University of Tehran Press

Iranian Journal of Field Crop Science

Online ISSN: 2423-8082

Homepage:https://ijfcs.ut.ac.ir/

Effect of Explants and Concentrations of Plant Growth Regulators on Callus Induction in Ecotypes of *Ferula assa-foetida* (L.)

Mahta Bahramali[1]| Mansoor Omidi[2]✉| Ali Akbar Shah Nejat Boushahri[3]| Mohammad Javan Nikkhah[4]

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Corresponding Author, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: momidi@ut.ac.ir
3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. ashah@ut.ac.ir
4. Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. jnikkhah@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: September 11, 2022
Received in revised form: October 20, 2022
Accepted: October 24, 2022
Published online: August 10, 2023

Keywords:
Callus,
ecotype,
Ferula,
germination,
volume.

ABSTRACT

Some medical herbs are of universal importance and are becoming extinct due to their countless uses. Today, the use of in vitro culture has increased the speed of production and reproduction of endangered species. The main of this research to determine the best ecotype, the best explant for callus induction, as well as the best level of hormones on traits including length, width, height and the callus volume of the explants obtained from *Ferula assa-foetida* seedlings that have been grown in in vitro culture. This experiment has been implemented as factorial in completely randomized design with at least 4 replications. According to the purpose, the explants were placed in MS media supplemented with different levels of BAP and NAA. After 40 days, the traits including the length, width and volume of the callus were measured for induced callus. The comparison of the averages showed that the maximum size of target traits have been achieved for root explants cultured medium supplemented with 2 $mg.L^{-1}$ BAP and 1 $mg.L^{-1}$ NAA, while none of calluses derived from leaf and stem explants survived. Among the ecotypes, the Kerman demonstrated higher callus growth rate than the Yazd, though this trait intensively increased through the time of culture. In addition, the calluses derived from Isfahan showed low growth rate, so it was removed from the present study.

Cite this article: Bahramali, M., Omidi, M., Shah Nejat Boshehri, A.A., & Nikkhah, M.J. (2023). Effect of explants and concentrations of plant growth regulators on callus induction in ecotypes of *Ferula assa-foetida* L. *Iranian Journal of Field Crop Science*, *54*(2), 155-164. DOI: 10.22059/ijfcs.2022.348337.654939.

© The Authors.
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/ 10.22059/ijfcs.2022.348337.654939

انتشارات دانشگاه تهران

علوم گیاهان زراعی ایران

شاپا الکترونیکی: ۸۰۸۲-۲۴۲۳

Homepage:https://ijfcs.ut.ac.ir/

بررسی اثر ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی در اکوتیپ‌های گیاه آنغوزه (*Ferula assa-foetida* L.)

مهتا بهرامعلی[۱]، منصور امیدی[۲]✉، علی‌اکبر شاه نجات بوشهری[۳]، محمد جوان نیکخواه[۴]

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. نویسنده مسئول، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: momidi@ut.ac.ir

۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ashah@ut.ac.ir

۴. گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج ، ایران. jnikkhah@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۵/۱۹

کلیدواژه‌ها:
اکوتیپ،
آنغوزه،
جوانه‌زنی،
حجم،
کالوس.

چکیده

برخی از گیاهان دارویی دارای اهمیتی جهانی و فراگیر بوده و به علت استفاده بی‌شمار در حال انقراض هستند. امروزه استفاده از کشت درون شیشه‌ای سبب شده است که سرعت تولید و تکثیر گونه‌های در حال انقراض افزایش یابد. اهداف این پژوهش، تعیین بهترین اکوتیپ، بهترین ریزنمونه کالوس‌زایی و همچنین بهترین سطح هورمونی موثر بر صفت‌های طول، عرض، ارتفاع و حجم کالوس ریزنمونه‌های به دست آمده از گیاهچه‌های حاصل از آنغوزه تلخ در کشت درون شیشه می‌باشد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با حداقل ۴ تکرار بررسی شده است. با توجه به هدف مورد نظر، ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت موراشیک و اسکوگ با سطوح مختلف BAP و NAA قرار گرفتند. پس از ۴۰ روز کشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی هورمون صفات طول، عرض و حجم کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد، ریزنمونه‌های ریشه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین صفات مورد اندازه‌گیری را داشت و کالوس‌های مربوط به ریزنمونه‌های برگ و ساقه از بین رفتند. در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی، اکوتیپ کرمان نسبت به اکوتیپ یزد دارای سرعت رشد کالوس بیشتری بودند و با گذشت زمان میزان سرعت رشد کالوس‌ها به شدت افزایش یافت. با توجه به اینکه سرعت رشد کالوس اکوتیپ اصفهان کم بود، از پژوهش حاضر حذف گردید.

استناد: بهرامعلی، م.، امیدی، م.، شاه نجات بوشهری، ع.ا.، نیکخواه، م.ج. (۱۴۰۲). بررسی اثر ریزنمونه و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس زایی در اکوتیپ‌های گیاه آنغوزه. *علوم گیاهان زراعی ایران*، ۵۴(۲)، ۱۵۵-۱۶۴.

