نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، ص. ۶۵۴-۶۴۱
شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No. 4, Winter 2019, p. 641-654
ISSN: 2008 - 4730

دستیابی به فیتواستروژن فروتینین موجود در ریشه گیاه کما (*Ferula ovina*) در شرایط درون شیشه‌ای با تأکید بر حفظ ذخایر ژرم پلاسم

هدی زارع میرک آباد[۱]- محمد فارسی[۲*]- سعید ملک زاده شفارودی[۳]- مهرداد ایرانشاهی[۴]- عبدالرضا باقری[۵]- نسرین مشتاقی[۶]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۱

چکیده

ایران تنها رویشگاه طبیعی گیاه کما (*Ferula ovina*) است. ریشه‌های این گیاه دارای فروتینین، یکی از قوی‌ترین و گران‌قیمت‌ترین فیتواستروژن‌ها، با پتانسیل درمان پوکی استخوان است. با توجه به خواب عمیق بذر کما، عدم امکان تولید فروتینین با روش‌های شیمیایی و نیاز به تخریب منابع طبیعی به دلیل وجود فروتینین در ریشه کما، دستیابی به فروتینین در شرایط آزمایشگاهی ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است. لذا پژوهش حاضر با هدف کاهش ریشه‌کنی گیاه در طبیعت و دستیابی به فروتینین در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. به منظور نگهداری گیاه در شرایط درون شیشه‌ای، ۲۴ محیط کشت باززایی غیرمستقیم و ۱۱ محیط کشت ریشه‌زایی با استفاده از طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمون TLC نمونه‌های کشت بافتی در جهت دسترسی به فروتینین بدون آسیب رساندن به ذخایر ژرم پلاسم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی نشان داد، کالوس‌های سبز فشرده بزرگ در محیط کشت MS دارای ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر، شاخه های بلند و شاداب در محیط کشت MS با ترکیب ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر MS kin و ریشه در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت ½MS با ترکیب ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با اختلاف معنی‌دار نسبت به با سایر محیط‌های‌کشت، تولید می‌شود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، امکان تولید و نگهداری درون شیشه‌ای گیاه کما از طریق کشت بافت وجود دارد. همچنین با تأیید وجود فروتینین در نمونه‌های کشت بافتی، تولید انبوه این ماده از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و با استفاده از بیوراکتور امکان‌پذیر است. نگهداری *F. ovina* در شرایط درون شیشه‌ای، امکان دستیابی به گیاه کما بدون محدودیت‌های فصل رشد و رویشگاه و در نتیجه دسترسی به فروتینین موجود در ریشه آن با حفظ ذخایر ژرم پلاسم گیاه را فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: حفاظت ذخایر ژرم پلاسم، فروتینین، کروماتوگرافی لایه نازک، کشت بافت، *Ferula ovina*

مقدمه

گیاه کما (*Ferula ovina*) یکی از گیاهان باارزش اندمیک ایران بوده و متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) است. پراکنش این گیاه در اغلب نقاط ایران از جمله استان اصفهان، چهار محال و بختیاری، خراسان رضوی و شمالی و برخی استان‌های دیگر گزارش شده است. این گیاه از جمله گیاهان خانواده‌ی چتریان است که ارتفاع آن به ۱ تا ۱/۵ متر می‌رسد. برگ‌ها دمبرگ غلافدار دارند و پهنک برگ، بزرگ و دارای بریدگی‌های نسبتاً عمیق است. برگ‌ها، سبز تیره و گل‌های آن به رنگ زرد است (۴). با توجه به برداشت بی‌رویه و بهره برداری بیش از حد، پراکنش آن در ایران در معرض خطر قرار گرفته است (۲).

مطالعه آت اکولوژی گیاه کما در استان تهران نشان داد این گونه گیاهی در دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰ تا ۳۲۰۰ متر از سطح دریا رویش دارد و به لحاظ درصد شیب و جهت شیب تقریباً محدودیتی ندارد. بارندگی در رویشگاه‌های این گونه بیش از ۴۰۰ میلی‌متر و میانگین دمای سالانه ۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و در خاک‌های با بافت لومی می روید. هدایت الکتریکی خاک رویشگاه کمتر از یک دسی‌زیمنس بر متر و اسیدیته آن در حدود ۷ تا ۷/۵ می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه

۱، ۲، ۳، ۵ و ۶- به‌ترتیب دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، استاد، دانشیار، استاد و دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: farsi@um.ac.ir)
۴- استاد گروه فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

نشان‌دهنده سه عامل مهم تعیین کننده نوع پراکنش کما یعنی حاشیه گرایی، تخصص‌گرایی و تحمل‌پذیری در منطقه‌ی مطالعاتی می‌باشد (۴).

بذر *F. ovina* خواب مرفوفیزیولوژیکی پیچیده عمیقی دارد. در شرایط طبیعی، بذرها طی زمستان در خاک سرد جوانه می‌زنند و در بهار اندام هوایی (شاخه‌ها) جوانه می‌زند (۷). لذا امکان تکثیر و باززایی طبیعی این گونه از طریق بذر بسیار ضعیف است. نتایج مطالعات انجام شده بر روی عوامل مؤثر در شکست خواب بذرهای کما، نشان می‌دهد تیمار بذور با پیش سرمادهی مرطوب به مدت ۶-۴ هفته و به دنبال آن غوطه وری در محلول GA3 جهت القاء جوانه‌زنی بذور و بهبود شاخصه‌های رشد دانهال‌های حاصل مؤثر می‌باشد (۱). رهنما و توکل افشاری (۱۷) در مطالعه خواب بذر یکی از گونه‌های نزدیک به کما (*F. communis*)، علاوه بر اشاره به وجود خواب عمیق درون‌زا و برون‌زا در بذور این گیاه، استفاده همزمان از پیش سرمادهی و جیبرلین را در شکست خواب بذر پیشنهاد نمودند.

