فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲٦، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۵۹۵-۵۸۳ (۱۳۸۹)

مقایسه روشهای مختلف کشت بذر و جنین و بررسی اثر زغال فعال در بهینه‌سازی کشت درون شیشه گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.)

فروغ منتظری[1*]، منصور امیدی[2] و نیکنوش ایمانی[3]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج،
پست الکترونیک: montazeri1386fm@yahoo.com
۲- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۹

چکیده

گیاه ارزشمند دارویی باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.) از خانواده چتریان، بومی ایران و در حال انقراض می‌باشد که به دلیل رفتار باردهی سالانه (منوکارپیک) و خواب طولانی بذر، تولید انبوه اقتصادی آن با مشکل جدی مواجه است. بنابراین اولین قدم برای اصلاح ژنتیکی این گیاه، توانایی تولید تعداد زیادی گیاهچه سترون با بنیه مناسب، در زمان کم، به منظور تهیه ریزنمونه‌هایی با بنیه مناسب می‌باشد. در این پژوهش، کشت درون شیشه‌ای جنین باریجه در محیط کشت MS رقیق شده (۱/٤)، طی یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتورهای A در ۲ سطح (کشت جنین به صورت افقی؛ و به صورت عمودی به‌طوری که نیمی از جنین درون محیط باشد و برگهای جنینی رو به بالا باشند) و B در ٤ سطح (استفاده از ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم در لیتر زغال فعال) با ۳ تکرار انجام شد. صفات مختلف رشد به مدت ۵ هفته اندازه‌گیری شدند. همچنین کشت بذر در ٤ محیط آب مقطر، ۱/٤MS جامد، خاک و کاغذ صافی مرطوب بررسی شد. روشهای کشت جنین، توانستند گیاهچه‌های قویتر و بیشتری را در زمان کمتر، در مقایسه با روشهای کشت بذر تولید نمایند. درنهایت بهترین گزینه، استفاده از کشت جنین به صورت عمودی در محیط ۱/٤MS حاوی ۰/۵ گرم در لیتر زغال فعال بود. بدیهی است که استفاده از زغال فعال، شرایطی بسیار مشابه با رشد در محیط طبیعی را برای گیاه فراهم خواهد آورد.

واژه‌های کلیدی: باریجه (*Ferula gummosa* Boiss.)، کشت جنین، زغال فعال، گیاهچه، ریزنمونه.

مقدمه

گیاهان دارویی، یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر طی سالیان دراز از آنها استفاده نموده است. در حال حاضر از ۲۵۰ تا ۳۰۰ هزار گونه گیاهی، فقط ۵ هزار گونه جهت استفاده‌های درمانی مورد مطالعه قرار می‌گیرند. متأسفانه بسیاری از گونه‌های گیاهی حتی قبل از شناسایی آنها منقرض شده‌اند (اصغری، ۱۳۸۵). گیاه دارویی *Ferula gummosa*، با نام انگلیسی Galbanum از شاخه نهاندانگان و از رده دولپه‌ایها و خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد. باریجه از گیاهان بسیار ارزشمند

دارویی، صنعتی و آروماتیک بومی ایران است که به علت زادآوری پایین و برداشت بی‌رویه در حال انقراض می‌باشد. این گیاه چندساله و دارای رفتار گلدهی منوکارپیک بوده (در طول عمر خود تنها یک بار گل می‌دهد) و در چند سال اول رویش (۷-۵ سال)، برگهای طوقه‌ای تولید می‌کند. در سال آخر رویش به ساقه می‌رود و گل و میوه نیز روی آن تشکیل می‌شود، سپس ریشه گیاه می‌پوسد و گیاه ازبین می‌رود. از تمام اندام گیاه بوی تند و مخصوصی استشمام می‌شود که از علائم مشخص گیاه باریجه است. گیاه *F. gummosa* پایا و دارای ساقه ضخیم به ارتفاع یک تا دو متر و برگهایی به طول ۳۰ سانتی‌متر و به رنگ سبز مایل به خاکستری و پوشیده شده از تارهای ریز و کوتاه می‌باشد. جنس *Ferula* از تیره چتریان شامل بیش از ۱۳۳ گونه پراکنده در نواحی مدیترانه تا آسیای مرکزی می‌باشد. این جنس بیشتر در نواحی شمال و غرب ایران حضور دارد. شیرابه و اسانس باریجه در صنایع مختلف ازجمله صنایع داروسازی، غذایی، عطرسازی، چسب‌سازی و نظامی مورد استفاده قرار می‌گیرد (امیدبیگی، ۱۳۷٦؛ زرگری، ۱۳٦۹). مشخص شده است که آلفا-پینن و بتا-پینن دو ترکیب اصلی اسانس باریجه‌های ایران را تشکیل می‌دهند (Talebi *et al.*, 2008). این گیاه از مدتها پیش در طب سنتی کشورمان شناخته شده است. از اثرهای درمانی آن استفاده از عصاره این گیاه در جهت تسکین سندروم محرومیت از مورفین می‌باشد (Ramezani *et al.*, 2001). همچنین فعالیت ضد صرع و ضد تشنج بذر این گیاه بر روی موش ثابت شده است (Sayyah *et al.*, 2002). از نظر صنعتی نیز دارای مصارف بسیار زیاد و ارزشمندی است. به‌طوری که در بازارهای کشورهای صنعتی خواهان زیادی دارد و شیرابه این گیاه از اقلام مهم صادراتی ایران محسوب می‌شود. ازجمله مصارف صنعتی صمغ باریجه، کاربرد آن در صنایع عطر و ادکلن‌سازی، نقاشی، نساجی و داروسازیست (Mortazaienezhad & Sadeghian, 2006). همچنین از آن به‌عنوان شوینده‌های آنتی‌باکتریال خوشبو استفاده می‌شود (Ghasemi *et al* ., 2005). Nadjafi و همکاران (۲۰۰۵) با تحقیق بر روی جوانه‌زنی بذر این گیاه، روشهایی برای شکستن خواب بذر گیاه باریجه ارائه داده‌اند. سرآبادانی و امیدی (۱۳۸٦) اثر سطوح هورمونی و ریزنمونه بر کالزایی و باززایی گیاه باریجه را بررسی نموده و از کشت جنین به‌عنوان یک روش مؤثر در برابر خواب بذر باریجه استفاده کردند. یکی از مشکلات کشت بافت گیاهان خانواده چتریان استقرار ضعیف آنها در خاک بعد از کشت درون شیشه به علت مستعد بودن آنها به پوسیدگی قارچی و بیماریهایی که باعث پژمردگی و پلاسیدگی می‌شود، می‌باشد و این در گیاهان دیگر این خانواده ازجمله *Ammi visgana* (Ekiert, 2000)، *Cuminum cyminum* (Tawfik & Makunga *et.al.*, 2003)، *Thapsia garganica* (Noga, 2001) و حساسیت آنها به اشباع آبی (Hunault, 1984) اثبات شده است. در کشت مزرعه‌ای خانواده چتریان، برای مدیریت بیماریهای قارچی برگها را به محض مشاهده علائم، با قارچ‌کش سم‌پاشی می‌کنند (Douglas & Cowley, 2003). طبق تحقیقات گذشته، استفاده از زغال فعال در محیط کشت، اثرهای سودمندی در جنین‌زایی سوماتیکی (Chee & Tricoli, 1988)، کشت بساک (Johansson, 1983)، جوانه‌زنی بذر (van Waes, 1987) و ریشه‌زایی (Wang, 1991) دارد. زغال چوب فعال شده با وجود دارا بودن سطحی صاف، شبکه بسیار

وسیعی از منافذ ریز و کوچک دارد، به حدی که به آن یک توانایی جذب منحصر به فرد می‌دهد (Thomas, 2008). همچنین یک تأثیر مهم اما نامشخص، در جنبه‌های باززایی درون شیشه‌ای دارد. Mensuali-Sodi و همکاران (۱۹۹۳)، نشان دادند که حضور زغال فعال در محیط کشت گیاه *Anemone coronaria* با جذب اتیلن محیط و محدود کردن اثرهای زیانبار فنل‌های اکسید شده و آزاد شده توسط بافت گیاهی، باعث افزایش تعداد برگ و طول ساقه و کیفیت گیاهچه شده است. در کشت پیاز (Fridborg & Eriksson, 1975)، زغال فعال باعث تحریک و افزایش ریشه‌زایی شد.

با توجه به اهمیت زیاد دارویی و صنعتی این گیاه بومی و در حال انقراض، به‌عنوان یک مقوله صادراتی ارزشمند و ارزآور برای کشور، استفاده از روشهای کشت بافت، مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی برای اصلاح این گیاه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه آن، ضروری به نظر می‌رسد و اولین قدم برای رسیدن به این هدف، توانایی تولید انبوه گیاهچه‌های سترون و با بنیه مناسب در زمان کم، به منظور تهیه ریزنمونه مناسب برای کشت توأم با باکتری اگروباکتریوم و یا دیگر روشهای اصلاحی می‌باشد. اما با توجه به ویژگی خاص گیاه مذکور به علت منوکارپیک بودن آن، دوره خواب طولانی بذر و وجود بیماریهای قارچی، تولید انبوه این گیاه با مشکل جدی مواجه است. در تحقیق حاضر، کشت درون شیشه‌ای جنین باریجه در محیط حاوی زغال فعال، در مقایسه با روشهای مختلف کشت بذر و کشت جنین این گیاه، با هدف ایجاد توانایی در تولید انبوه گیاهچه‌های سترون باریجه با بنیه قوی و در زمان کم، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

ضدعفونی کردن بذرها

در این مطالعه بذرها که از مناطق کوهستانی استان اصفهان جمع‌آوری شده بودند، ابتدا به مدت ٤۸ ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند. بعد توسط مایع صابون و آب شسته شدند. سایر مراحل به منظور ضدعفونی نمودن سطحی بذرها، در زیر اتاقک دارای جریان هوای سترون (لامینارفلو) انجام شد. به این منظور بذرها به صورت متوالی، به وسیله اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۲۵ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد ۳ مرتبه با آب مقطر ۲ بار استریل، کاملاً شستشو داده شدند (سرآبادانی و همکاران، ۱۳۸٦). تمامی وسایل و مواد مورد استفاده در همه مراحل پژوهش شامل: پنس، اسکالپل، پتری، کاغذ صافی، ارلن، سوزن و ... به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ بار، اتوکلاو شدند.

کشت بذر

به منظور کشت بذر محیط‌های متفاوت زیر هر کدام با سه تکرار، بررسی شد.

آب مقطر: درون لوله‌های آزمایش آب مقطر دوبار استریل شده تا سرحد پل‌های کاغذی که قبلاً در آنها قرار داده شده بود، ریخته شد. سپس به کمک پنس ۲ عدد بذر روی هر پل قرار داده شد. لازم به ذکر است که در نیمی از لوله‌ها، بذرها توسط اسکالپل خراش داده شدند. سپس لوله‌ها توسط فویل و پنبه پوشیده شده و با نوار پارافیلم مسدود شدند.

محیط کشت ۱/٤MS: لیوانهای شیشه‌ای حاوی محیط کشت ۱/٤MS از عناصر ماکرو و میکرو همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار (pH= 5.8-6) تهیه

شد. سپس در هر لیوان ۵ بذر با فاصله مساوی قرار داده شد و درب آنها بسته شد.

خاک لومی و مخلوط کوکوپیت و پرلیت: لیوانهای بزرگ شیشه‌ای که در نیمی از آنها خاک لومی متوسط و در نیمی دیگر مخلوط کوکوپیت و پرلیت استریل ریخته شده بود، تهیه شد. سطح آنها به مقدار لازم، با آب مقطر دوبار استریل خیس شد و در هر کدام ۵ عدد بذر قرار داده شده و بعد درب آنها بسته شد. همه لیوانها و لوله‌های آزمایش، در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شده و بعد از ٤ هفته به اتاق رشد با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

کاغذ صافی مرطوب: دو ورق کاغذ صافی در کف ظروف مسطح قرار داده و ۳۰ عدد بذر به‌طور یکنواخت و با فاصله روی آن چیده شد. سپس یک کاغذ صافی مرطوب روی آن قرار داده و درب آن بسته و در یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۵۰ روز، قرار داده شد. لازم به ذکر است که هر ۲ تا سه روز یک‌بار سطح کاغذ صافی با آب استریل شده خیس شده و هر هفته کاغذ صافی‌ها تعویض می‌شد. سپس بذرهای جوانه‌زده برای جلوگیری از آسیب جوانه‌ها به صورت خیلی سطحی در خاک گلدان کشت و گلدانها به فضای آزاد منتقل شدند.

کشت جنین بالغ

الف- پس از آزمایش‌های اولیه در مورد نحوه کشت جنین بالغ باریجه به منظور شکستن خواب بذر و استفاده از زغال فعال در محیط کشت، برای دستیابی به گیاهچه‌های قویتر یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی شد. این آزمایش شامل فاکتور A در ۲ سطح (کشت جنین به صورت افقی a0؛ کشت جنین به صورت عمودی به‌طوری که نیمی از جنین درون محیط باشد و برگهای جنینی (cotyledons) رو به بالا باشند a1) و فاکتور B در ٤ سطح (محیط کشت ۱/٤MS فاقد زغال فعال b0 و سه سطح دیگر همان محیط کشت به‌ترتیب با ۰/۵ (b1)، ۱ (b2) و ۱/۵ (b3) گرم در لیتر زغال فعال) با ۳ تکرار انجام شد. پس از اینکه بذرها ٤۸ ساعت زیر آب جاری قرار گرفته و به روش ذکر شده ضدعفونی شدند، محور جنینی توسط پنس و اسکالپل از پوشش بذر خارج گردیده (سرآبادانی و امیدی، ۱۳۸٦) و بعد جنین‌ها به محیط‌های کشت مختلفی که اشاره شد، انتقال یافتند. لازم به ذکر است که در هر لیوان ۵ جنین سالم کشت شد و ظروف با نوار پارافیلم کاملاً مسدود شده و به اتاقک کشت منتقل شدند. به مدت ۵ هفته فاکتورهای مختلفی از رشد اندازه‌گیری شد و نتایج بررسی شدند.

ب- انتقال جنین‌ها به لوله آزمایش حاوی پل‌های کاغذی شامل محیط کشت مایع ۱/٤MS و آب مقطر؛ و لیوانهای حاوی محیط‌های کوکوپیت- پرلیت (به نسبت یک به یک) و خاک.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

کشت بذر

در مورد کشت بذر، بهترین نتیجه از روش استفاده از کاغذ صافی مرطوب حاصل شد که حدود ۵۰٪ بذرها پس از ٤۵-٤۰ روز تیمار سرمایی ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال جوانه زدند. البته به دلیل اینکه جوانه‌ها بسیار حساس بودند، انتقال آنها به خاک کار بسیار دشواری بود. ۱۵ تا ۱۸ روز بعد حدود ۲۰٪ آنها مستقر شدند و در روز

۲۵ام حدود ۱۰٪ آنها به مرحله چند برگی رسیدند (شکل ۱). در مورد تیمارهای دیگر نتایج قابل قبولی مشاهده نشد و حدود ۲۰٪ از بذرهای کشت شده در لیوان (شکل ۲) به روش استفاده از محیط کشت ۱/٤MS و فقط ۱۰٪ از بذرهای خراشیده شده در لوله‌های آزمایش به روش استفاده از آب مقطر، بعد از ٤۵ تا ۵۰ روز جوانه زدند (شکل ۳) ولی هیچ کدام به مرحله برگ‌دهی نرسیدند. هیچ کدام از بذرها در روش استفاده از خاک لومی و مخلوط کوکوپیت و پرلیت جوانه نزدند.

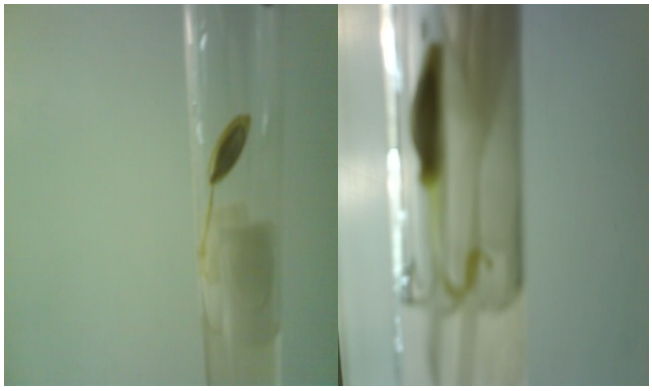
کشت جنین بالغ

در مورد کشت جنین بالغ، آزمایش فاکتوریل شامل فاکتورهای A و B در ۳ تکرار بشرح بالا صورت گرفت و پس از تجزیه واریانس، نتایج زیر حاصل شد (جدول ۱). در این آزمایش صفات طول کوتیلدون، تعداد برگ، طول برگ، تعداد ریشه، طول ریشه، وزن خشک، ارتفاع گیاهچه و طول کل گیاهچه اندازه‌گیری شدند. در مورد فاکتور A یعنی نحوه کشت جنین به صورت افقی یا عمودی، صفات طول کوتیلدون، تعداد برگ، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه در سطح ۵٪ معنی‌دار شدند؛ همچنین صفات طول کوتیلدون، طول ریشه، وزن خشک و طول کل گیاهچه نیز در مورد فاکتور B یعنی استفاده از سطوح مختلف زغال فعال، معنی‌دار شناخته شد. اثر متقابل AB نیز در مورد صفت طول کوتیلدون معنی‌دار شناخته شد.

مقایسه میانگین انجام شده توسط آزمون دانکن نشان داد که روش کشت جنین به صورت عمودی، در مقایسه با کشت افقی، نتایج بهتری را به خصوص در مورد صفات طول کوتیلدون، تعداد برگ، طول برگ، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه ایفا نموده است (شکل ۷). مزیت استفاده از زغال فعال به خصوص در سطح دوم یعنی نیم گرم در لیتر نیز کاملاً مشهود بود؛ به‌طوری که در بیشتر صفات مورد اندازه‌گیری، بهترین محیط‌ها به‌ترتیب b1 و b2 بودند. طبق آزمون دانکن، در مقایسه میانگین صفات طول کوتیلدون، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه، سطح b1 علاوه بر اینکه بیشترین میانگین را به خود اختصاص داد، در یک گروه مجزا (a) قرار گرفت (شکل ۸). همچنین انتقال جنین یک هفته‌ای به لوله آزمایش حاوی پل‌های کاغذی و لیوانهای حاوی محیط‌های کوکوپیت و پرلیت و خاک، کارایی لازم را نداشت چون اکثر جنین‌ها در اثر انتقال آسیب می‌دیدند.

شکل ۱- گیاهچه کامل *F. gummosa* ٤۵ روز بعد از انتقال بذرهای جوانه زده در کاغذ صافی مرطوب به خاک

شکل ۲- بذر جوانه زده گیاه *F. gummosa* در محیط کشت ۱/٤MS جامد



شکل ۳- بذر جوانه زده *F. gummosa* در لوله آزمایش حاوی آب مقطر

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دو فاکتور A (نحوه کشت) و B (میزان زغال فعال) بر صفات مختلف رشد در کشت جنین گیاه *F. gummosa*

منبع تغییر	درجه آزادی	طول کوتیلدون	تعداد برگ	طول برگ	تعداد ریشه	طول ریشه	وزن خشک	ارتفاع گیاهچه	طول کل گیاهچه
A	۱	۳۹٦/۳۵۹★	۰/۰٦۹۳★	۷۰٦/۱۹۲^{ns}	۰/۰۹۷٤^{ns}	۱۱۵/۷۰۱^{ns}	۰/۰۰٤۰★	۱۳۱۸/۷۰۵★	۲۲۱۵/٦۲۳^{ns}
B	۳	۱٦۹/۰۰۵★	۰/۰۲٤۷^{ns}	۱۷۷/۱٤۸^{ns}	۰/۲۱٤٤^{ns}	۲۹۱٦/۱٤۵★	۰/۰۰۱۳★	۳۰٦/٦۳۱^{ns}	٤۹۲٦/۸۱۱★
AB	۳	۱۸۹/۳۰۳★	۰/۰۰۹^{ns}	۳٤/٦۳۸^{ns}	۰/۰۷۷۲^{ns}	۱۸٤۷/۳۱۸^{ns}	۰/۰۰۰۹۲★	۱۳۳/۷۹۱^{ns}	۲۸۷٦/۰۵۱^{ns}
خطا	۱٤	۳۰/۱۰۷	۰/۰۱۲	۱٦۱/٦۷۹	۰/۰۷۸۰	۷۲۸/۵۸۷	۰/۰۰۰۲۸	۱٦۱/۳٤٦	۱۳٤۲/۷۳۸

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

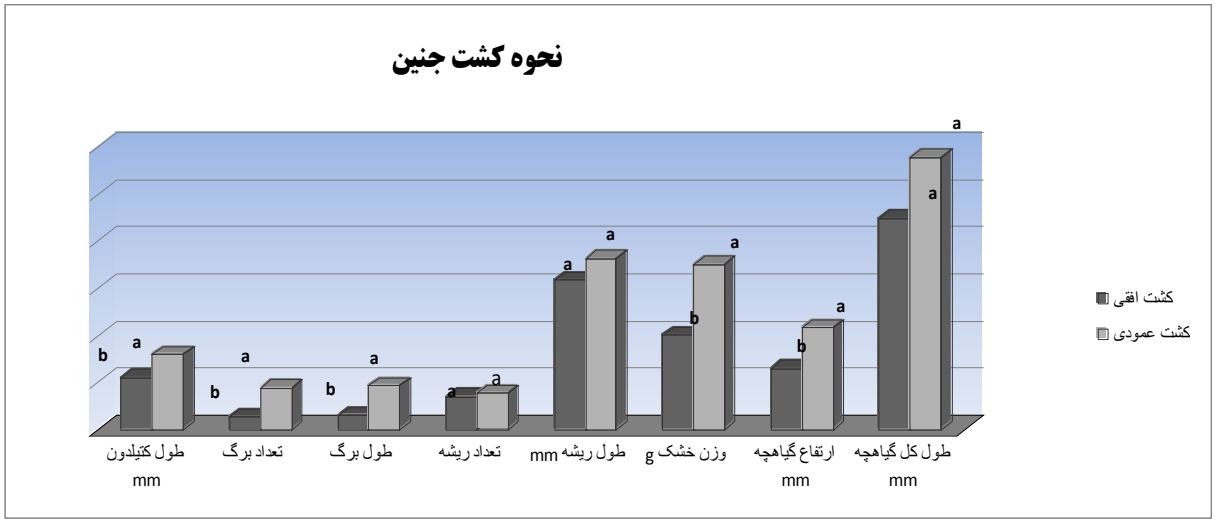
ns: غیر معنی‌دار

شکل ٤- مقایسه دو روش کشت جنین افقی (a) و عمودی (b) *F. gummosa* و استقرار بهتر گیاهچه در روش کشت جنین به‌طور عمودی

شکل ۵- کشت جنین *F. gummosa* در محیط فاقد زغال فعال

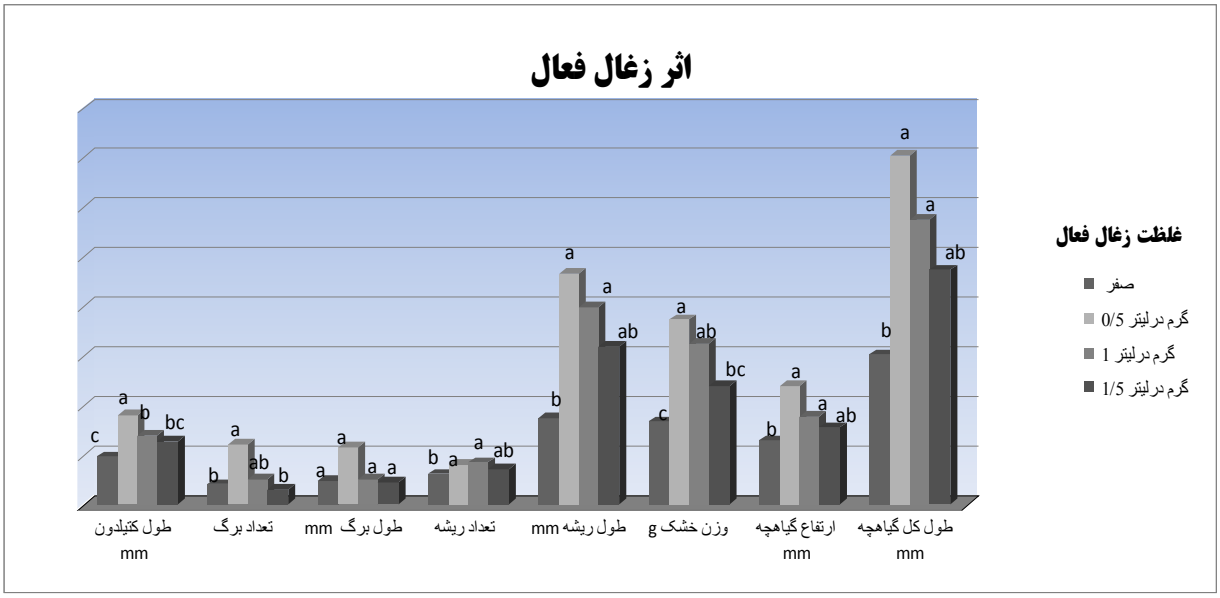
شکل ٦- جنین *F. gummosa* کشت شده در محیط حاوی زغال فعال بعد از ۱۵ روز

در مقایسه با شکل قبلی گیاهچه‌ها قویترند و برگ اصلی آنها ظاهر شده‌است.



شکل ۷– مقایسه دو روش کشت جنین به‌طور افقی و عمودی در رشد گیاه *F. gummosa* با آزمون دانکن

(کشت عمودی بر کشت افقی مزیت دارد.)



شکل ۸– مقایسه استفاده از سطوح مختلف زغال فعال در رشد گیاه *F. gummosa* با آزمون دانکن

(سطح دوم یعنی نیم گرم در لیتر زغال فعال در اکثر صفات، بهترین عملکرد را داشته است.)

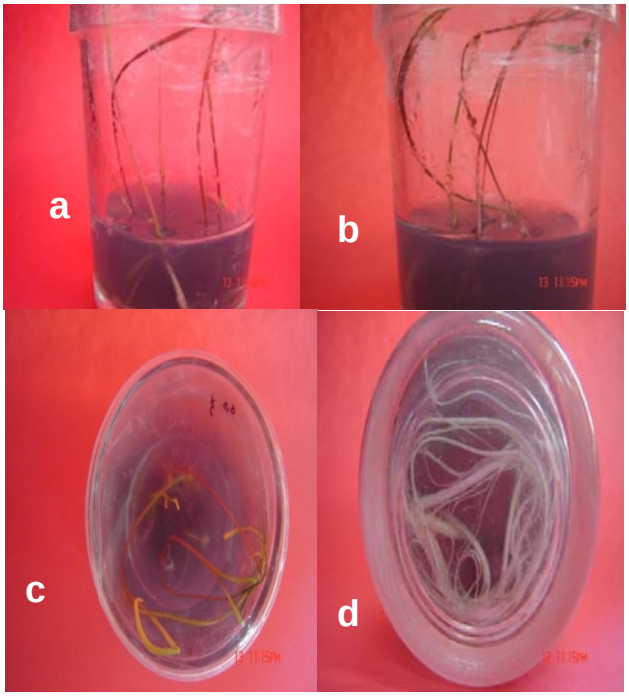
بحث

در تحقیق حاضر، کشت درون شیشه‌ای جنین باریجه در محیط حاوی زغال فعال، در مقایسه با روشهای مختلف کشت بذر و کشت جنین باریجه، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، از میان تیمارهای مختلفی که برای کشت بذر استفاده شده

بود، بهترین نتیجه به کمک کاغذ صافی مرطوب حاصل شد که حدود ۵۰٪ بذرها پس از ٤۵-٤۰ روز تیمار سرمایی ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال جوانه زدند. این نتیجه با گزارش Nadjafi و همکاران (۲۰۰۵) همخوانی دارد و نشان می‌دهد که شستشوی روزانه بذرها و تعویض کاغذ صافی در شکستن خواب بذر تأثیر دارد. البته به دلیل اینکه جوانه‌ها بسیار حساس بودند، انتقال آنها به خاک کار بسیار دشواری بود. احتمالاً عدم پاسخ مناسب در مورد تیمارهای کشت بذر در خاک و کوکوپیت و پرلیت، کم بودن مدت زمان سرمادهی می‌باشد که این نتیجه، گزارش Rahnama و Tavakoli (۲۰۰۷) را تأیید می‌کند. همچنین حساس بودن این خانواده به بیماری قارچی، مانع از رشد بیشتر گیاهچه‌ها می‌شد (Makunga *et al.*, 2005). در مجموع از هیچ کدام از روشهای کشت بذر نتیجه مناسبی بدست نیامد. به دلیل اینکه این روشها به زمان بسیار زیادی نیاز داشتند و همچنین میزان گیاهچه‌های سالم بدست‌آمده خیلی کم بود. به همین دلیل از کشت بذر صرف‌نظر شده و به کشت جنین اکتفا شد.

در آزمایش‌های اولیه مشخص شده بود که رشد جنین‌ها در محیط کشت ۱/٤MS نسبتاً مطلوب است که این نتیجه، پژوهش سرآبادانی و امیدی (۱۳۸٦) را تأیید می‌کند. آنها اثر سه سطح محیط کشت MS (۱، ۱/٤ و ۱/۸) را بر کشت جنین *F.gummosa* بررسی نموده و نشان دادند که ۱/٤MS بهترین محیط برای کشت جنین باریجه می‌باشد. ایشان همچنین بیان نموده‌اند که جنین‌ها در محیط‌های دیگر، یا جوانه نزده یا بعد از ۲ روز ازبین رفته‌اند. در پژوهش حاضر نیز جنین‌ها در محیط‌های دیگر ازجمله: ۱/٤MS مایع و آب مقطر رشد مناسبی نداشتند و این با نتایج سرآبادانی و امیدی (۱۳۸٦) همخوانی دارد. همچنین جنین‌ها در محیط‌های کوکوپیت و پرلیت و خاک، یا رشد خوبی نداشته و یا ازبین رفتند. احتمالاً علت عدم موفقیت در انتقال جنین و بذر جوانه زده به خاک یا کوکوپیت، حساس بودن جنین و ظریف و بسیار نازک بودن ریشه در شرایط کشت درون شیشه می‌باشد (Gangopadhyay *et al.*, 2002).

اما در مقایسه کشت جنین در ۱/٤MS فاقد زغال فعال (شکل ۵) و ۱/٤MS حاوی زغال فعال، مشاهده شد که گیاهچه‌ها در محیط حاوی زغال فعال به‌سرعت ریشه داده، استقرار خوبی داشته و بسیار قویتر بودند (شکل ٦)؛ همچنین سرعت رشدشان بیشتر بوده و طول مدت زنده ماندن آنها حدود ۱۵ تا ۲۰ روز بیشتر از محیط فاقد زغال فعال بود (شکل ۹). سودمندی استفاده از زغال فعال در گیاهان دیگر همچنین در خانواده Apiaceae نیز به اثبات رسیده است. چون زغال فعال فیتوهورمون‌های اضافی و دیگر مواد ساخته شده در محیط را که مانع ریشه‌زایی می‌شوند جذب می‌کند و همچنین یک محیط تاریک (Pan & Van Staden, 2002) شبیه به شرایط محیط طبیعی را برای گیاه فراهم می‌کند (Makunga *et al.*, 2006). همچنین تغییر PH محیط به یک سطح بهینه، جذب ناخالصی‌های آگار و مواد شیمیایی بازدارنده رشد که در زمان انجام اتوکلاو توسط دهیدراسیون ساکاروز تولید می‌شوند، از اثرهای دیگر زغال فعال می‌باشد (Thomas, 2008).



شکل ۹- رشد مناسب و زنده ماندن جنین *F. gummosa* در محیط حاوی زغال فعال بعد از ٤٠ روز نمای گیاهچه (a و b)؛ ایجاد برگ، نما از بالا (c)؛ ریشه‌زایی در زغال فعال، نما از پایین (d)

Firoozabady و همکاران (۲۰۰٦) نشان دادند که در گیاه *Ananas comosus* ساقه‌های ترانسفورم شده و تکثیر شده، در محیط کشت ۱/۲MS با مکمل chlorsulfuron و ۰/۵ تا ۳ گرم در لیتر زغال فعال ریشه‌دار شدند. آنها گزارش کردند که زغال فعال باعث افزایش توانایی ریشه‌زایی شده است. همچنین در ریز ازدیادی گیاه *Swertia chirayita* از محیط کشت ۱/۲MS حاوی NAA و ۰/۵ گرم در لیتر زغال فعال برای ریشه‌زایی استفاده شده است (Joshi & Dhawan, 2007).

در پژوهش حاضر، برتری کشت جنین به صورت عمودی نسبت به کشت جنین در وضعیت افقی نیز بسیار مشهود بود. لازم به یادآوریست، در حالتی که جنین‌ها به صورت افقی روی سطح محیط قرار می‌گیرند معمولاً بعد از چند روز اشکال مورفولوژیکی غیرنرمال به خودگرفته و ازبین می‌رفتند یا اگر زنده می‌ماندند به مرحله دو برگی نمی‌رسیدند. اما در روش دیگری که سطح محیط با نوک پنس کمی خراشیده شد و جنین‌ها به صورت عمودی روی محیط قرار داده شدند، به‌طوری که نیمی از جنین درون محیط کشت باشد و برگهای جنینی رو به بالا باشند، تقریباً همه گیاهچه‌ها رشد مناسب و سریعی داشته و سریعتر برگ دادند (شکل ٤). علت برتری این روش، احتمالاً به دلیل استقرار بهتر و سریعتر ریشه‌چه در محیط کشت و رشد سریع ریشه به سمت پایین و رشد آسانتر برگهای جنینی به سمت بالا می‌باشند، که در این حالت بهتر در معرض نور قرار می‌گیرند. در مورد گیاه *Cuminum cyminum* از خانواده Apiaceae مشاهده شد که جنین بالغ توانایی و ظرفیت بالایی را در رشد سریع و ادامه‌دار و باززایی مورفوژنتیکی درون شیشه‌ای، بدون

نشان دادن صفات تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی دارد. اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم نیز از جنین بالغ این گیاه گزارش شده است (Ebrahimie *et al.*, 2003, 2006).

درنهایت استفاده از کشت عمودی جنین در محیط ۱/٤MS جامد حاوی ۰/۵ گرم در لیتر زغال فعال، به‌طوری که برگهای جنینی به سمت بالا قرار گرفته باشند، به‌عنوان بهترین گزینه برای تهیه گیاهان استریل با بنیه مناسب و ریزنمونه‌های قوی که در مجاورت اگروباکتریوم و آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر زنده بمانند و قابلیت استفاده در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی را داشته باشند، توصیه می‌شود. بدیهی است که این روش، شرایطی بسیار مشابه با رشد در محیط طبیعی را برای گیاه فراهم خواهد آورد. همچنین می‌تواند قدمی مؤثر جهت تولید انبوه گیاهچه‌های سترون و در نتیجه جلوگیری از انقراض این گیاه و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق روشهای مهندسی ژنتیک، محسوب شود. لازم به تذکر است که بررسی تأثیر همزمان هورمون‌های رشد و زغال فعال به منظور رشد بهتر گیاه باریجه توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

- اصغری، غ.، ۱۳۸۵. بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و تولید داروهای گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان، ۲۸۷ صفحه.
- امیدبیگی، ر.، ۱۳۷٦. رهیافتهای تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد ۳، طراحان نشر، ٤۲٤ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳٦۹. گیاهان دارویی. جلد ٤، انتشارات دانشگاه تهران، ۹٤۵ صفحه.
- سرآبادانی، ر. و امیدی، م.، ۱۳۸٦. تأثیر سطوح هورمونی ریزنمونه در کال‌زایی و باززایی گیاه باریجه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۷۰ صفحه.
- Chee, P.P. and Tricoli, D.M., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativus* L. Plant Cell Reports, 7: 274-277.
- Douglas, S. and Cowley, R., 2003. The Connecticut Agricultural Experiment Station's Plant Pest Handbook. http:// www.caes.state.ct.us/plantpesthandbookfiles/pphf.
- Ebrahimi, E., Habashi, A.A, Ghareyazi, B., Ghannadha, M.R. and Mohammadi, M., 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantles from embryo explants of Cumin. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 75: 19-25.
- Ebrahimie, E., Habashi, A., Mohammadie-Dehcheshmeh, A., Ghannadha, M., Ghareyazie, M. and Yazdi-Amadi, B., 2006. Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and genotype-independent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 42: 455-460.
- Ekiert, H., 2000. The Apiaceae family as an example of development. Pharmazie, Medicinal Plant Biotechnology, 55: 561-567.
- Firoozabady, E., Heckert, M. and Gutterson N., 2006. Transformation and regeneration of pineapple. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 84: 1-16.
- Fridborg, G. and Eriksson, T., 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. Physiologia Plantarum, 34: 306-308.
- Gangopadhyay, G., Das, S., Mitra, S.K., Poddar, R., Modak, B.K. and Mukherjee, K.K., 2002. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 68: 301-310.
- Ghasemi, Y., Faridi, P., Mehregan, I. and Mohagheghzadeh, a., 2005. *Ferula gummosa* Boiss. Fruits: An aromatic antimicrobial agent. Chemistry of natural compounds, 41(3): 311-314.
- Hunault, G., 1984. In vitro culture of fennel tissues (*Foeniculum vulgare* Miller) from cell suspension to mature plant. Scientia Horticulturae, 22: 55-56.
- Johansson, L., 1983. Effects of activated charcoal in anther cultures. Physiologia Plantarum, 59: 397-403.
- Joshi, P. and Dhawan, V., 2007. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita*, plantlets by ISSR marker assay. Biologia Plantarum, 51: 22-26.
- Makunga, N.P., Jager, A.K. and Van Staden, J., 2003. Micropropagation of *Thapsia garganica*- a medicinal plant. Plant Cell, Reports, 21: 967-973.
- Makunga, N.P., Jager, A.K. and Van Staden, J., 2005. An improved system for the in vitro regeneration of *Thapsia garganica* via direct organogenesis-influence of auxins and cytokinins. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82: 271-280.
- Makunga, N.P., Jager, A.K. and Van Staden, J., 2006. Improved in vitro rooting and hyperhydricity in

morphine dependence in mice. Journal of Ethnopharmacology, 77(1): 71-75.
- Sayyah, M., Mandgary, A. and Kamalinejad, M., 2002. Evaluation of the anticovulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* against seizures induced by pentylenetrazole and electroconvulsive shock in mice. Journal of Ethnopharmacology, 82(3): 105-109.
- Talebi, K.E., Naghavi, M.R. and Alayhs, M., 2008. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. Chemistry of Natural Compounds, 44(1): 44: 124-126.
- Tawfik, A.A. and Noga, G., 2001. Adventitious shoot proliferation from hypocotyls and internodal stem explants of cumin. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 66: 141-147.
- Thomas, T.D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26: 618-631.
- van waes, J., 1987. Effect of activated charcoal on in vitro propagation of Western Europeanorchids. Acta Horticalture, 212: 131-138.
- Wang, Q., 1991. Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock. Scientia Horticalture, 45: 209-213.
regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86: 77-86.
- Mensuali-Sodi, A., Panizza, M., Serra, G. and Tognoni, F., 1993. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue cultures. Scientia Horticalture, 54: 49-57.
- Mortazaienezhad, F. and Sadeghian, M.M, 2006. Investigation of compounds from galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.). Asian Journal of Plant Sciences, 5(5): 905-906.
- Nadjafi, F., Bannayan, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M., 2005. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. Journal of Arid Environment, 64: 542-547.
- Pan, M.J. and Van Staden, J., 2002. The effect of activated charcoal and auxins on root formation by hypocotyl segments of *Daucus carota*. South African Journal of Botany, 68: 357-361.
- Rahnama, G.A. and Tavakoli, A.R., 2007. Methods for dormancy breaking and germination of galbanum seeds (*Ferula gummosa*). Asian journal of plant sciences, 6(4): 611-616.
- Ramezani, M., Hosseinzade, H. and Mojtahedi, K., 2001. Effects of *Ferula gummosa* Boiss. Fraction on

Comparing various methods of seed and embryo culture and charcoal effect in optimizing *in vitro* culture of Galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.)

F. Montazeri[1*], M. Omidi[2] and N. Imani[3]

1*- Corresponding author, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran,
E-mail: montazeri1386fm@yahoo.com
2- Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran
3- MSc student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran

Received: January 2010 Revised: June 2010 Accepted: June 2010

Abstract

Ferula gummosa Boiss. is an endangered plant species of the family Apiaceae and endemic to Iran whose mass production is exposed to serious problems due to being monocarpic and prolonged seed dormancy. The first step to improve this precious medicinal, industrial and economic plant is ability in production of numerous sterile plantlets in order to prepare explants of appropriate vigour. In this survey, *in vitro* culture of galbanum was performed in MS 1/4 medium by a factorial trial in the form of completely random design including A factor in 2 levels (embryo culture horizontally; and vertically so that half part of the embryo is inside the medium and cotyledons stand upward) and B in 4 levels (containing 0, 0.5, 1, 1.5 g/L char-coal) in 3 repeats. Several growth traits were measured during 5 weeks. Seed culture was also studied in 4 medium including distilled water, solid MS 1/4, soil and moist filter paper. Embryo culture ways were resulted in vigorous and numerous plantlets in shorter time, in comparison with seed germination ways. Finally the best option was vertically culture of embryo in MS 1/4 medium containing 0.5 g/L char-coal. Obviously this method will provide the plant with a very similar condition to growth in natural environment.

Key words: galbanum (*Ferula gummosa* Boiss.), embryo culture, char-coal, plantlet, explant.