DOI: 10.22059/ijfcs.2022.348337.654939

ناشر: موسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان

۱. مقدمه

گیاهان دارویی دارای اهمیتی جهانی و فراگیر بوده و در شمار میراث‌های بومی کشورها هستند. این گیاهان در طول تاریخ جزء منابع اصلی پزشکی و داروسازی در اکثر نقاط جهان مانند ایران، چین، یونان، هندوستان و مصر بوده‌اند (Ghasemi, 2009). امروزه تاکید فراوانی بر استفاده از داروهایی با منشاء طبیعی در درمان و حفظ سلامتی وجود دارد. تقریبا یک‌چهارم داروهای تولیدشده، حاوی عصاره‌های گیاهی یا ترکیباتی هستند که از مواد گیاهی به‌دست‌آمده و یا اینکه براساس ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Shirazi *et al*., 2014). به علت بهره‌برداری‌های بی‌رویه و نامناسب از گیاه دارویی آنغوزه به روش سنتی نسل آن در معرض خطر انقراض قرارگرفته و تراکم آن در مراتع به‌شدت کاهش یافته است. در نتیجه برخی از گونه‌های این گیاه به‌عنوان گونه‌ی آسیب‌پذیر در کتاب گیاهان در حال انقراض ایران ثبت شده‌اند (Zare *et al*., 2010). از سوی دیگر، تنها روش تکثیر این گیاه از طریق بذر است، ولی به دلیل وجود خواب بذور و قوه نامیه کم، تکثیر و احیای این گیاه از طریق زراعت کاری سخت و مشکل است (Gupta, 2003). یکی دیگر از ابزارهای کلیدی برای برنامه‌های حفاظتی گیاهان در حال انقراض، جوانه‌زنی بذور آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی است. وجود خواب در بذور این گیاهان سبب کاهش موفقیت‌آمیز کشت زراعی آن‌ها شده است. یک دوره سرما سبب حذف خواب اولیه بسیاری از گونه‌های گیاهی نیمکره شمالی می‌شود (Zare *et al*., 2011; Tieu *et al*., 2001). جوانه‌زنی به وضعیت فیزیولوژیکی بذر (خواب) و تا حدودی تعادل بین هومورن‌های داخلی جیبرلین و آبسیزیک‌اسید بستگی دارد. آنزیم‌های GA3ox1، GA3ox2، GA2ox2 به دلیل نقش کلیدی خود در سیگنال‌دهی جیبرلین نقش مهمی در طول جوانه‌زنی دارند. ژن‌های بسیار زیادی در جوانه‌زنی و شکست خواب تاثیرگذار هستند، از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن *OsABI5*، در پاسخ‌گویی اسید آبسیزیک و ژن‌های *GAI* و *GAMYB* در پاسخگویی به اسیدجیبرلیک اشاره کرد که در بذر فعال هستند که نشان‌دهنده یک مسیر بالقوه درگیر در فرآیند جوانه‌زنی اولیه بذر است (Li *et al*., 2022).

در حال حاضر، فناوری‌های کشت بافت گیاهی به عنوان یک ابزار قوی جهت مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی زیست شناسی گیاهی است. مهم‌ترین موارد استفاده از کشت بافت و سلول‌های گیاهی شامل تکثیر انبوه و سریع گیاهان، اصلاح ارقام، تولید گیاهان عاری از بیماری و تهیه اکوتیپ‌های مقاوم به تنش‌های محیطی می‌باشد. در سال‌های اخیر تکنیک کشت بافت به عنوان ابزاری مناسب برای حفظ ژرم‌پلاسم گیاهان دارویی کمیاب و در معرض خطر، به شمار می‌رود (He *et al*., 2007; Martin *et al*., 2003). ایجاد کالوس و بهینه‌سازی آن و باززایی گیاه در این ارتباط حائز اهمیت می‌باشد. از جمله عواملی که در تولید کالوس موثرند، اکوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع کربوهیدرات، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط محیطی می‌باشد. نتایج نشان داده است که وابستگی خاص القاء کالوس و باززایی گیاه به اکوتیپ اجتناب‌ناپذیر و کلی است و القاء کالوس و باززایی گیاه با اکوتیپ گیاه تغییر می‌کند. رشد کالوس در یک گونه گیاهی بر اساس نوع جداکشت آن گیاه متفاوت بوده و علت آن به درستی مشخص نشده است(Han *et al*., 2011) . بنابراین، به نظر می‌رسد که پاسخ‌های مشاهده‌شده در کشت بافت به طور مستقیم با خصوصیات کلی گیاه با اندام‌های گیاهی، برای مثال خصوصیات مورفولوژیک در شرایط طبیعی، ارتباط داشته باشد؛ در حالی‌که تعیین خصوصیاتی از گیاه کامل که در سایر ویژگی‌های کشت‌های درون‌شیشه‌ای، برای مثال سرعت رشد کالوس تاثیر می‌گذارند، مشکل‌تر است. به احتمال زیاد خصوصیاتی که از لحاظ ژنتیکی تعیین می‌شوند، حاصل اثر ثانویه فعالیت یک ژن هستند. این یک نوع اثر چندگرایی است که در آن اثر اصلی یک یا چند ژن سبب بروز سایر صفات و ویژگی‌های نامرتبط می‌شود.

گیاه آنغوزه تلخ (*Ferula* spp.) سومین جنس بزرگ خانواده *Apiaceae* با ۱۸۰–۱۸۵ گونه است که از نظر جغرافیایی از آسیای مرکزی به سمت غرب در سراسر منطقه مدیترانه تا شمال آفریقا پراکنده شده است. کشور ایران خاستگاه اصلی و یکی از مراکز مهم جنس *Ferula* است که بیش از ۳۰ گونه *Ferula* در آن وجود دارد که حدود نیمی از آن‌ها بومی هستند که از بین آن‌ها می‌توان به *F. assafoetida*، *F. gummosa*، *F. persica*، *F. tabasensis* و *F. latisecta* اشاره کرد (Salehi *et al*., 2019; Yaqoob & Nawchoo, 2016). برخی از گیاهان جنس *Ferula* قرن‌ها به عنوان گیاهان دارویی در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ahmed *et al*., 2007). متابولیت‌های جنس *Ferula* دارای فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله ویژگی‌های ضد ویروسی،

ضد التهابی، ضد توموری، ضد سرطانی، ضد زخم، ضد دیابت، ضد باکتری، ضد قارچی، سیتوتوکسیک، استروژنیک، کنه‌کشی، ضد پروتوزوئال و ضد گلیکاسیون هستند (Zhou *et al*., 2017; Soltani *et al*., 2018).

براساس نتایج حاصل از تحقیق Kumar *et al.* (2020) دامنه جوانه‌زنی بذور اکوتیپ‌های آنغوزه تلخ بین ۱۶/۶۹تا ۴۲/۷۱ روز (میانگین ۳۰/۱۴ روز) متغیر است. بیشترین میانگین زمان جوانه‌زنی (۶۶/۹ درصد) در اکوتیپ EC966538 و کمترین میانگین زمان جوانه‌زنی (۲۰/۸۵ درصد) در اکوتیپ EC968469 و دمای پنج درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است. همچنین Rajabiyan *et al*. (2007) نیز گزارش کردند که کاربرد تیمار سرمادهی برای بذور گیاه آنغوزه تلخ در هر دو جمعیت شیرکوه و طبس سبب افزایش درصد جوانه‌زنی در آن‌ها شد؛ به‌طوری‌که حداکثر درصد جوانه‌زنی در جمعیت شیرکوه و طبس به‌ترتیب ۸۴ و ۵۶ درصد بود که نشان‌دهنده تاثیر متفاوت سرما روی انواع اکوتیپ‌ها است. براساس مطالعات متعددی که پژوهشگران روی انواع گونه‌های *Erythronium* و *Osniorhiza* انجام داده‌اند، مشخص شده است که این گیاهان دارای درجات متفاوتی از خواب فیزیولوژیکی می‌باشند که با اعمال دوره‌های سرمادهی مناسب شکسته می‌شود. طبق نظریه‌ای که مورد قبول بسیاری از متخصصین مسائل بذر است، سرما باعث افزایش بیان ژن‌های مربوط به محتوای جیبرلیک‌اسید (GA3) یا سبب کاهش محتوای آبسیزیک‌اسید و یا هر دو تغییر به‌طور همزمان شده و با ایجاد تعادل هورمونی موجب پایان خواب بذر می‌شود (Yamauchi *et al*., 2004). نتایج حاصل از تحقیقات Zare *et al*. (2010) در گیاه آنغوزه نشان داد که بهترین ریزنمونه برای کالوس‌زایی ریزنمونه ریشه بوده و بهترین سطح هورمونی نیز مربوط به سطح یک میلی‌گرم NAA و دو میلی‌گرم BAP بود. بر اساس پژوهشی که Janghorbaniyan *et al*. (2014) روی گیاه آنغوزه تلخ داشتند، مشخص شد که ریشه توانایی بیشتری برای القاء کالوس داشته و کالوس حاصل از این ریزنمونه وزن و میانگین قطر بیشتری نسبت به ریزنمونه‌های دیگر داشت. همچنین آن‌ها بیان کردند که کالوس حاصل از ریشه‌چه و هیپوکوتیل پتانسیل جنین‌زایی دارند. با بررسی Hasani *et al*. (2007) روی گیاه آنغوزه تلخ، بیشترین درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و با استفاده از چهار میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم هورمون NAA مشاهده شد. این تحقیق با هدف تعیین میزان تاثیر سرما بر اکوتیپ‌های مختلف و مقایسه اثرات بهترین هورمون‌ها بر ریزنمونه‌ها و در عین حال اثر متقابل بین هورمون‌ها و اکوتیپ‌ها به منظور کالوس‌زایی این گیاه در شرایط کشت درون شیشه انجام شده است.

۲. روش‌شناسی پژوهش

بذور گیاه آنغوزه تلخ در تیرماه ۱۴۰۰ از جمعیت‌های طبیعی استان‌های اصفهان، یزد و کرمان که توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج جمع‌آوری شدند، تهیه شد. در ابتدا بذور سالم و بدون شکستگی انتخاب و در ارلن ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت زیر آب جاری قرار گرفت. سپس مراحل بعدی سترون‌سازی انجام گرفت. آب جاری به عنوان یک پیش‌تیمار برای تمامی تیمارها اعمال شد. پس از سترون‌سازی بذرها زیر هود لامینار، آن‌ها به داخل شیشه‌های مربای حاوی محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ (بدون هورمون) منتقل شدند و به مدت ۴۰ روز داخل یخچال چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ۴۰ روز بعد از کشت بذور درصد جوانه‌زنی آن‌ها محاسبه شد (Otroshy *et al*., 2009). پس از جوانه‌زنی بذور، از بخش‌های مختلف گیاهچه‌های درون شیشه‌ای شامل ریشه، ساقه و برگ به‌عنوان ریزنمونه‌های گیاهی جهت القاء کالوس در محیط‌های هورمونی مختلف استفاده شد. نمونه‌ها به قطعات یک سانتی‌متری برش داده شدند و در هر شیشه پنج قطعه نمونه قرار داده شد.

به‌منظور القاء کالوس هورمون‌های NAA و BAP با غلظت‌های مختلف طبق جدول ۱ به محیط اضافه و کشت‌های انجام‌شده تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگه‌داری شدند. هر ۱۵ روز یک‌بار ریزنمونه‌ها به محیط‌های جدید منتقل و با استفاده از کاغذ میلیمتری یادداشت‌برداری انجام شد. در این مرحله طول، عرض، ارتفاع و حجم کالوس‌ها محاسبه شد.

جدول ۱. غلظت هورمون‌های استفاده‌شده جهت القاء کالوس‌زایی (برحسب میلی‌گرم در لیتر).

Hormone	T1	T2	T3	T4	T5
NAA	2	1	1	1	1
BAP	1	1	2	3	4

این آزمایش در دو مرحله مختلف انجام شد. هر دو مرحله بر پایه آزمایش فاکتوریل در دو فاکتور و در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و چهار ریز نمونه در هر تکرار انجام شد. فاکتورهای مرحله اول شامل فاکتور مربوط به ریزنمونه گیاهی در سه سطح (ریشه، برگ و ساقه) و فاکتور دوم نوع محیط کالوس‌زایی در ۵ سطح بود (جدول ۱). فاکتورهای مرحله دوم شامل فاکتور اکوتیپ‌ها (یزد، کرمان و اصفهان) و فاکتور دوم که مربوط به زمان‌های مختلف یادداشت‌برداری در چهار سطح (هفته دوم، چهارم، ششم و هشتم) بود. در این مرحله نیز برای اندازه‌گیری صفات از کاغذ میلی‌متری استفاده شد. در پایان آزمایش، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 مورد آنالیز قرار گرفته و میانگین‌ها نیز مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

۳. یافته‌های پژوهش و بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان جوانه‌زنی سه اکوتیپ اصفهان، کرمان و یزد بسیار متفاوت بود. در ماه اول، هیچ جوانه‌زنی در بذور اکوتیپ‌ها مشاهده نشد؛ اما به‌تدریج در اواخر مـاه اول تیمار سرما سبب شکستن خواب اکثر اکوتیپ‌های یزد و کرمان شد، ولی هیچ جوانه‌زنی در اکوتیپ اصفهان در ماه اول مشاهده نشد. در ماه دوم، جوانه‌زنی بذور در اکوتیپ‌های کرمان، یزد و اصفهان به‌ترتیب ۸۵، ۷۳ و ۴۵ درصد بود. در بین اکوتیپ‌های مـورد استفاده، بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به اکوتیپ کرمان و کمترین آن مربوط به اکوتیپ اصفهان بود. باتوجه‌به اینکه رشد و شکستن خواب اکوتیپ اصفهان به‌کندی صورت گرفت از ادامه کار حذف شد. از مهمترین عوامل اصلی جوانه‌زنی هر گیاهی نداشتن خواب بذر است که وابسته به نوع خواب از روش‌های مختلف جهت شکستن خواب آن استفاده می‌کنند. علاوه‌بر تعادل هورمونی بین جیبرلین و آبسیزیک‌اسید، ژن‌های پروتئین کیناز (*CIPK*) مانند *CIPK13*، *CIPK14* و *CIPK17* با تعامل *CBL*، به‌طور بالقوه با پروتئین‌های دیگر برهمکنش داشتند که نشان‌دهنده نقش محوری آن‌ها در جوانه‌زنی اولیه بذر است (Li *et al*., 2022). براساس مطالعات انجام شده توسط سایر محققان بهترین روش شکستن خواب بذر گیاه آنغوزه سرمادهی است (Zare *et al*., 2011). باتوجه‌به ماهیت ژنتیکی و فیزیولوژیکی متفاوت بذور، درصد جوانه‌زنی اکوتیپ‌ها متفاوت بود. نتایج حاصل از Kumar *et al*. (2020) نیز نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذور آنغوزه در اکوتیپ‌های مختلف متفاوت بود؛ به‌طوری‌که بیشترین درصد جوانه‌زنی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و بذور مربوط به اکوتیپ EC966538 و کمترین درصد جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بذور مربوط به اکوتیپ EC968469 بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. همچنین Radjabian *et al*. (2007) نشان دادند که تیمـار سـرمادهی چهار درجه سانتی‌گراد بـرای بـذرهای هـر دو جمعیت مورد مطالعه سبب افزایش درصد جوانه‌زنی آن‌ها شد. پس از ۱۲ هفته حداکثر میزان درصـد جوانـه‌زنـی در جمعیت‌هـای شـیرکوه و طبس به‌ترتیب ۸۴ و ۵۶ درصد بود. آن‌ها بیان کردند که افـزایش غلظـت GA3 درون‌زا در نتیجه تیمار سرمادهی عامل مؤثر بر افزایش درصد جوانه‌زنی بذرها می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس حجم، طول، عرض و ارتفاع کالوس‌زایی برای انواع مختلف ریزنمونه و غلظت‌های هورمونی در جدول ۲ آمده است. اثرات اصلی هورمون‌ها و ریزنمونه بر صفات اندازه‌گیری‌شده شامل ارتفاع، عرض و حجم کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود؛ درحالی‌که در اثر متقابل بین ریزنمونه و سطوح هورمونی برای صفات طول، عرض و ارتفاع تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. تشکیل کالوس در محیط کشت، ابتدا در لبه‌های برش‌یافته که تماس مستقیمی با محیط کشت داشتند، انجام شده و به‌تدریج طی روزهای بعد سرتاسر نمونه را فراگرفت. چهار هفته پس از کشت، در تمام تیمارهای هورمونی روی ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ کالوس مشاهده شد. کالوس‌های مشاهده‌شده در اندام ریشه در تمامی تیمارهای هورمونی نرم، آبکی و سفید تا شیری‌رنگ بودند؛ ولی کالوس‌های ایجادشده از اندام ساقه ترد و شکننده بودند که پس از چندین هفته نکروزه شده و از بین رفتند. کالوس‌های ایجادشده در ریزنمونه برگ نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بسیار کوچک‌تر بودند به‌طوری‌که بعد از مدت کوتاهی نکروزه شده و از بین رفتند. حجم کالوس در ریزنمونه ریشه در تمام تیمارهای هورمونی بیشتر از ریزنمونه ساقه و برگ بود. به نظر می‌رسد عاملی که سبب حذف کالوس‌های برگ و ساقه شد، غیر فعال‌بودن ژن‌های مربوط به کالوس‌زایی باشد. الگوی بیان ژن‌ها تحت

تاثیر هورمون‌های درونی و ریزنمونه‌ها بسیار متفاوت است؛ به‌طوری‌که می‌توان اشاره کرد منبع تجمع اکسین در گیاهان در ریشه‌ها است؛ به همین دلیل القاء کالوس‌زایی در ریشه‌ها نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بیشتر بود.

جدول ۲. میانگین مربعات تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر طول، عرض، ارتفاع، و حجم کالوس‌های گیاه آنغوزه تلخ در شرایط درون‌شیشه‌ای.

Source of Variation	df	MS			
		Callus volume	Callus width	Callus height	Callus length
Explant (E)	2	0.43**	0.25**	0.2**	0.047**
Hormone (H)	4	0.11^{ns}	0.075***	0.03**	0.048**
E×H	8	0.02^{ns}	0.011^{ns}	0.02^{ns}	0.017**
Error	45	0.04	0.008	0.01	0.002
C.V.	-	16	27	27.21	37.69

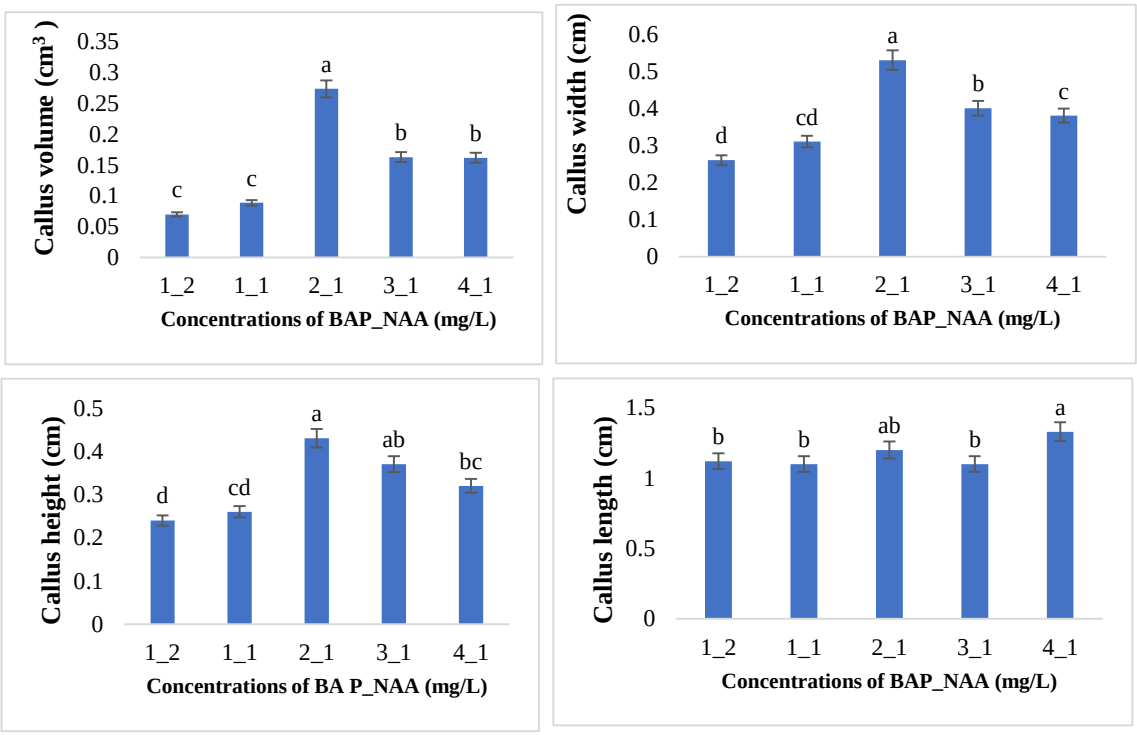
^{ns}، *و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

تحقیقات متعددی، گویای تاثیرگذاری عوامل خارجی و داخلی بر نتایج حاصل از کشت بافت است که از جمله این عوامل می‌توان به نوع ریزنمونه، ترکیبات محیط کشت و شرایط فیزیکی محیط اشاره کرد(Lal *et al*., 2016). بیشترین ارتفاع کالوس (۰/۴۳ سانتی‌متر) و کمترین ارتفاع آن (۰/۲۴ سانتی‌متر) به‌ترتیب در محیط دو میلی‌گرم BAP و یک میلی‌گرم NAA و محیط یک میلی‌گرم BAP و دو میلی‌گرم NAA بود. از نظر طول کالوس بیشترین مقدار مربوط به محیط چهار میلی‌گرم BAP و یک میلی‌گرم NAA (۱/۳۳ سانتی‌متر) و کمترین مقدار آن (۱/۱۰ سانتی‌متر) مربوط به محیط یک میلی‌گرم BAP و یک میلی‌گرم NAA بود. همچنین بیشترین مقدار عرض کالوس (۰/۵۳ سانتی‌متر) مربوط به محیط دو میلی‌گرم BAP و یک میلی‌گرم NAA و کمترین مقدار آن (۰/۲۶ سانتی‌متر) مربوط به یک میلی‌گرم BAP و دو میلی‌گرم NAA بود (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصله حداکثر حجم، طول و عرض کالوس با استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با دو میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. باتوجه‌به اینکه کمترین زمان برای شروع کالوس‌زایی در همین ترکیب هورمونی به‌دست آمد، می‌توان با استفاده از این سطح هورمونی به بیشترین میزان کالوس در کمترین زمان دست یافت. بدیهی است که تولید کالوس بیشتر در مدت زمان کمتر، یکی از اهداف مهم روش‌های کشت بافت می‌باشد و این امر، علاوه‌بر صرفه جویی در وقت و هزینه، از تنوع سوماکلونی احتمالی در نتیجه طولانی‌شدن مدت زمان کشت جلوگیری می‌کند؛ بنابراین استفاده از ترکیبات هورمونی فوق در مقایسه با ترکیبات دیگر از پتانسیل خوبی برخوردار هستند.

واکنش متفاوت ریزنمونه‌ها از لحاظ کالوس‌زایی به تغییرات غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی می‌تواند مربوط به فیزیولوژی و ژنتیک گیاه منبع ریزنمونه‌ها (گیاه پایه) باشد که تاثیر عمیقی روی پاسخ‌دهی در شرایط درون‌شیشه‌ای دارد. اگرچه گیاهان حاصل از تکثیر رویشی (کلون‌ها)، از لحاظ ژنتیکی کاملا شبیه گیاه مادری هستند، اما توده کلونی حاصل از یک گیاه مادری با توده کلونی حاصل از گیاه مادری دیگر متفاوت است (Merkle *et al*., 1990). براساس تحقیق انجام‌شده توسط Zare *et al*. (2010) مشخص شد که ریزنمونه برگ به مراتب درصد کالوس‌زایی کمتری نسبت به ریزنمونه‌های میانگره، قطعات گرهی و جوانه انتهایی داشته که این امر احتمالاً مربوط به شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه و مقدار هورمون‌های درون‌زا (اکسین و سیتوکینین) است که با نتایج ما مطابقت دارد.

با وجود اینکه هر دو هورمون به‌کاررفته در این پژوهش (NAA و BAP) بر حجم، عرض و ارتفاع کالوس تاثیر قابل توجهی داشتند، غلظت متوسط هورمون BAP (دو میلی‌گرم در لیتر) توانست نقش مهمی در القاء کالوس از نظر صفات مورد اندازه‌گیری ایفا کند. غلظت‌های بالای هورمون BAP (سه و چهار میلی‌گرم در لیتر) به شدت اثر بازدارنده داشته و سبب کاهش رشد و تشکیل کالوس و در نهایت سبب افزایش مدت زمان القاء کالوس شدند (شکل ۱). غلظت اکسین مورد استفاده در محیط کشت نیز عامل مهمی در القاء کالوس‌زایی بود؛ به‌طوری‌که کالوس تولیدشده در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشتر از غلظت دو میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. در غلظت‌های بین سه و چهار میلی‌گرم در لیتر BAP برای صفت حجم کالوس تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم NAA نیز تفاوت معنی‌داری در حجم کالوس مشاهده نشد (شکل ۱). Moafeghi *et al*. (2008) نیز گزارش کردند غلظت‌های بالای هورمون NAA سبب توقف رشد و تشکیل کالوس شد که با نتایج

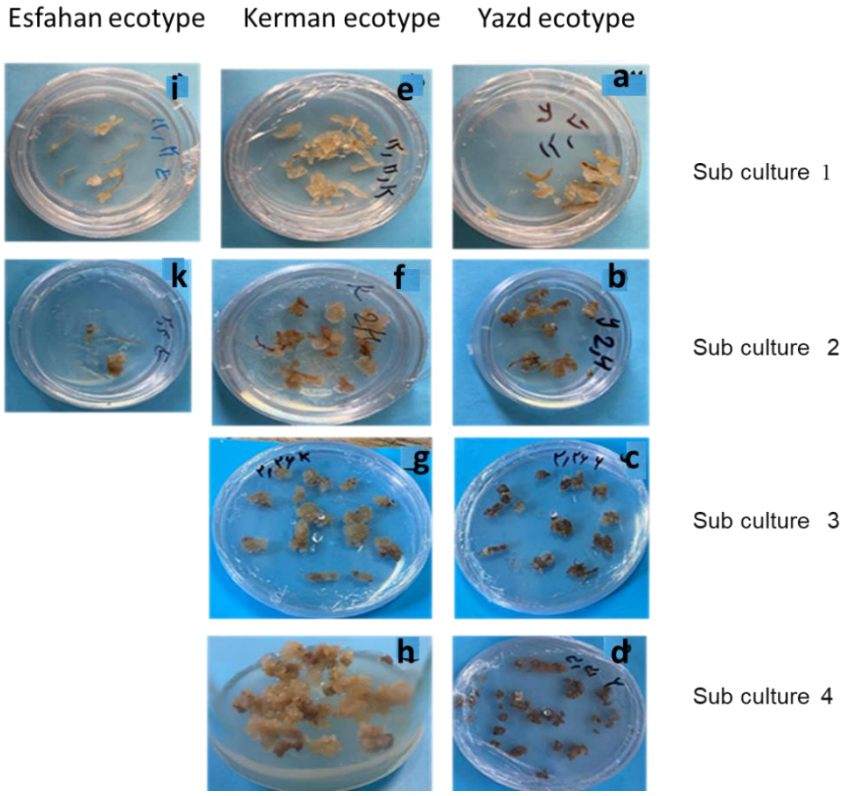
حاصل از پژوهش ما مطابقت دارد. حضور همزمان اکسین و سیتوکینین و ایجاد تعادل بین هورمون‌های داخلی ریزنمونه‌ها سبب افزایش تقسیم و تمایز سلولی ضروری شد. تقسیم سلولی نیز، موجب تشکیل کالوس و تمایز سلولی شد. تنوع در فراوانی تولید کالوس در پاسخ به سطوح مختلف هورمونی، می‌تواند به دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل‌کننده تولید کالوس (نظیر ARF7 و ARF19) باشد.



شکل ۱. اثرات اصلی تیمارهای هورمونی بر طول، عرض، ارتفاع و حجم کالوس.

بااین‌وجود، ممکن است که در بعضی از سطوح هورمونی مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس، به‌طور کامل بیان نشوند (Mahmood *et al.*, 2012). نتایج حاصل از پژوهش Sarabadani *et al.* (2008) روی گیاه کما نشان داد که بهترین ریزنمونه برای القاء کالوس مربوط به ریشه و بهترین سطوح هورمونی مربوط به ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده، اندام ریشه در غلظت هورمونی دو میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین محیط کشت بوده که برای مرحله دوم مطالعه انتخاب شد. در این مرحله از اکوتیپ‌های مختلف در بررسی سرعت رشد کالوس استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی اکوتیپ بر صفات اندازه‌گیری‌شده شامل طول و حجم کالوس در سطح احتمال یک درصد و ارتفاع کالوس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود؛ ولی برای عرض کالوس تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد که اکوتیپ کرمان نسبت به اکوتیپ یزد دارای حجم کالوس بیشتری بود که علت اصلی آن می‌تواند تفاوت ژن‌های هسته‌ای، ژن‌های سیتوپلاسمی و برهمکنش‌های ژنی و سطوح هورمونی درونی بین اکوتیپ‌ها باشد. رفتار گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای نسبت به فرایندهایی همچون تشکیل کالوس و رشد و باززایی عمدتا اساس ژنتیکی داشته و سهم دیگر عوامل محیطی بسیار ناچیز است. نتایج تجزیه واریانس حجم، طول، عرض و ارتفاع کالوس‌زایی برای انواع مختلف اکوتیپ و زمان یادداشت‌برداری در جدول ۳ آمده است. اثرات اصلی زمان یادداشت‌برداری برای صفات ارتفاع، عرض و حجم کالوس در سطح یک درصد معنی‌دار بود ولی برای حجم کالوس تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اثرات اصلی اکوتیپ برای صفات طول و حجم کالوس در سطح یک درصد و صفت ارتفاع کالوس در سطح پنج درصد معنی‌دار بود ولی برای عرض کالوس هیچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اثر متقابل زمان یادداشت‌برداری و اکوتیپ برای تمامی صفات مورد ارزیابی در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. نتایج حاصل از

مقایسه میانگین‌ها برای طول کالوس اندازه‌گیری‌شده نشان داد که بیشترین آن‌ها مربوط به اکوتیپ کرمان و هفته هشتم یادداشت‌برداری (برابر با ۱/۴۲ سانتی‌متر) و کمترین آن مربوط به اکوتیپ یزد و هفته هشتم یادداشت‌برداری (برابر با ۱/۱ سانتی‌متر) بود (شکل ۲ و ۳). باتوجه‌به اینکه محیط و نوع ریزنمونه مورد استفاده در هر دو اکوتیپ یکسان بود، عامل اصلی این تفاوت را می‌توان به هورمون‌های داخلی و نحوه تعامل هر اکوتیپ با محیط نسبت داد. نتایج حاصل از تحقیق Hassani *et al.* (2008) نشان داد که ۱۲ هفته بعد از کشت روی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل کالوس تشکیل شد که این کالوس‌ها سخت، سفید و متمایل به سبز تا شفاف بودند. همچنین آنها بیان کردند که درصد القاء کالوس با اکوتیپ متفاوت بود که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. نتایج حاصل نشان داد که در هفته دوم، ششم و هشتم اندازه‌گیری صفات، اکوتیپ کرمان نسبت به اکوتیپ یزد در تمامی صفات مورد بررسی مقادیر بالاتری داشت (شکل ۳). بیشترین تغییرات بین اکوتیپ‌ها مربوط به صفت حجم کالوس بود؛ به‌طوری‌که در هفته هشتم اندازه‌گیری، اکوتیپ کرمان نسبت به اکوتیپ یزد۶۰ درصد حجم کالوس بیشتری داشت؛ اما در هفته چهارم اندازه‌گیری، برای صفات عرض، ارتفاع و حجم کالوس، اکوتیپ یزد مقادیر بالاتری نسبت به اکوتیپ کرمان داشت. به‌ترتیب از بیشترین به کمترین مقادیر به‌دست‌آمده در صفات یادشده مربوط به هفته هشتم، ششم، دوم و چهارم بود (شکل ۲ و ۳).



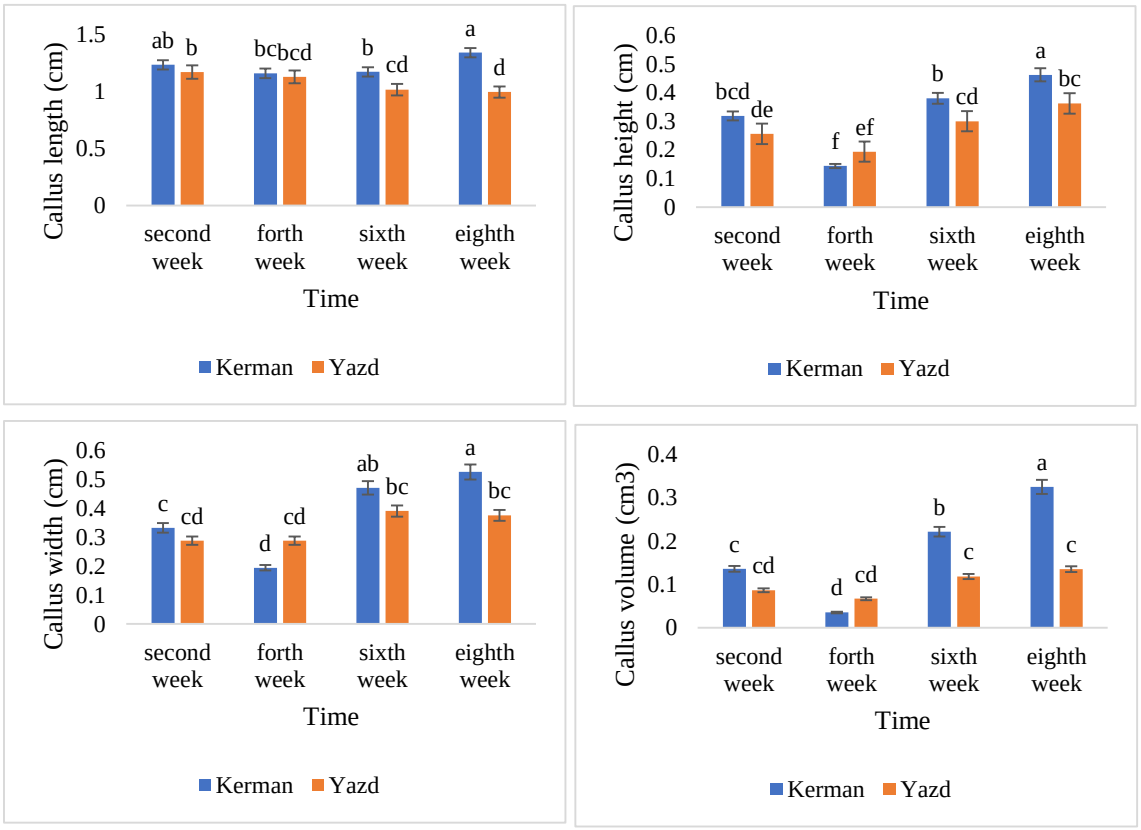
شکل ۲. سرعت رشد کالوس در طی چهار واکشت مختلف در اکوتیپ‌های مختلف. کالوس‌های تولیدشده در بازه‌های زمانی مختلف. a تا d) در اکوتیپ یزد، e تا h) اکوتیپ کرمان، i و k) اکوتیپ اصفهان (باتوجه‌به اینکه سرعت رشد کالوس اکوتیپ اصفهان به‌شدت کم بود، از پژوهش حذف شد).

جدول ۳. میانگین مربعات تجزیه واریانس اثر نوع اکوتیپ و زمان بر صفات مورد ارزیابی در گیاه آنغوزه تلخ در شرایط درون‌شیشه‌ای.

Source of Variation	df	MS			
		Callus volume	Callus width	Callus height	Callus length
Time (T)	3	0.016^{ns}	0.084**	0.079**	0.047**
Ecotype (E)	1	0.175**	0.018*	0.016^{ns}	0.048**
E×T	3	0.039*	0.009*	0.021*	0.017**
Error	24	0.010	0.002	0.006	0.002
C.V.	-	9.01	17.21	22.41	37.69

^{ns}، * و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

برخی از ژن‌ها نقش‌های کلیدی را در طول القا و رشد کالوس ایفا می‌کنند که بسته به نوع رقم یا اکوتیپ میزان بیان آن‌ها متفاوت است. از ژن‌های مهم می‌توان به خانواده فاکتورهای رونویسی *LBD* اشاره کرد که سبب فعال‌شدن ژن‌های مربوط به پاسخ اکسین (*ARF7* و *ARF19*) می‌شود. براساس مطالعاتی که توسط Zhang *et al.* (2022) انجام شد حدود ۱۳۵ ژن مهم در القاء کالوس و ۱۵ ژن مهم و موثر در رشد کالوس در گیاه اکالیپوس شناسایی شدند. در یک تحقیق از ۱۸ اکوتیپ مورد استفاده در گیاه آرابیدپسیس تالیانا فقط سه اکوتیپ و از ۴۳ اکوتیپ گیاه جو فقط در ریزنمونه‌های یک اکوتیپ کالوس مشاهده شد (Soltani *et al.*, 2019).



شکل ۳. اثرات متقابل اکوتیپ و زمان بر صفات طول، عرض، ارتفاع و حجم کالوس.

۴. نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل از اکوتیپ‌های مورد بررسی، اکوتیپ کرمان بیشترین و اکوتیپ اصفهان کمترین درصد جوانه‌زنی را نشان داد. بین ریزنمونه‌های مختلف ریشه، برگ و ساقه، ریزنمونه ریشه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها کالوس بهتری تولید کرد. همچنین در بین غلظت‌های هورمونی مورد بررسی، بیشترین طول، عرض، ارتفاع و حجم کالوس مربوط به غلظت هورمونی دو میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. ریزنمونه‌های برگ و ساقه بعد از تشکیل کالوس نکروزه و از بین رفتند. در غلظت‌های بالای هورمون BAP سرعت رشد کالوس به شدت کاهش یافت. در بین اکوتیپ‌های مورد پژوهش اکوتیپ کرمان نسبت به یزد دارای سرعت رشد بیشتری بود. همچنین بیشترین صفات مورد بررسی در هفته هشتم و کمترین آن‌ها در هفته چهارم به دست آمد.

۵. منابع

1. Ahmed, A.A., Hegazy, M.E.F., Zellagui, A., Rhouati, S., Mohamed, T.A., Sayed, A., & Hirata, T. (2007). Ferulsinaic acid, a sesquiterpene coumarin with a rare carbon skeleton from *Ferula* species. *Phytochemistry*, *68*(5), 680-686.

2. Gupta, V. (2003). Seed germination and dormancy breaking techniques for indigenous medicinal and aromatic plants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants Science*, *25*, 402-407.
3. Hadi, N., Omideygi, R., & Amini, A. (2011). In vitro conservation of *Ferula Gummosa* germplasm and its callus induction. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, *19*(1), 28-38. (In Persian)
4. Han, Y., Jin, X.L., Wu, F.B., & Zhang, G.P. (2011). Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University Science*, *12*(5), 399-407.
5. Hasani, B., Saboura, A., Rajabian, T., & Falah, H.H. (2008). Somatic embryogenesis of *Ferula assa-foetida*. *Journal of Science, 33*(4), 15-23
6. He, S.S., Liu, C.Z., & Saxena, P.K. (2007). Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. *Scientia Horticulturae, 113*(1), 82-86.
7. Kumar, A., Kumar, R., Singh, S., Sharma, S., Singh, S., & Kumar, S. (2020). Evaluation of *Ferula Assa-Foetida* accessions for germination parameters under cold stratification to overcome seed dormancy and effect of media mixtures on seedling growth. *Journal of Science, 2*(22), 150-162.
8. Li, H., Li, X., Wang, G., Zhang, J., & Wang, G. (2022). Analysis of gene expression in early seed germination of rice: landscape and genetic regulation. *BMC Plant Biology*, *22*(1), 1-14.
9. Martin, K.P. (2003). Rapid axillary bud proliferation and ex vitro rooting of Eupatorium triplinerve. *Biologia Plantarum*, *47*(4), 589-591.
10. Movafeghi, A., Habibi, G., & Ali, A.M. (2008). Plant regeneration of *Capparis Spinosa* L. using hypocotyl explants. *Iranian Journal of Biology*, *21*(2), 289-297. (In Persian)
11. Otroshi, M., & Ghehsareh, N.M. (2013). The effect of plant growth regulators and different type of explants on organogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, *3*(3), 271-278.
12. Radjabian, T., Saboora, A., Hhasani, B., & Fallah-Hosseini, H. (2007). Effects of GA3 and chilling on seed germination of *Ferula assa-foetida*, as a medicinal plant. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Fall*, *23*(37), 391-404. (In Persian)
13. Salehi, M., Naghavi, M.R., & Bahmankar, M. (2019). A review of *Ferula* species: Biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Industrial Crops and Products*, *139*, 111-115
14. Sarabadani, R., Omidi, M., & Bihamta, M. (2008). Evaluation of in vitro embryo culture and the effect of medium culture, hormone levels and explant types on callus induction and shoot organogenesis of *Ferula gummosa* L. *Journal of Medicinal Plants*, *7*(27), 71-81. (In Persian)
15. Soltani, S., Amin, G.R., Salehi-Sourmaghi, M.H., Schneider, B., Lorenz, S., & Iranshahi, M. (2018). Sulfur-containing compounds from the roots of *Ferula latisecta* and their cytotoxic activities. *Fitoterapia*, *124*, 108-112.
16. Tieu, A., Dixon, K.W., Meney, K.A., & Sivasithamparam, K. (2001). The interaction of heat and smoke in the release of seed dormancy in seven species from southwestern Western Australia. *Annals of Botany*, *88*(2), 259-265.
17. Traore, A, Guiltinan, M.J. (2006). Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience*, *41*, 753-758.
18. Tripathi, L., & Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *2*, 243-253.
19. Yaqoob, U., & Nawchoo, I.A. (2017). Conservation and cultivation of *Ferula jaeschkeana* Vatke: A species with deep complex morphophysiological dormancy. *Biological Sciences, 87*(2), 315-325.
20. Zare, A.R., Solouki, M., Omidi, M., Irvani, N., Abasabadi, A.O., & Nezad, N.M. (2011). Effect of various treatments on seed germination and dormancy breaking in *Ferula assa-foetida* L.(Asafetida), a threatened medicinal herb. *Trakia Journal of Sciences, 9*(2), 57-61.
21. Zare, A.R., Solouki, M., Omidi, M., Irvani, N., Nezad, N.M., & Rezazadeh, S. (2010). Callus induction and plant regeneration in *Ferula assa-foetida* L.(Asafetida), an endangered medicinal plant. *Trakia Journal of Sciences*, *8*(1), 11-18.
22. Zhang, Y., Li, J., Li, C., Chen, S., Tang, Q., Xiao, Y., ..., & Chen, B. (2022). Gene expression programs during callus development in tissue culture of two *Eucalyptus* species. *BMC Plant Biology*, *22*(1), 1-18.
23. Zhou, Y., Xin, F., Zhang, G., Qu, H., Yang, D., & Han, X. (2017). Recent advances on bioactive constituents in *Ferula*. *Drug Development Research*, *78*(7), 321-331.