گیاه *F.*ovina یکی از ۳۰ گونه *Ferula* در ایران است (۱۳). در تمام گونه‌های *Ferula* بخش زیادی از متابولیت‌های ثانویه در ریشه ذخیره می‌شوند. تنوع متابولیکی در گیاه کما (*F. ovina*) بر خلاف سایر گونه‌های جنس *Ferula* مانند آنغوزه (*F. assafoetida*) و باریجه (*F. gummosa*) زیاد نیست و محدود به سه یا چهار ترکیب ترپنوئیدی از جمله استایلوزین، فروتینین و شیمگین می‌شود. نکته جالب توجه وجود مقادیر زیاد فروتینین، به عنوان قوی‌ترین فیتواستروژن طبیعی، در این گیاه است که جنبه‌های فارماکولوژیکی این گونه از *Ferula* را بالا می‌برد. مقدار محتوای فروتینین این گیاه در مقایسه با بسیاری از گیاهان این جنس بیشتر می‌باشد. این در حالی است که در گونه‌های دیگر مخلوطی از سزکویی ترپن کومارین ها، ترکیبات گوگرددار، متابولیت‌های گلیکوزیله و سزکویی ترپن لاکتون‌ها گزارش شده است (۱۳). لازم به ذکر است وجود استایلوزین و شیمگین در اندام هوایی *F. ovina* نیز گزارش شده است (۱۰). تنها راه دستیابی به فروتینین (جاشکنادیول پی هیدروکسی بنزوات)[1]، ریشه برخی ازگیاهان جنس *Ferula* مانند *F. communis* (۳) و *F. hermonis* (۲۰) و *F. ovina* (۱۲) است. مطالعات زیادی در زمینه نقش فروتینین در درمان پوکی استخوان (۶، ۸، ۹، ۱۶ و ۱۹) صورت گرفته است.

استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی یکی از راهکارهای بیوتکنولوژی در زمینه حفاظت از گیاهان دارویی به شمار می‌رود. ریزازدیادی با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف مانند برگ، دمبرگ، ساقه، ریشه و قسمت‌های زایشی گیاه و کشت آنها بر روی محیط‌کشت‌های مصنوعی، در شرایط کنترل شده درون شیشه‌ای امکان تکثیر و باززایی گیاهان دارویی را بدون محدودیت زمانی فراهم می‌آورد. با توجه به این که زیستگاه‌های طبیعی بسیاری از گونه‌های دارویی به دلیل بهره‌برداری انسان‌ها در حال فرسایش و نابودی است. در بسیاری از کشورهای دنیا هیچ گونه قانونی در مورد کنترل برداشت گیاهان دارویی وجود ندارد، به طوری‌که در برخی از کشورها ۹۰٪ گیاهان دارویی از طریق برداشت از رویشگاه طبیعی تأمین می‌شوند. از طرفی تکثیر بسیاری از گونه‌های دارویی در خطر انقراض طولانی بوده و نرخ تجدید رویشگاه آنها بسیار کمتر از سرعت برداشت آنها از طبیعت است (۱۸). همچنین با توجه به این که امکان تولید انبوه و سریع متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های شیمیایی بسیار مشکل و یا غیرممکن است. استفاده از راهکارهای بیوتکنولوژی مانند کشت بافت می‌تواند در افزایش تولید آنها بدون آسیب رساندن به ذخایر ژرم پلاسم مؤثر باشد (۱۵).

تاکنون تولید برخی از گیاهان جنس *Ferula* مانند باریجه از طریق کشت بافت مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال، برنارد و همکاران (۵)، در بررسی جنین‌زایی سوماتیکی باریجه با استفاده از نمک‌های محیط‌کشت MS (۱۴)، ویتامین‌های محیط‌کشت B5، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیدرولیزات کازئین و ۳ درصد (v/w) ساکارز در pH=۵/۸ به عنوان محیط پایه و افزودن ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت جامد شده با آگار ۰/۸٪ محیط‌کشت کالوس دهی را آماده نمودند و بعد از سه ماه واکشت کالوس‌ها در محیط مشابه، کالوس‌ها را به محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA جنین زایی سوماتیکی را در کالوس‌ها القا کردند و در نهایت امکان باززایی دانهال‌های سوماتیک از طریق جنین‌زایی مستقیم از زیگوت فراهم نشد. هادی و همکاران (۱۱)، قابلیت نگهداری درون شیشه‌ای گیاه باریجه را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که جوانه انتهایی حاصل از گیاهان باریجه را می‌توان در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت دوره نوری ۱۶ ساعت به مدت ۵ ماه و از طریق ۴ زیرکشت به صورت فعال (دارای قابلیت تولید برگ) نگهداری نمود. دمبرگ‌های حاصل از جوانه انتهایی گیاهان کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، ریزنمونه‌های بسیار مستعدی برای کالوس‌زایی بوده و در محیط کشت B5 حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین کالوس‌زایی را از نظر کمی و کیفی داشتند.

با توجه به این که فروتینین در ریشه گیاه تولید می‌شود، تنها راه بهره‌مندی از مزایای این فیتواستروژن با ارزش، ریشه‌کنی برخی از گیاهان جنس *Ferula* است. رویش یکی از این گیاهان در کشور ایران به عنوان منبع دارویی با ارزش از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اما استفاده از گیاه طبیعی موجب نابودی آن در زیستگاه طبیعی می‌شود که می‌تواند موجب آسیب رساندن به ذخایر ژنتیکی این گیاه ارزشمند بومی کشور و در معرض خطر انقراض قرار گرفتن آن شود.

1- jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate

دسترسی به گیاه ریشه دار در شرایط آزمایشگاهی با تولید گیاهچه استریل علاوه بر کمک به حفظ ذخایر ژرم پلاسم این گیاه و دسترسی به مواد دارویی گیاهی که امکان تولید آنها به روش‌های شیمیایی وجود ندارد، به دلیل خواب عمیق بذر و همچنین وجود فروتینین در ریشه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه نگهداری درون شیشه‌ای گیاه کما (*Ferula ovina*) و تولید ریشه دارای فروتینین در شرایط درون شیشه‌ای[1] گزارش نشده است. لذا این پژوهش با هدف دستیابی به فیتواستروژن فروتینین به عنوان منبع اقتصادی باارزش در صنایع دارویی، با تأکید بر حفظ منابع طبیعی آن در دو مرحله انجام شد: در مرحله اول تولید گیاه ریشه دار در شرایط درون شیشه‌ای و در مرحله دوم وجود فروتینین در نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک[2] مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

دستیابی به گیاه کما با توجه به فصل رشد محدود و مناطق رویش آن بسیار مشکل است، لذا تهیه نمونه گیاهی مناسب و تولید آن در شرایط استریل از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نمونه‌های آزمایشی از رویشگاه زشک شاندیز مشهد (ارتفاع ۱۴۰۰ متر از سطح دریا، طول جغرافیایی ۵۹ درجه و ۱۷دقیقه و عرض جغرافیایی۳۶ درجه و ۲۳ دقیقه) با شماره هرباریومی 24079-FUMH جمع‌آوری شد و مورد تأیید کارشناسان دانشکده منابع طبیعی و پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب روان قرار داده شدند و ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد و سپس هیپو کلریت سدیم ۱/۵ درصد ادامه یافت. به منظور خارج‌سازی مواد ضدعفونی، نمونه‌ها ۳ تا ۵ بار توسط آب مقطر استریل زیر هود شسته شدند. ریزنمونه از قسمت انتهایی اتصال ساقه به ریشه (با توجه به هدف پژوهش) با استفاده از پنس و اسکالپل استریل زیر هود در شرایط استریل تهیه شد.

انتخاب محیط مناسب کالوس‌دهی و شاخه‌دهی

ریز نمونه‌ها در ویال‌های حاوی محیط کشت انتخابی MS با ترکیبات مختلف هورمونی، همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۸درصد آگار و pH=۵/۸ کشت داده شدند (جدول ۱). ظروف در اتاق رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۳۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه که به وسیله لامپ‌های فلورسنت سفید تأمین می‌شد، نگهداری شدند. واکشت نمونه‌ها هر ۱۰-۷ روز یک بار صورت گرفت، بعد از گذشت یک ماه در صورت شاخه‌دهی یا کالوس‌دهی بسته به شرایط و میزان رشد واکشت هر دو هفته یک بار در محیط کشت جدید با ترکیب هورمونی مشابه انجام شد. پس از گذشت چهار هفته، وزن تر کالوس‌های حاصل به منظور بررسی اثر ترکیبات مختلف هورمونی محیط کشت و القاء کالوس اندازه‌گیری شد و در صورت عدم تولید کالوس در حد مناسب در همان محیط کشت قبلی واکشت شدند.

عصاره‌گیری ریشه‌های‌طبیعی و نمونه‌های کشت‌بافتی

ریشه‌های گیاه طبیعی هواخشک شدند و سپس به ۵۰ گرم پودر خشک، ۳۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان افزوده شد. با توجه به هدف آزمایش و غیرقطبی بودن ترپن‌های موجود در ریشه کما، از حلال دی کلرومتان به منظور عصاره‌گیری همراه با خالص‌سازی اولیه استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت، عصاره‌گیری دی‌کلرومتانی با استفاده از دستگاه روتاری انجام شد. نمونه‌های کشت‌بافتی بعد از کدگذاری هواخشک شدند و سپس در ۶ برابر حجم حلال قرار داده شدند. عصاره‌گیری از کالوس‌ها و ریشه‌های گیاهچه حاصل از کشت‌بافت با استفاده از کاغذ صافی زیر هود شیمیایی انجام شد.

کروماتوگرافی لایه نازک

ابتدا با استفاده از عصاره گیاه طبیعی و با توجه به این که در مناسب‌ترین سیستم حلال، لکه‌ها در قسمت میانی کاغذ تشکیل می‌شوند، سیستم حلال مناسب با استفاده از نسبت‌های مختلف اتردوپترول به اتیل استات در تانک TLC تعیین‌شد. سپس حلال‌ها به میزانی که به ۰/۵ سانتی‌متری پایین کاغذ برسد (حدود ۶ تا ۸ میلی‌لیتر با توجه به استفاده از کاغذ ۵×۸)، در تانک TLC ریخته شدند. صفحات TLC با پوشش آلومینیومی (شرکت مرک آلمان) خریداری شد. لکه‌گذاری از یک سانتی‌متری پایین کاغذ TLC انجام شد و کاغذ لکه‌گذاری شده درون تانک قرار داده شد (شکل ۱). تشکیل باند در عصاره نمونه‌های کشت‌بافتی در مقایسه با عصاره ریشه گیاه طبیعی و فروتینین خالص (۹۸٪) تهیه شده از شرکت سیگما مورد بررسی قرارگرفت.

آنالیز داده‌ها

در این مطالعه، همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرارهای مختلف (حداقل ۳ تکرار) و ۵ ریزنمونه در هر تیمار (۲۴ محیط کشت با ترکیبات مختلف هورمونی جهت بررسی شاخه‌دهی و ۱۱ محیط کشت جهت بررسی ریشه‌دهی ذکر شده در جداول ۱ و ۲) انجام شد. داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA)

1- *In vitro*
2- Thin Layer Chromatography (TLC)

نامتعادل و با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با توجه به تعداد مشاهدات متفاوت در هر گروه، اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی ($P < ۰/۰۵$) مشخص شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت. به منظور اجتناب از اریب دار شدن نتایج به سمت تیمارهای با عدم پاسخ به محیط کشت، مقایسه میانگین‌ها میان نمونه‌های با پاسخ مثبت انجام شد. بنابراین با وجود استفاده از ۲۴ محیط کشت جهت بررسی باززایی غیرمستقیم و ۱۱ محیط کشت ریشه‌دهی در آزمایش ابتدایی، نتایج تجزیه و تحلیل بر روی ۱۰ محیط کشت شاخه زایی، ۸ محیط کشت کالوس‌دهی و ۳ محیط کشت ریشه‌زایی نشان داده شده است.

جدول ۱- کدگذاری محیط‌کشت‌های کالوس‌دهی و شاخه‌زایی *F. ovina* بر اساس تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

Table 1- Coding of indirect shoot organogenesis media of *F. ovina* according to Plant Growth regulators (PGRs)

کد Code	محیط کشت MS MS medium	تنظیم کننده‌های رشد گیاهی PGRs (mg/l)				
		BAP	IAA	kin	NAA	IBA
L1	1	0	0	0	0	0
L2	1	1	0	0	0	0
L3	1	0	1	0	0	0
L 4	1	0	1.5	0	0	0
L 5	1	0	0	3	0	0
L 6	1	1	1.5	0	0	0
L 7	1	3	1.5	0	0	0
L 8	1	0	1.5	1	0	0
L 9	1	0	1.5	3	0	0
L 10	1	0	1.5	5	0	0
L 11	1	0	0	0	0.2	0
L 12	1	0	0	0	0.5	0
L 13	1	0	0	0	1	0
L 14	1	0	0	0	1.5	0
L 15	1	0.2	0	0	0.5	0
L 16	1	0.2	0	0	1	0
L 17	1	0.2	0	0	2	0
L 18	1	0.2	0	0	3	0
L 19	1	1	0	0	0.1	0
L 20	1	1	0	0	0.2	0
L 21	1	1	0	0	0.5	0
L 22	1	0	0	3	0.2	0
L 23	1	0	0	5	0.5	0
L 24	½	0.2	0	0	0	3

انتخاب محیط‌کشت مناسب ریشه‌زایی شاخه‌ها

شاخه‌ها در محیط‌کشت‌های ½MS و MS با ترکیبات مختلف هورمونی جهت بررسی ریشه‌زایی، کشت داده شدند (جدول ۲). به منظور ایجاد شرایط تاریکی بخش انتهایی ظروف کشت توسط فویل آلومینیومی پوشانده شد.

جدول ۲- کدگذاری محیط‌کشت‌های مورد استفاده جهت بررسی ریشه‌زایی *Ferula ovina* در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- Coding of applied media to investigate *in vitro* rooting of *Ferula ovina*

کد Code	محیط کشت MS MS medium	تنظیم کننده رشد گیاهی PGRs (mg/l)			
		BAP	IBA	IAA	NAA
R0	1	0	0	0	0
R1	1	0	1	0	0
R2	1	0	0	1	0
R3	1	0	0	0	1
R4	1	1	0	1.5	0
R5	½	0	0	0	0
R6	½	0	1	0	0
R7	½	0	0	1	0
R8	½	0	0	0	1
R9	½	0	0	0	1.5
R10	½	0.2	3	0	0

شکل ۱- مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام TLC: A کدگذاری نمونه‌ها بعد از اندازه‌گیری وزن، B افزودن حلال به نمونه‌ها به نسبت ٦ به ۱، C قرار دادن نمونه‌های بیش از ۵ گرم بر روی شیکر برای حل شدن بهتر در حلال، D سونیکیت نمونه‌های با وزن کمتر از ۱ گرم در حمام آب، E عصاره‌گیری زیر هود شیمیایی با استفاده از کاغذ صافی، F آماده‌سازی سیستم حلال به منظور انجام TLC، G لکه‌گذاری و انجام TLC

Figure 1- The process of preparing samples for performing TLC: A. Coding of samples after weighting, B. solvent addition to samples, C. Shaking of samples with more than 5g weight, D. Samples sonication with less than 1g weight in water bath, E. Performing extraction with filter paper, F. Solvent system identification for TLC, G. Samples applied on the plate to performance TLC test

نتایج و بحث

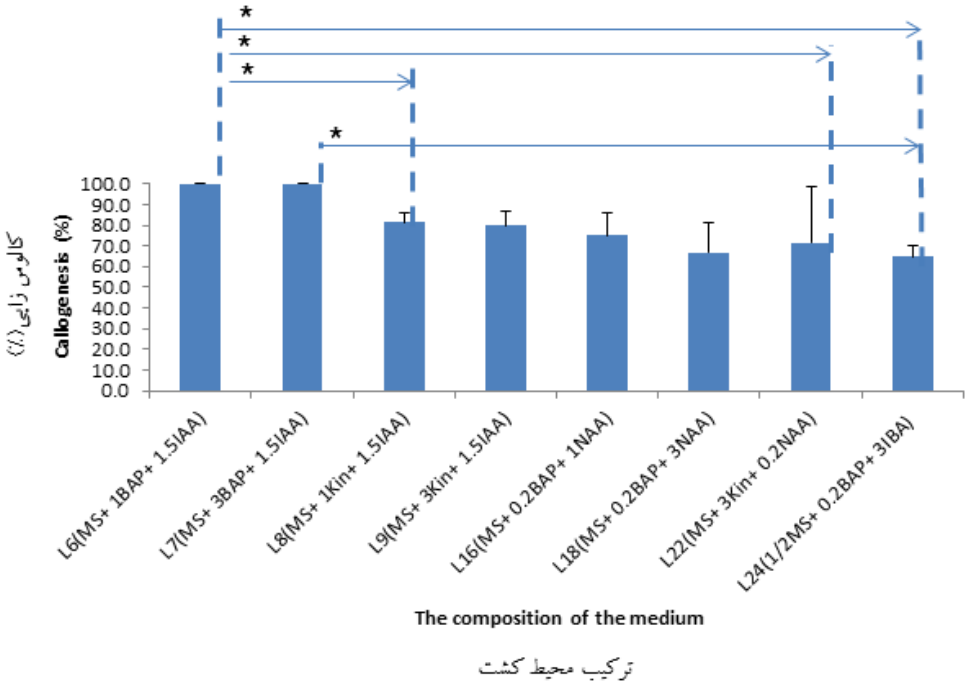
انتخاب محیط مناسب کالوس‌دهی

بعد از گذشت ۴ هفته، کالوس‌زایی تنها در ۸ محیط‌کشت از ۲۴ محیط مورد بررسی مشاهده شد. از آنجا که شرایط کالوس به لحاظ ساختار، بافت، اندازه و رنگ می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر مثبت یا منفی محیط‌کشت بر آن بوده و همچنین در شاخه‌دهی آن در مراحل بعد مؤثر است، تحولات صورت گرفته از جمله تغییر ساختار و رنگ کالوس و القاء شاخه مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان مثال، در محیط‌های کشت‌های L6، L7، L8، L9 و L24 کالوس‌های سبز رنگ با بافت فشرده و بزرگ تا ۸ گرم تولید شد (شکل ۲).

شکل ۲- تولید کالوس‌های سبز فشرده و روند رشد کالوس در محیط‌کشت‌های کالوس‌دهی *Ferula ovina*

Figure 2- Green compact callus formation of *Ferula ovina* and callus growth trend on selected media

آزمون معنی‌داری درصد کالوس‌دهی پس از حذف محیط‌هایی که تولید کالوس نداشتند یا کالوس‌دهی بسیار کمی به همراه داشتند، انجام شد (شکل ۳ و جدول ۳). نتایج نشان داد میزان کالوس‌دهی در محیط‌های L6 و L7 به طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌های دیگر است. لذا استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هورمون IAA همراه با هورمون BAP در مقادیر ۱ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کالوس‌دهی مطلوبی را به همراه داشت. با توجه به این که تفاوت معنی‌داری در کالوس‌دهی محیط‌های L6 و L7 وجود نداشت استفاده از محیط‌کشت L6 با غلظت هورمون کمتر پیشنهاد می‌شود.



شکل ۳- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد کالوس‌دهی *Ferula ovina*. Tukey *(P≤0.05)*

خط چین و فلش، نشان‌دهنده مقایسه میان میانگین‌ها در گروه‌های انتخابی است.

Figure 3- Effect of plant growth regulators on formation of callus (%) of *Ferula ovina*. Tukey *(P≤0.05)*

Dashed line and arrow indicate groups with significant difference in mean comparison.

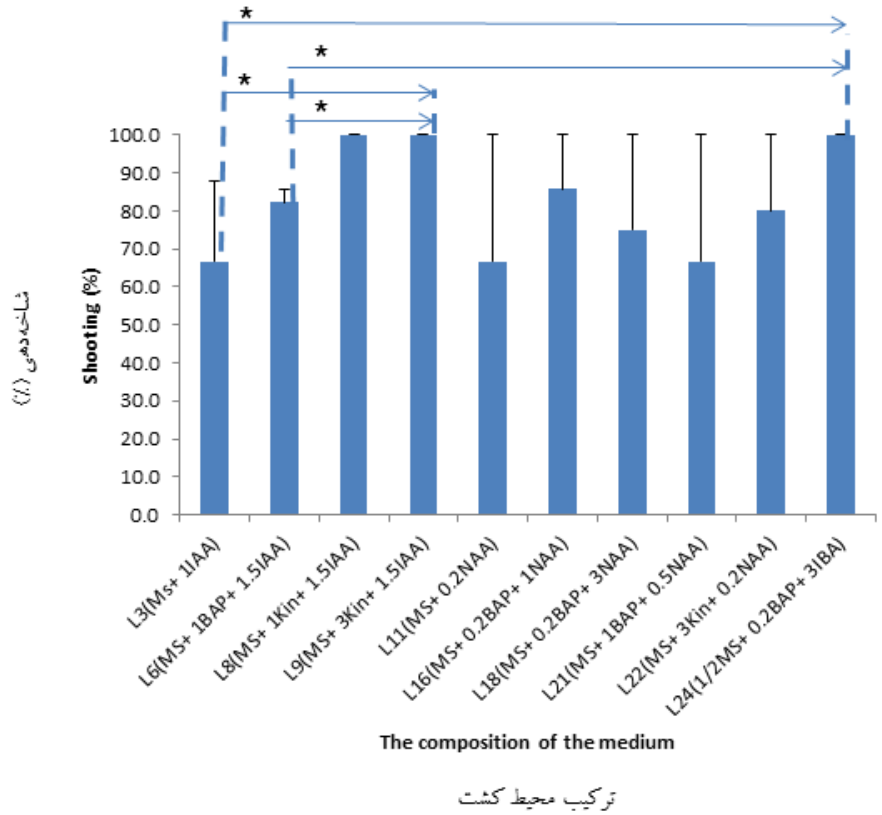
انتخاب محیط مناسب شاخه‌دهی

ریزنمونه‌ها به محیط‌کشت‌های انتخابی پاسخ متفاوتی نشان دادند، به گونه‌ای که برخی از آن‌ها پس از انتقال به محیط‌کشت، طی باززایی مستقیم وارد شاخه‌دهی شدند در حالی‌که در برخی دیگر شاخه‌دهی بعد از تولید کالوس و طی باززایی غیرمستقیم مشاهده شد. شاخه‌های تولید شده از کالوس‌ها که اندازه آنها بیشتر از ۱/۵ سانتی‌متر بود از آنها جدا و در محیط‌کشت MS بدون هورمون، ۳۰ درصد ساکارز و ۰/۸درصد آگار به مدت یک تا دو هفته به منظور تولید شاخه‌های بزرگ‌تر و قوی‌تر منتقل شدند (شکل ۴).

شاخه‌دهی در ۱۱ محیط‌کشت از میان ۲۴ محیط‌کشت مورد بررسی مشاهده شد. محیط‌های مؤثر شاخه‌دهی با حذف محیط‌هایی که شاخه‌دهی کمی داشتند، به لحاظ معنی‌داری مورد بررسی قرار گرفتند. محیط‌کشت‌های، L9 و L24 نسبت به سایر محیط‌ها تفاوت معنی‌داری در درصد شاخه‌دهی نشان دادند (شکل ۵ و جدول ۳).

شکل ٤– شاخه‌دهی کالوس *Ferula ovina* و شرایط نمونه‌ها قبل از جدا نمودن کالوس و انتقال به محیط پرآوری

Figure 4- Indirect shoot regeneration *Ferula ovina* and a stage before transferring to prolific shoot bud development medium



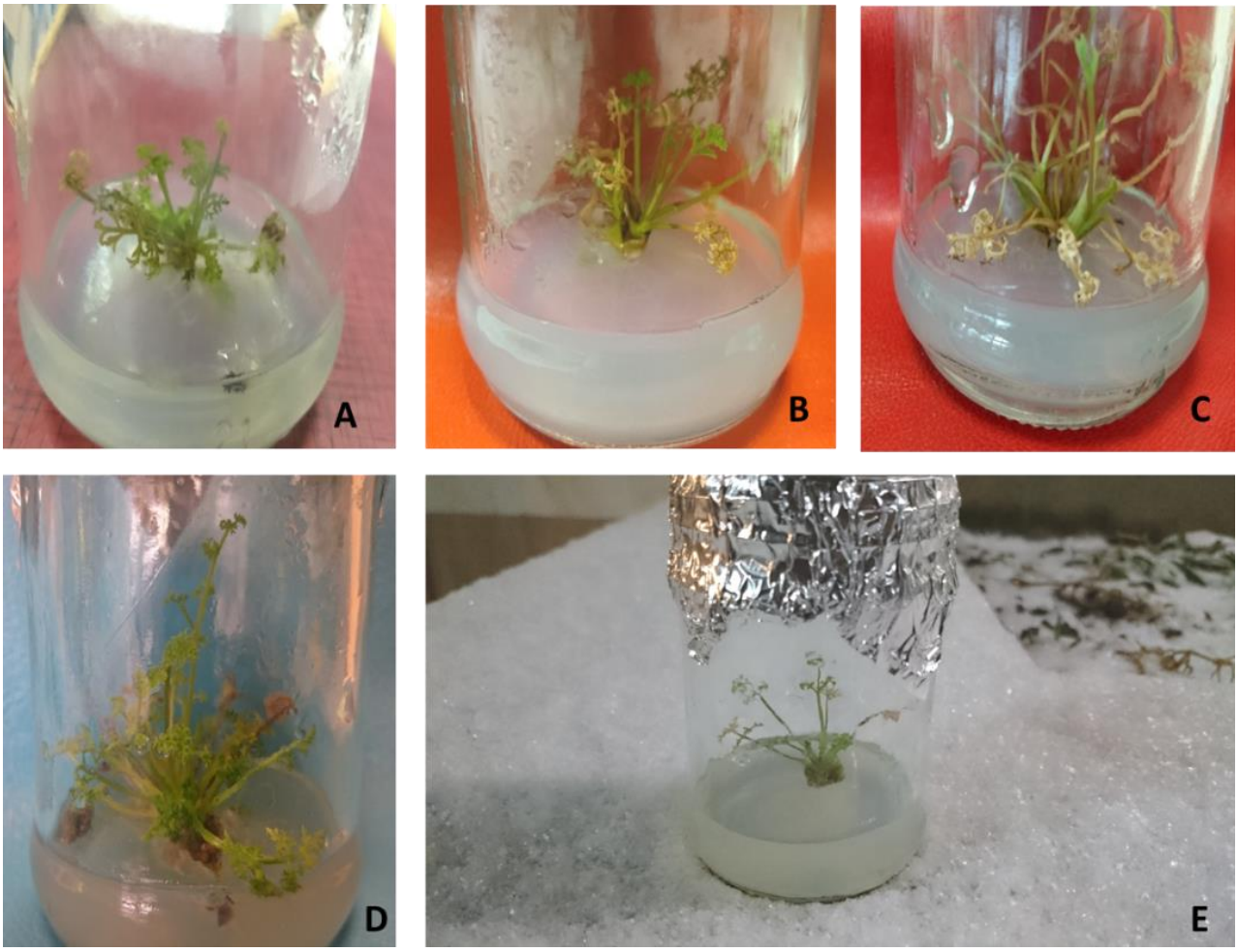
شکل ۵- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد شاخه‌دهی از کالوس *Ferula ovina*
Tukey (P≤0.05)
خط چین و فلش، نشان‌دهنده مقایسه میان میانگین‌ها در گروه‌های انتخابی است.

Figure 5- Effect of plant growth regulators on adventitious shoot regeneration (%) from callus of *Ferula ovina*
Tukey (P≤0.05)
Dashed line and arrow indicate groups with significant difference in mean comparison.

رشد طولی شاخه‌ها در محیط L9 با ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر IAA و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر kin به اندازه‌ای متفاوت از سایر محیط‌ها بود که در مدت زمان کوتاه‌تری ظروف کشت پر می‌شدند و جداسازی شاخه‌ها و واکشت در ظروف جداگانه اجتناب‌ناپذیر بود.

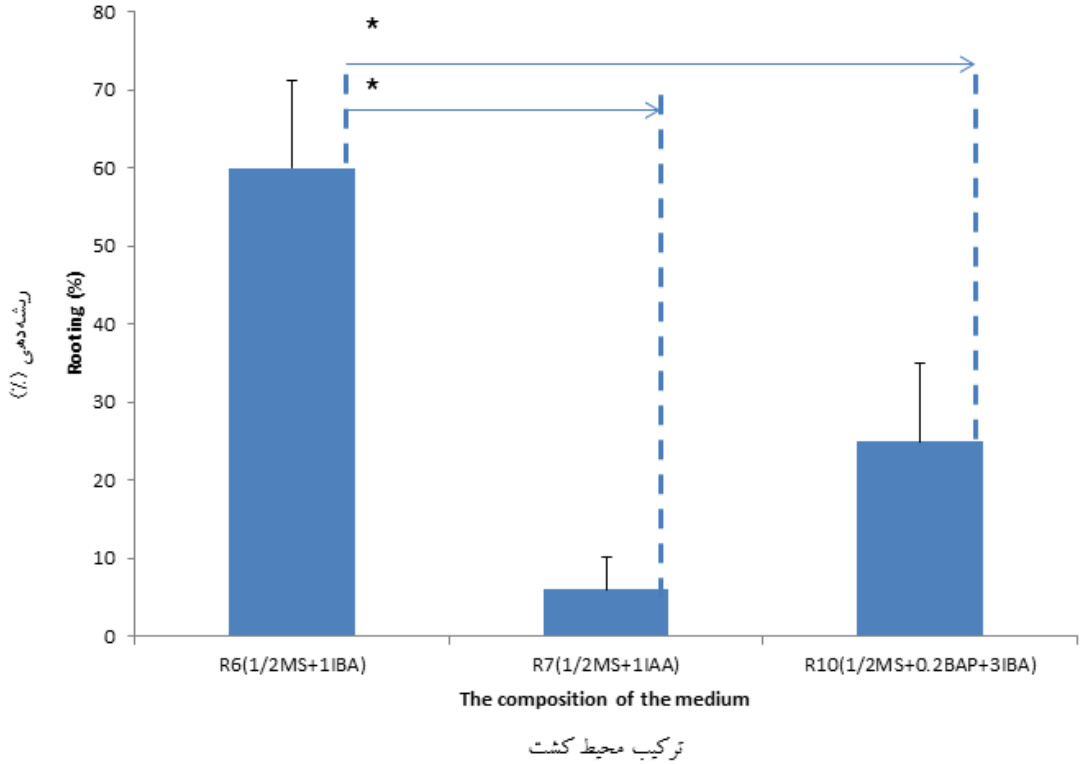
انتخاب محیط‌کشت مناسب ریشه‌زایی شاخه‌ها

هرچند دسترسی به نتایج موفقیت‌آمیز کشت‌بافت در کالوس‌زایی و شاخه‌دهی نمونه‌ها در گیاه کما در کمتر از سه ماه امکان‌پذیر شد، اما دستیابی به ریشه‌های کشت‌بافتی در این گیاه علی‌رغم آزمودن چندین محیط ریشه‌زایی، تغییر غلظت ساکارز و نمک‌های MS، سرانجام پس از گذشت ۹ ماه میسر شد. ریشه‌دهی قابل‌توجه تنها در سه محیط‌کشت از ۱۱ محیط‌کشت مورد بررسی مشاهده شد. نتایج آزمون معنی‌داری نشان داد، ریشه‌زایی در محیط R6 تفاوت معنی‌داری با سایر محیط‌ها دارد (شکل ۷ و جدول ۳). سرعت رشد ریشه در این گیاه مانند سایر گیاهان عالی کم بوده و دستیابی به گیاهچه ریشه‌دار با مشکلات زیادی همراه بود.



شکل ٦- شاخه‌دهی از کالوس *Ferula ovina* در محیط‌کشت‌های مختلف: A شاخه‌دهی در محیط‌کشت، B رشد شاخه‌های جدید، C واکنش مشابه رشد طبیعی (رشد شاخه‌های جدید علی‌رغم زرد شدن شاخه‌های قبلی) در محیط‌کشت، D پرآوری شاخه ها در محیط‌کشت، E امکان دسترسی به شاخه‌های شاداب، ۵ ماه بعد از پایان فصل رشد با استفاده از کشت‌بافت

Figure 6- *In vitro* shoot regeneration of *Ferula ovina*: A. Shoot bud induction from green compact callus, B. Growth of new shoots in medium, C. Interaction of samples same as natural condition, D. Availability to *F. ovina* in winter via tissue culture



شکل ۷- مقایسه درصد ریشه‌زایی در محیط‌کشت‌های با بیشترین ریشه‌دهی در *Ferula ovina*
Tukey (P≤0.05)
خط چین و فلش، نشان‌دهنده مقایسه میان میانگین‌ها در گروه‌های انتخابی است.
Figure 7- Effect of plant growth regulators root induction (%) by *in vitro* shoots of *Ferula ovina*
Tukey (P≤0.05)
Dashed line and arrow indicate groups with significant difference in mean comparison.

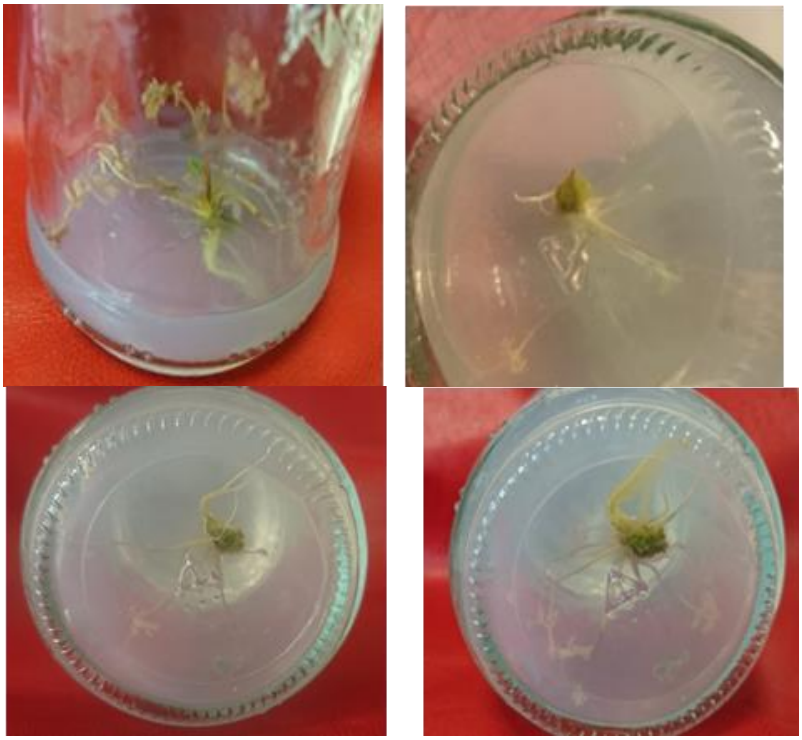
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس کالوس‌دهی، شاخه‌دهی و ریشه‌زایی *F. ovina* در شرایط درون شیشه‌ای
Table 3- Analysis of variance of *in vitro* callogenesis, shooting and root formation of *F. ovina*

	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	آماره F F	معنی‌داری Sig.
Callus					
Between groups	3.176	7	.454	3.414	.002
Within groups	21.530	162	.133		
Total	24.706	169			
Shoot					
Between groups	2.214	9	.246	2.336	.015
Within groups	24.005	228	.105		
Total	26.218	237			
Root					
Between groups	3.626	2	1.813	12.169	.000
Within groups	10.429	70	.149		
Total	14.055	72			

علی‌رغم تولید ریشه در برخی از نمونه‌های شاخه کشت بافتی، ریشه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم بسیار ظریف، شکننده و حساس بودند (شکل ۸). دستیابی به گیاهچه استریل ریشه‌دار با توجه به نتایج این پژوهش امکان‌پذیر شد. اگرچه سازگاری گیاه با شرایط محیطی و تولید انبوه این گیاه جزء اهداف پژوهش نبود، اما نتایج این بخش می‌تواند راهگشای پژوهش‌های با هدف تولید انبوه این گیاه باشد.

