir