DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2011.7435

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۳۸-۲۸ (۱۳۹۰)

بررسی امکان نگهداری درون‌شیشه‌ای ژرم‌پلاسم گیاه باریجه و کالوس‌زایی آن

نجمه هادی*[۱]، رضا امیدبیگی[۲] و احمد معینی[۳]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
پست الکترونیک: n_hadi1984@yahoo.com
۲- استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

چکیده

گیاه باریجه، از گیاهان ارزشمند دارویی- مرتعی بومی کشور است که به دلیل برداشت‌های بی‌رویه و نامناسب از عرصه‌های طبیعی و داشتن مشکل تکثیر در حال انقراض می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که جوانه انتهایی حاصل از گیاهان باریجه را می‌توان در محیط کشت MS حاوی BA (۲mg l^{-1}) در دمای ۲۵ ± ۲ ^0C و تحت دوره نوری ۱۶ ساعت به مدت ۵ ماه و از طریق ٤ زیرکشت به صورت فعال (دارای قابلیت تولید برگ) نگهداری کرد. دمبرگ‌های حاصل از جوانه انتهایی گیاهان مزرعه‌ای کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، ریزنمونه‌های بسیار مستعدی برای کالوس‌زایی بوده و در محیط کشت B5 حاوی NAA ۲ mg l^{-1} BA +۱۰ mg l^{-1} بهترین کالوس‌زایی را از نظر کمی و کیفی داشتند.

واژه‌های کلیدی: باریجه، کشت درون‌شیشه‌ای، حفظ ژرم پلاسم، کالوس‌زایی.

مقدمه

باریجه با نام علمی *Ferula gummosa* Boiss. گیاهی چندساله و مونوکارپ از خانواده چتریان (Apiaceae) است (امیدبیگی، ۱۳۸٦). پراکندگی جغرافیایی باریجه به تعدادی از کشورهای خاورمیانه (افغانستان، ایران، پاکستان، ترکمنستان و ترکیه) محدود می‌شود و نمونه کاملی از گیاه دارویی ایرانیست. باریجه در مناطق کوهستانی با ارتفاع بالا (۱۸۰۰ تا ٦۰۰۰ متر از سطح دریا) با شرایط محیطی خیلی خاص رشد می‌کند، به‌طوری‌که تکثیر طبیعی گیاه محدود می‌شود (Bernard *et al.*, 2007). شیرابه (الئوگم رزین) باریجه دارای ۳۰ – ۵ درصد اسانس، ۷۰ – ۵۰ درصد رزین، ٤۰ – ۲۰ درصد مواد صمغی و ۱۰ – ۱ درصد رطوبت و مواد معدنی می‌باشد (کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران، ۱۳۸۱). روش استخراج اسانس از شیرابه باریجه بر محتوا و ترکیب اسانس حاصل تأثیرگذار می‌باشد. در آزمایشی، روش تقطیر با آب منجر به استخراج اسانس به مقدار ۳۳ درصد با ۱۱ جزء تشکیل‌دهنده و روش شیمیایی با کمک

هگزان منجر به استخراج اسانس به مقدار ۳٦ درصد با ۱۲ جزء تشکیل‌دهنده شد (Omidbaigi *et al.*, 2008). باریجه دارای اثرات نیرودهندگی، ضد تشنج، رفع درد معده، مقوی معده و ترمیم‌کننده زخم‌های سطحی است. در آلمان، سابقاً به‌عنوان قاعده‌آور و رفع بیماری‌های رحمی مصرف داشته است. همچنین، از باریجه نوعی چسب مخصوص جهت چسباندن سنگ‌های قیمتی مانند الماس تهیه می‌گردد که در جواهرسازی مصرف دارد (زرگری، ۱۳٦۷). امروزه باریجه بیشتر به‌عنوان طعم‌دهنده در محصولات غذایی مانند نوشابه‌ها و فرآورده‌های گوشتی و یا معطرکننده و تثبیت‌کننده عطرها در فرآورده‌های آرایشی مورد مصرف قرار می‌گیرد (کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران، ۱۳۸۱).

باریجه از گیاهان ارزشمند بومی ایران است و شیرابه آن از اقلام مهم صادراتی کشور بحساب می‌آید. با توجه به اهمیت گیاه باریجه و موارد بی‌شمار استفاده‌های دارویی- صنعتی از آن و اینکه این گیاه به دلیل برداشت‌های بی‌رویه و نامناسب از عرصه‌های طبیعی کشور در حال انقراض است، اهمیت تکثیر این گیاه مشخص می‌شود (سفیدکن، ۱۳۸۷). بیوتکنولوژی گیاهی، راه‌های جدید تکثیر گیاهان با سرعت بالای تولید را پیشنهاد می‌کند (Bernard *et al.*, 2007). در مواردی که تکثیر گیاه به کمک بذر ممکن نباشد می‌توان از روش‌های نوین تکثیر گیاهان، ازجمله روش‌های درون‌شیشه‌ای کشت بافت، استفاده کرد که این روش‌ها می‌توانند تولید انبوه و یکنواخت گیاهان را در مدت زمان کوتاه و صرف هزینه مناسب مقدور سازند. همچنین، می‌توان برای حفظ ذخایر ژنتیکی با ارزش و اهداف دیگری چون تولید متابولیت‌های ثانویه و انتقال ژن و اهداف اصلاحی از روش‌های درون‌شیشه‌ای استفاده کرد.

براساس منابع موجود، تحقیقات انگشت‌شماری بر روی کشت بافت باریجه انجام شده است. سرآبادانی تفرشی و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کرده‌اند که، ریزنمونه‌های ریشه (حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای جنین زیگوتیکی) و جنین زیگوتیکی برش یافته گیاه باریجه در محیط کشت ¼MS (نمک‌های ماکرو و میکرو) حاوی ۲ mgl^{-1} BAP +۱۰ mgl^{-1} NAA بهترین نتیجه را برای کالوس‌زایی داشته‌اند.

هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان نگهداری درون‌شیشه‌ای ژرم‌پلاسم باریجه و کالوس‌زایی در آن بود.

مواد و روشها

۱- کشت درون‌شیشه‌ای جوانه انتهایی گیاه باریجه

در تاریخ بیست و نهم فروردین‌ماه سال ۱۳۸۸ دو گیاه باریجه از باغ تحقیقاتی شرکت دارویی زردبند واقع در شمال شرق تهران تهیه گردیدند. گیاهان با حجم زیادی از ریشه‌ها از مزرعه خارج شده و به داخل خاک مرطوب و گلدان منتقل شده و تا زمان انجام آزمایش در یک محل سایه و در فضای باز نگهداری شدند. در تاریخ سی‌ام فروردین‌ماه یکی از گیاهان (با نام گیاه اول) وارد مسیر آزمایش شد و گیاه دیگر (با نام گیاه دوم) از خاک بیرون آورده شد و بعد از شستن ریشه‌ها با آب، ساقه غده‌ای و برگ‌ها به همراه کمی از ریشه‌ها در داخل پارچه نخی مرطوب و سپس داخل کیسه فریزر (برای جلوگیری از چروکیده شدن برگ‌ها و از دست رفتن آب) قرار گرفت و در یخچال (۵ – ٤ ^0C) نگهداری شد. در این تاریخ، تمام

برگ‌های گیاه اول به آرامی جدا شدند و جوانه انتهایی گیاه تهیه شد. سپس، جوانه انتهایی حاوی فلس‌های برگی به همراه کمی از ساقه غده‌ای (شکل ۱)، جهت ضدعفونی شدن حدود ۵ دقیقه با آب معمولی و چند قطره مایع ظرفشویی شستشو داده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفت و سپس در داخل دستگاه لامینارایرفلو به مدت ۲۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ ضدعفونی و سه بار به‌ترتیب به مدت‌های ۲، ۵ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر سترون آبکشی شد. بعد از آبکشی، ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۱۵ ثانیه صورت گرفت و بلافاصله بعد از آبکشی سریع با آب مقطر سترون، دوباره ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و سه بار آبکشی گردید.

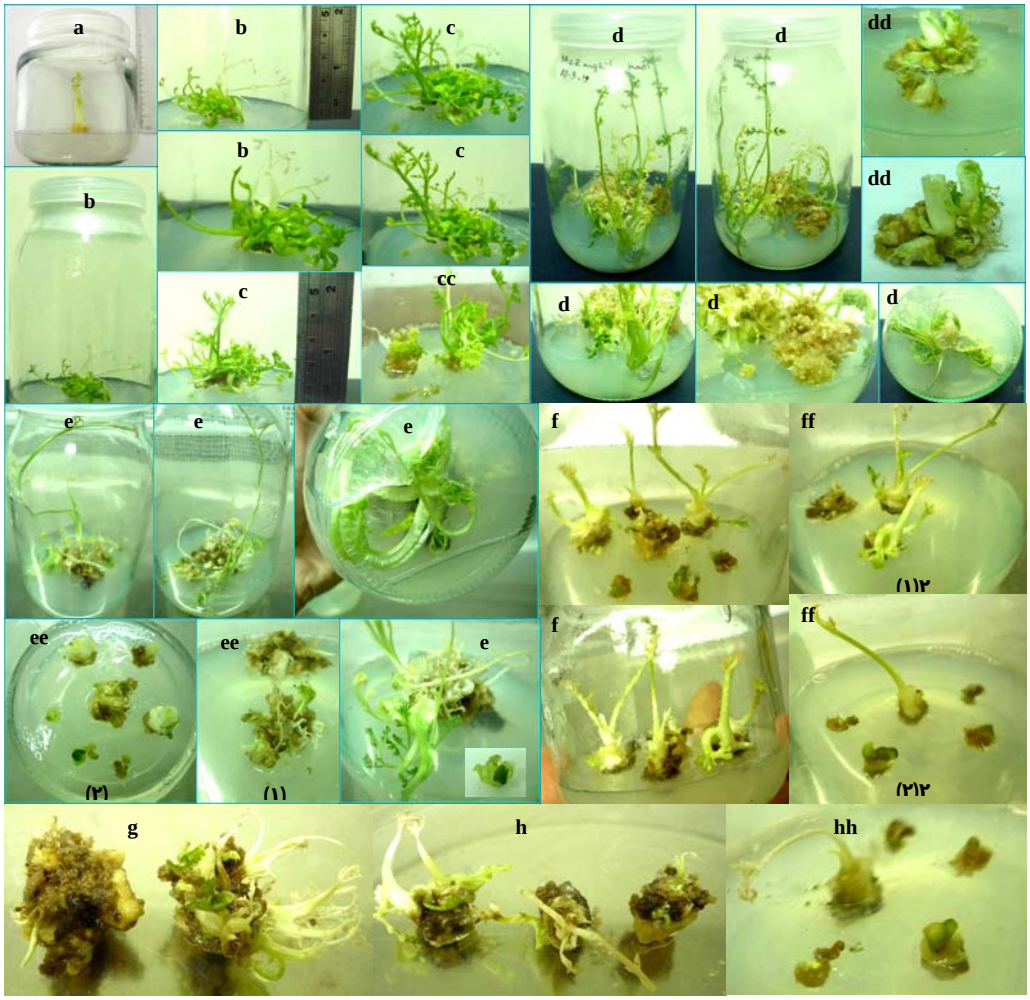
شکل۱- جوانه انتهایی تهیه شده از گیاه باریجه (جوانه مرکب مرکزی)

جوانه انتهایی بعد از ضدعفونی، در محیط کشت MS حاوی mgl^{-1} ۱ از BA داخل شیشه مربایی (۶cm × ۹/۵) به حجم ۲۹۰ml و حاوی ۵۰ml محیط کشت، با درب پلاستیکی شفاف کشت شد و بعد از درزگیری درب شیشه با یک لایه پارافیلم، داخل اتاق رشد با دمای ^0C ۲ ± ۲۵ و دوره نوری ۱۶ ساعته قرار داده شد. برای کشت، فلس‌های روی جوانه انتهایی و همچنین بخش‌های زیری آن تا حد امکان حذف شد. دو هفته بعد، جوانه کشت شده به شیشه مربای بزرگتر (۶ cm × ۱۵/۵) به حجم ۶۸۰ml و حاوی ۱۰۰ml محیط کشت، در محیط کشت MS حاوی mgl^{-1} ۲ از BA منتقل شد. در این تاریخ، جوانه انتهایی گیاه دوم نیز مطابق گیاه اول در محیط کشت MS حاوی mgl^{-1} ۲ از BA در داخل شیشه مربایی کوچک (۶cm × ۹/۵) کشت شد و در همان شرایط محیطی مشابه گیاه اول قرار گرفت.

۲- بررسی کالوس‌زایی باریجه با استفاده از دمبرگ‌های گیاهچه درون‌شیشه‌ای

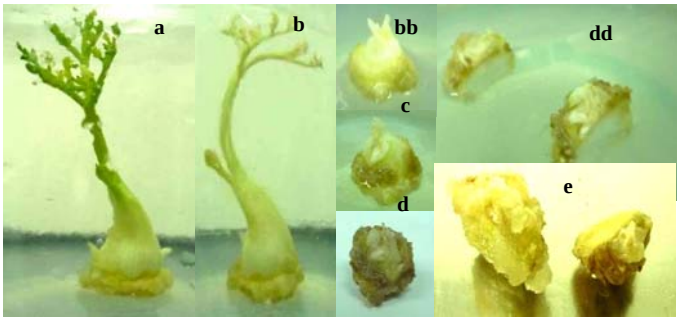
برای بررسی کالوس‌زایی، اثر سه ریزنمونه دمبرگ، شامل قطعات دمبرگ به طول ۱ و ۲cm و نیز قطعات دمبرگ به طول ۲cm که از وسط به دو نیم شده بودند، بررسی شدند. لازم به ذکر است که دمبرگ‌ها از برگ‌های حاصل از کشت جوانه انتهایی باریجه در شرایط درون‌شیشه‌ای تهیه شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول، نوع محیط کشت بود که در دو سطح (MS و B5) مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور دوم، تیمار هورمونی محیط کشت بود که در شش سطح (۱ **TH1:** 2, 4-D۲ +Kin ۱، ۱ **TH2:** 2, 4-D ٤ +Kin ۱۰ +NAA ۲ BA، ۱ **TH3:** 2, 4-D ۱ +NAA ۱ +Kin ۱، ۱ **TH4:** 2, 4-D ٤ +NAA ٤ +Kin ۱، **TH5:** 2, 4-D ۱ +Kin ۲ +NAA ۲ **TH6:** 2, 4-D ٤ +NAA ٤ +Kin ۱ (mgl^{-1}) مورد بررسی قرار گرفت و فاکتور سوم، وضعیت نوری کشت‌ها بود که در دو سطح (تاریکی مطلق و دوره نوری ۱٦ ساعته= ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) مورد بررسی قرار گرفت. هر تیمار آزمایشی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت (پتری‌دیش پلاستیکی

یکبار مصرف به قطر ٦ cm محتوی ۱۷ml محیط کشت و شش ریزنمونه یک تکرار را تشکیل می‌داد). در هر پتری‌دیش دو ریزنمونه دمبرگ از انواع ریزنمونه‌هایی که در بالا به آن اشاره شد کشت می‌شدند. کشت‌ها در اتاق رشد در دمای ^{0}C ۲ ± ۲۵ قرار گرفتند. صفات درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا و میانگین حجم کالوس تولید شده یک ماه بعد از زیرکشت اول در همان شرایط مشابه قبل، اندازه‌گیری شدند. تجزیه آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها (آزمون LSD) توسط نرم‌افزارهای آماری Minitab و MSTAT.C انجام شد.



شکل ۲- جوانه انتهایی کشت شده گیاه اول باریجه

a: یک هفته بعد از کشت؛ b: پنج هفته بعد از کشت؛ c و cc: هفت هفته بعد از کشت، به‌ترتیب قبل و بعد از زیرکشت؛ d و dd: ۱۱ هفته بعد از کشت، به‌ترتیب قبل و بعد از زیرکشت؛ e و ee: ۱۵ هفته بعد از کشت، به‌ترتیب قبل و بعد از زیرکشت (تبدیل به دو قسمت (۱) و (۲))؛ f و ff: ۱۷ هفته بعد از کشت، به‌ترتیب قبل (مربوط به قسمت (۲)) و بعد از زیرکشت (تبدیل به دو قسمت ۲(۱) و ۲(۲))؛ g: ۲۰ هفته بعد از کشت، قبل از زیرکشت (مربوط به قسمت (۱))؛ h و hh: ۲۰ هفته بعد از کشت، قبل از زیرکشت (به‌ترتیب مربوط به قسمت ۲(۱) و ۲(۲)).



شکل ۳- جوانه انتهایی کشت شده گیاه دوم باریجه

a: سه هفته بعد از کشت؛ b و bb: پنج هفته بعد از کشت، به‌ترتیب قبل و بعد از زیرکشت؛ c: نه هفته بعد از کشت؛ d و dd: ۱۳ هفته بعد از کشت، به‌ترتیب قبل و بعد از زیرکشت، e: ۱۸ هفته بعد از کشت

در ادامه، کالوس‌های حاصل از سه تیمار هورمونی اول ذکر شده در بالا، در ماه سوم، در همان محیط کشت قبلی در شیشه مربایی کوچک و در تیمار هورمونی $NAA\ mgl^{-}$ $mgl^{-1}\ BA\ +۱۰^{1}$ ۲ و در شرایط نوری مشابه قبل زیرکشت شدند تا نحوه عکس‌العمل کالوس‌ها از نظر رشد مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج

۱- کشت درون‌شیشه‌ای جوانه انتهایی گیاه باریجه

نتایج نشان داد که گیاه باریجه را می‌توان در شرایط درون‌شیشه‌ای در شرایط آزمایشی به کار رفته در این تحقیق به مدت تقریباً پنج ماه به صورت فعال (دارای قابلیت تولید برگ) نگهداری کرد و از برگ‌های تولید شده (دمبرگ‌ها) به صورت درون‌شیشه‌ای به‌عنوان ریزنمونه مناسب در کشت بافت به منظور تولید کالوس استفاده کرد. شکل‌های ۲ و ۳، روند رشد جوانه انتهایی دو گیاه باریجه مورد مطالعه در کشت درون‌شیشه‌ای را نشان می‌دهند.

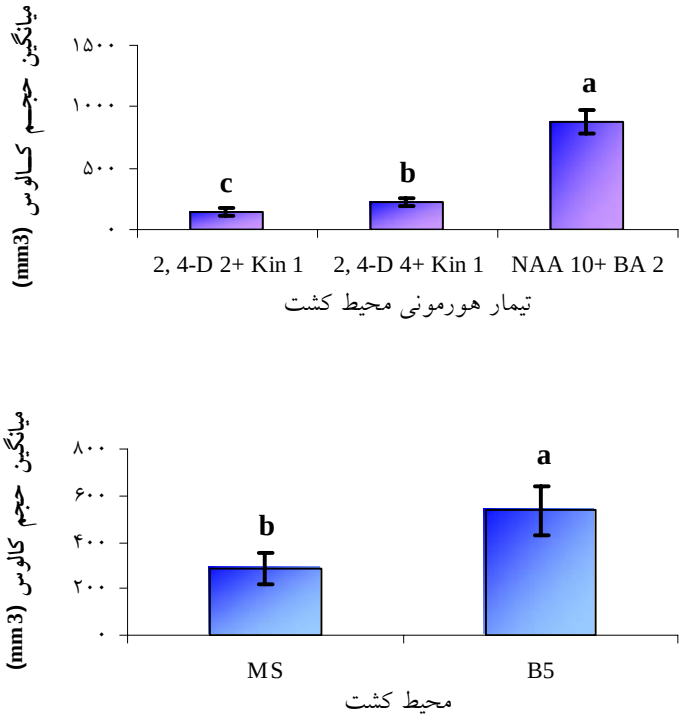
۲- بررسی کالوس‌زایی باریجه با استفاده از دمبرگ‌های گیاهچه درون‌شیشه‌ای

نتایج تجزیه داده‌ها به منظور بررسی اثر نوع محیط کشت، نوع تیمار هورمونی و وضعیت نوری محل قرارگیری کشت‌ها بر کالوس‌زایی باریجه با استفاده از ریزنمونه دمبرگ در جدول ۱ و نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها در شکل ٤ نشان داده‌شده است. همچنین، کالوس‌های تولید شده در تیمارهای مختلف را در شکل‌های ۵ و ٦ مشاهده می‌کنید. نتایج نشان داد که قطعات دمبرگی که از ناحیه طول به دو نیم شده‌اند، توانایی تولید کالوس بیشتری دارند. شش تیمار هورمونی مورد بررسی منجر به صد درصد کالوس‌زایی شدند. لذا، صفت درصد ریزنمونه‌های کالوس‌زا مورد تجزیه آماری قرار نگرفت. همچنین، به دلیل عدم کیفیت مناسب کالوس‌های بدست‌آمده از تیمارهای هورمونی TH4، TH5 و TH6 (کالوس‌های آبکی، شل و شفاف)، بعد از یک بار زیرکشت (دو ماه بعد از کشت اولیه)، آنها از مسیر آزمایش خارج شدند و تجزیه‌ی داده‌ها فقط روی سه تیمار هورمونی دیگر و در رابطه با صفت حجم کالوس تولید شده انجام گردید.

جدول۱ – تأثیر محیط کشت (M)، تیمار هورمونی (T) و وضعیت نوری محل قرارگیری کشت‌ها (L) بر کالوس‌زایی باریجه با استفاده از ریزنمونه دمبرگ گیاهچه درون‌شیشه‌ای

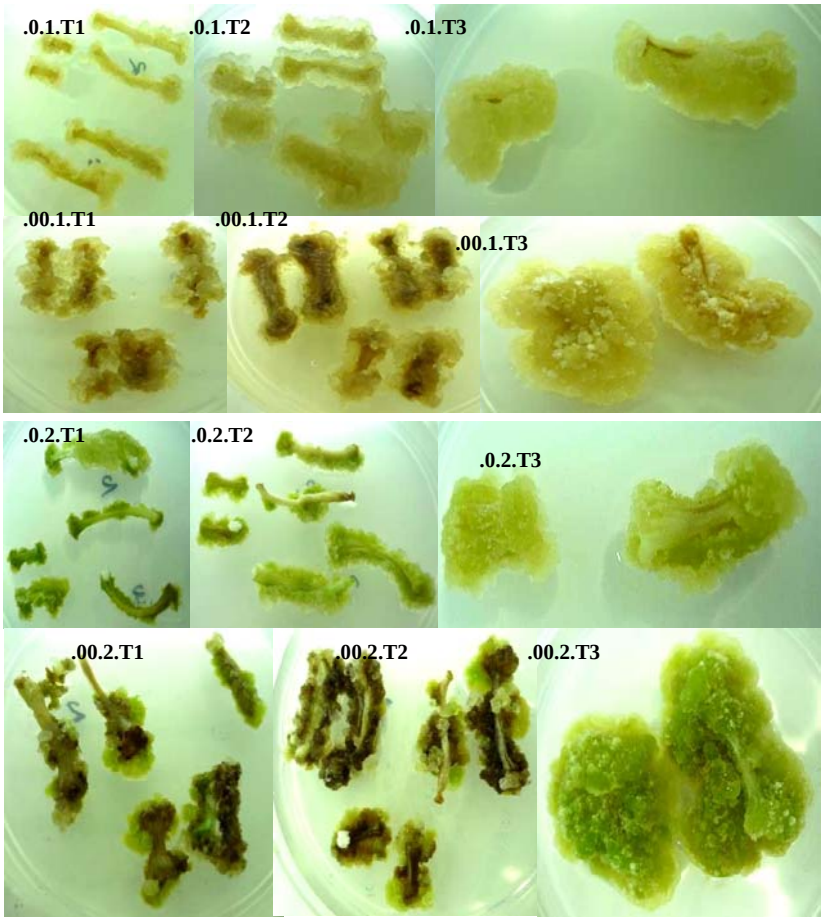
منابع تغییرات	درجه آزادی	حجم کالوس (mm^3)
		میانگین مربعات
M	۱	۶/۰۹**
T	۲	۱۰/۵۷**
L	۱	۰/۰۵ns
M×T	۲	۰/۴۱ns
M×L	۱	۰/۰۶ns
T×L	۲	۰/۲۱ns
M×T×L	۲	۰/۰۱ns
خطای آزمایشی	۲۴	۰/۱۹
کل	۳۵	

ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار، **: تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪



شکل٤ – مقایسه میانگین (± خطای استاندارد) تأثیر (الف) تیمار هورمونی محیط کشت ($mg\ l^{-1}$) و (ب) نوع محیط کشت بر کالوس‌زایی باریجه با استفاده از ریزنمونه دمبرگ گیاهچه درون‌شیشه‌ای

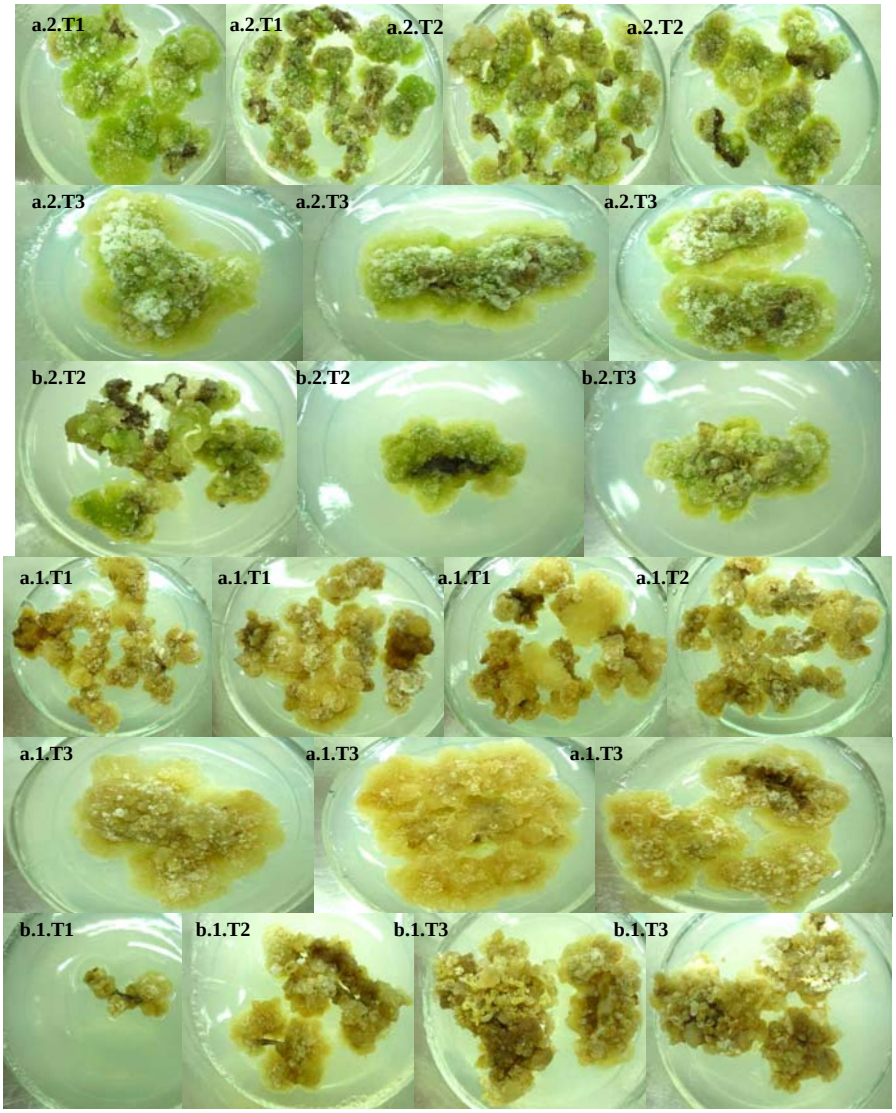
(ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند در یک گروه آماری قرار می‌گیرند).



شکل ۵- کالوس‌زایی باریجه با استفاده از ریزنمونه دمبرگ گیاهچه درون‌شیشه‌ای

محیط کشت B5 (0: یک ماه بعد از کشت و 00: دو ماه بعد از کشت یا یک ماه بعد از زیرکشت اول)، ۱: قرارگرفته تحت تاریکی و ۲: قرارگرفته تحت دوره نوری ۱٦ ساعته، ($mg\ l^{-1}$) T1: TH2، T2: TH1 و T3: TH3

اثر فاکتورهای نوع محیط کشت و تیمار هورمونی در سطح ۱ درصد، در مورد صفت حجم کالوس، معنی‌دار شد. محیط کشت B5 و تیمار هورمونی TH3 منجر به بیشترین حجم کالوس تولیدی شده‌اند. افزایش غلظت هورمون 2, 4- D از ۲ به $٤\ mgl^{-1}$ در ترکیب با $١Kin\ mgl^{-1}$ منجر به افزایش حجم کالوس تولیدی شده است.



شکل ٦- کالوس‌زایی باریجه با استفاده از ریزنمونه دمبرگ گیاهچه درون‌شیشه‌ای

محیط کشت a: B5 و b: MS حاوی ترکیب هورمونی (mg l^{-1}) ۲ BA + ۱۰ NAA (سه ماه بعد از کشت اولیه یا یک ماه بعد از زیرکشت دوم)؛ ۱: قرارگرفته تحت تاریکی و۲: قرارگرفته تحت دوره نوری ١٦ ساعته؛ تیمار هورمونی قبل از زیرکشت آنها: T1: TH2، T2: TH1 و T3: TH3

بحث

۱- کشت درون‌شیشه‌ای جوانه انتهایی گیاه باریجه

نتایج، تأثیر منفی دو هفته قرارگیری گیاه در یخچال را روی کشت جوانه انتهایی باریجه نشان داد، بدین صورت که جوانه گیاه دوم (دو هفته سرمادهی شده در یخچال) نتوانست مشابه جوانه گیاه اول (سرمادهی نشده) در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای فعال باشد (عدم قابلیت تولید برگ) و خیلی زود از مسیر آزمایش خارج شد. اثر دو هفته قرارگیری گیاه در یخچال یا سرما می‌تواند به دلیل القای خواب یا رکود در جوانه اصلی (فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌ها و غیره) باشد که در این زمینه مطالعات بیشتر پیشنهاد می‌گردد.

۲- بررسی کالوس‌زایی باریجه با استفاده از دمبرگ‌های گیاهچه درون‌شیشه‌ای

براساس نتایج بدست‌آمده، ترکیب هورمون‌های 2, 4- D و Kin به منظور کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های دمبرگ گیاه باریجه مناسب نیستند و اضافه کردن هورمون NAA به ترکیب آنها موجب شدت یافتن اثر نامطلوب بر روی کالوس‌زایی می‌شود. به طور کلی ریزنمونه دمبرگ گیاه درون‌شیشه‌ای باریجه در محیط کشت حاوی سایتوکینین BA و اکسین NAA نسبت به ترکیب Kin و 2, 4-D، واکنش بهتری از نظر تولید کالوس با کمیت و کیفیت مطلوب داشته است. کالوس‌هایی که در تیمار هورمونی ۲ mgl^{-1} BA +۱۰ mgl^{-1} NAA تولید شدند (در هر دو محیط کشت MS و B5) از نوع کالوس‌های فشرده (سفت و نسبتا دانه‌ای) و با ظاهری مطلوب بودند.

اثر فاکتور وضعیت نوری محل قرارگیری کشت‌ها معنی‌دار نشد ولی لازم به ذکر است که کالوس‌هایی که در وضعیت تاریکی تولید شدند، زرد رنگ (قهوه‌ای کمرنگ) بودند، درحالی‌که کالوس‌هایی که در وضعیت دوره نوری ۱٦ ساعته تولید شدند، سبز رنگ و گاهی همراه با سطوح برفکی سفید رنگ بودند که این موضوع می‌تواند در استفاده‌های بعدی از کالوس به منظور باززایی، جنین‌زایی سوماتیکی و غیره تأثیرگذار باشد. به عنوان مثال، گزارش شده است که کالوس‌های فشرده و سبز به‌عنوان بهترین کاندید برای القای باززایی شاخه در مورد گونه‌های گل استکانی (*Passiflora*) هستند (Guzzo *et al.*, 2004).

بررسی وضعیت کالوس‌های حاصل سه ماه بعد از کشت اولیه (زیرکشت دوم در محیط کشت مشابه و در تیمار هورمونی ۲ mgl^{-1} BA + ۱۰ mgl^{-1} NAA) نشان داد که کالوس‌ها در تیمار هورمونی مورد نظر رشد مطلوبی داشته‌اند.

در مورد گیاه باریجه در خصوص کشت درون‌شیشه‌ای با هدف تکثیر و حفظ گیاه در کشور کار زیادی انجام نشده است. به چند کار محدودی که صورت گرفته در جای خود اشاره شده ولی به هر حال باید گفت که نتایج به دست آمده از این تحقیق در جایگاه خود منحصر به فرد بود و لذا به سبب نوع نتایج، قیاس با کار سایر محققین امکان‌پذیر نمی‌باشد.

تولید کالوس از ریزنمونه گیاهی در کشت درون‌شیشه‌ای به فاکتورهای مختلفی بستگی دارد. همچنین، به منظور هدفمندتر بودن تولید کالوس با قابلیت خاص، مثلاً قابلیت باززایی یا جنین‌زایی و یا استفاده در کشت‌های سوسپانسیون سلولی و غیره، فاکتورهای مختلفی دخیل هستند که در مورد هر گونه گیاهی هر یک جداگانه مورد بررسی قرار می‌گیرند و گزارش‌های مختلف در رابطه با فاکتورهای مختلف و گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد. ازجمله این فاکتورها نوع هورمون یا ترکیب هورمونی مورد استفاده است. ریزنمونه هر گونه گیاهی در کشت درون‌شیشه‌ای به منظور تولید کالوس ترکیب هورمونی خاصی را نیاز دارد. بعضی گونه‌ها فقط با هورمون سایتوکینین یا اکسین تولید کالوس می‌کنند و بعضی دیگر به ترکیب هر دو نوع هورمون نیاز دارند. همچنین برای تولید کالوس با خصوصیت یا قابلیت خاص (قابلیت باززایی یا جنین‌زایی در تولید جنین‌های سوماتیک و غیره)

نوع هورمون یا ترکیب هورمونی می‌تواند متفاوت باشد. ازجمله در مورد گیاه باریجه گزارش شده که محورهای جنینی زیگوتیکی در محیط کشت MS با ویتامین‌های

گامبورگ و mgl^{-1} ۲۰۰ کازئین هیدرولیزات به همراه mgl^{-1} BAP ۱ در دمای ^0C ۲۵ و دوره نوری ۱۶ ساعته تشکیل کالوس دادند و بعد از سه ماه از کشت، جنین‌زایی سوماتیک غیرمستقیم فقط از طریق تیمار با mgl^{-1} NAA ۱ در ترکیب با کاهش دمای رشد با یک رژیم دمایی ویژه (18^0C طی ۱۶ ساعت روشنایی و ^0C ۸ طی ۸ ساعت تاریکی) القاء شد (Bernard *et al.*, 2007). اما با توجه به مطلوب بودن ترکیب هورمونی BA و NAA برای تولید کالوس از ریزنمونه منحصر به فرد دمبرگ گیاهچه تولید شده در شرایط درون‌شیشه‌ای در گیاه باریجه در این تحقیق، می‌توان به گزارش‌هایی در خصوص اثر مثبت ترکیب هورمونی مورد نظر اشاره داشت. ازجمله گزارش‌ها در خصوص تأثیر مثبت سایتوکینین BA یا BAP به همراه اکسین NAA بر کالوس‌زایی، می‌توان به گزارش سرآبادانی تفرشی و همکاران (۱۳۸۷) در گیاه باریجه، و Odutayo و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه نخود گاوی (*Vigna unguiculata*) اشاره نمود.

منابع مورد استفاده

- امیدبیگی، ر.، ۱۳۸۶. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. چاپ چهارم، ج ۲. انتشارات آستان قدس رضوی، ٤٣٨ صفحه.
- زرگری، ع.، ۱۳٦۷. گیاهان دارویی. چاپ چهارم، ج ۲. انتشارات دانشگاه تهران، ۹٤۲ صفحه.
- سرآبادانی تفرشی، ر.، امیدی، م.، بی‌همتا، م. ر. و دوازده‌امامی، س. ۱۳۸۷. بررسی کشت جنین درون‌شیشه و تأثیر محیط کشت و سطوح مختلف هورمونی و ریزنمونه در کالزایی و ساقه‌زایی گیاه باریجه. فصلنامه گیاهان دارویی، ۲۷: ۸۱-۷۱.
- سفیدکن، ف.، ۱۳۸۷. برنامه راهبردی تحقیقات گیاهان دارویی. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان ترویج، آموزش و تحقیقات کشاورزی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ٤٠ صفحه.
- کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران، ۱۳۸۱. فارماکوپه گیاهی ایران. چاپ اول، ج ۱. انتشارات وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی؛ معاونت غذا و دارو، ۳۹٦ صفحه.
- Bernard, F., Shaker Bazarnov, H., Javadi Khatab, L., Shafiei Darabi, A.. and Sheidai, M., 2007. *Ferula gummosa* Boiss. Embryogenic culture and karyological changes. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1977-1983.
- Guzzo, F., Ceoldo, S., Andreetta, F. and Levi, M., 2004. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. Science Agriculture (Piracicaba, Braz.), 61: 108-113.
- Odutayo, O.I., Akinrimisi, F.B., Ogunbosoye, I. and Oso, R.T., 2005. Multiple shoot induction from embryo derived callus cultures of cowpea (*Vigna unguiculata* I.) Walp. African Journal of Biotechnology, 4: 1214-1216
- Omidbaigi R., Kabudan, M. and Rauffard, F., 2008. Chemical composition of *Ferula gumosa* volatile oil extracted by hydro-distillation and hexane. Euro Cosmetics, 16:24-26.

In vitro conservation of *Ferula gummosa* germplasm and its callus induction

N. Hadi[*1], R. Omidbaigi[2] and A. Moeinei[3]

1[*]- [*]- Corresponding author, M.Sc., College of Agriculture, Tarbiat Modares University, I.R.Iran. Email: n_hadi1984@yahoo.com
2- Prof., College of Agriculture, Tarbiat Modares University, I.R.Iran.
3- Assoc. Prof., College of Agriculture, Tarbiat Modares University, I.R.Iran.

Received: 26.05.2010 Accepted: 05.03.2011

Abstract

Galbanum (*Ferula gummosa*) is one of the native valuable pasturage-medicinal plants of Iran that is extincting because of irregular and unsuitable harvesting from natural habitats and its propagation problems. Results showed possible conservation of galbanum germplasm under *in vitro* culture conditions on MS medium supplemented with 2 mg l^{-1} BA at 25 ± 2 ^{0}C under a 16-h photoperiod for about 5 months. Petiols obtained of cultured *in vivo* plants under *in vitro* conditions, are capable explants for callus production and they produced callus with high quality and quantity on B5 medium supplemented with 2 mg l^{-1} BA and 10 mg l^{-1} NAA.

Key words: *Ferula gummosa*, *In vitro* culture, Germplasm conservation, Callus production.