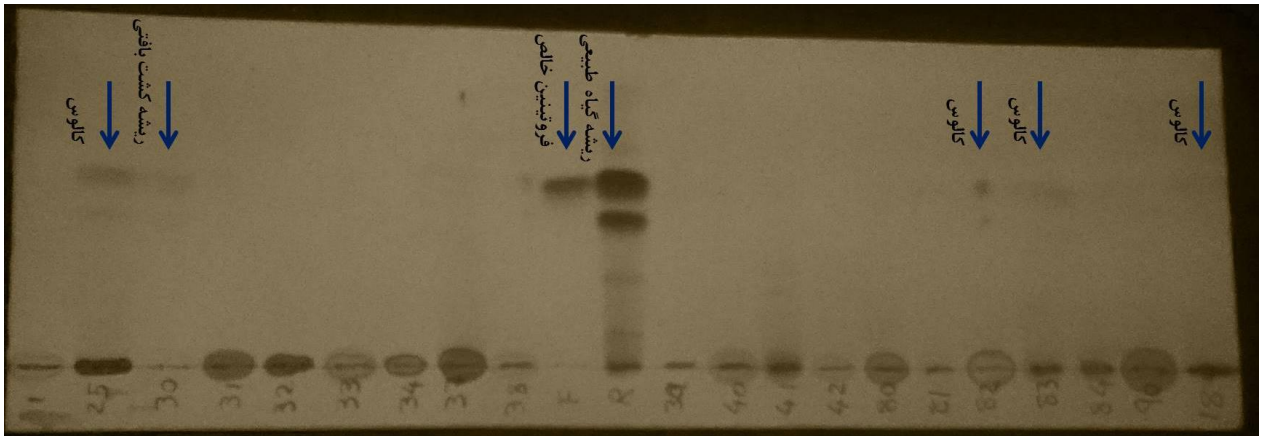
کروماتوگرافی لایه نازک

بررسی سیستم حلال‌های مختلف نشان داد سیستم حلال اتیل استات ۱ و اتر دو پترول ۲ در لکه‌گذاری با استفاده از اتیل استات بهترین نتیجه را به همراه دارد. زیرا در این سیستم حلال باندها در قسمت میانی تشکیل می‌شود. در بررسی تشکیل باند در مقایسه با عصاره ریشه گیاه طبیعی و فروتینین خالص (شکل ۹)، نمونه‌هایی با نتیجه TLC مشابه عصاره ریشه کما و فروتینین مشاهده شد.



شکل ۸- روند رشد ریشه *Ferula ovina* در شرایط درون شیشه‌ای

Figure 8- *In vitro* root growth trend of *Ferula ovina*



شکل ۹- نتایج TLC و مشاهده باند مشابه عصاره پودر ریشه گیاه طبیعی *Ferula ovina* و فروتینین خالص (۹۸ درصد) در بعضی از نمونه‌های کشت بافتی

Figure 9- TLC results of samples in compare to root extract of natural *Ferula ovina* and purified ferutinin (98%)

نتیجه‌گیری

بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی ادبیات موضوع، تاکنون مطالعه‌ای در این حوزه با استفاده از گیاه کما انجام نشده است تا بتوان نتایج مطالعه حاضر را با آن‌ها مقایسه کرد. بررسی قابلیت نگهداری درون شیشه‌ای گیاه کما نشان داد امکان نگهداری شاخه های حاصل از کشت بافت در محیط‌کشت‌های مذکور به مدت یک سال در اتاق رشد وجود دارد که نتایجی بهتر و بسیار گسترده تر از نتایج هادی و همکاران (۱۱) بر روی باریجه به عنوان یکی از گیاهان نزدیک به کما را به همراه داشت.

یکی از نتایج پژوهش حاضر دستیابی به محیط‌کشت ویژه L24 دارای ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA است که تولید کالوس از ریزنمونه‌های محل اتصال ساقه به ریشه، شاخه‌دهی از کالوس و ریشه‌زایی شاخه‌ها را تنها با استفاده از یک ترکیب هورمونی فراهم می‌آورد. علاوه بر این، محیط‌کشت L6 (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP) در تولید کالوس های سبز فشرده بزرگ، محیط‌کشت L9 (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۳ میلی‌گرم بر لیتر Kin) در تولید شاخه‌های بلند و شاداب با ترکیب و محیط‌کشت R6 (۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA) در تولید ریشه در شرایط درون شیشه‌ای با اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) با سایر محیط‌های‌کشت مورد بررسی، نوید بخش فراهم بودن امکان نگهداری گیاه کما در شرایط درون شیشه‌ای است. همچنین با توجه به تأیید وجود فروتینین در نمونه‌های کشت‌بافتی در آزمایش TLC، امکان تولید انبوه فروتینین از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و با استفاده از بیوراکتور وجود دارد. با توجه به این که در حال حاضر ۵ میلی‌گرم فروتینین خالص (۹۸٪) در شرکت سیگما به قیمت ۱۵۴ دلار کانادا عرضه می‌شود، لذا تولید فروتینین در شرایط درون شیشه‌ای از توجیه اقتصادی و تجاری بالایی برخوردار است. به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر امکان دسترسی به فروتینین بدون ریشه‌کنی گیاهان چند ساله کما به عنوان منابع غنی فروتینین در طبیعت و همچنین امکان استفاده از آن در مطالعات داروسازی و تولید تجاری فروتینین را فراهم می‌آورد.

سپاسگزاری

احتراما از گروه کشت بافت گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دکتر برایان ایمز از دانشکده پزشکی دانشگاه ساسکچوان کانادا تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Amooaghaie R. 2009. The Effect Mechanism of Moist-Chilling and GA3 on Seed Germination and Subsequent Seedling Growth of *Ferula ovina* Boiss. The Open Plant Science Journal, 3: 22-28.
2- Ansari N., Fayaz M., and Ghasemi M.H. 2009. Estimate of Iran-Turanian zone rangelands degradation rate by measuring and suggestion Index. Iranian Journal of Range and Desert Research, 16(3): 293-304. (In Persian)
3- Arnoldi L., Ballero M., Fuzzati N., Maxia A., Mercalli E., and Pagni L. 2004. HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula communis* roots. Fitoterapia, 75(3): 342-354
4- Azhir F., and Shahmoradi A. 2007. Autecology of *Ferula ovina* Boiss. In Tehran Province Iranian Journal of Range and Desert Reseach, 14(3): 359-367. (In Persian)
5- 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(12): 1977-1983.
6- Cavani F., Ferretti M., Carnevale G., Bertoni L., Zavatti M., and Palumbo C. 2012. Effects of different doses of ferutinin on bone formation/resorption in ovariectomized rats. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 30(6): 619-629.
7- Fasih M., and Tavakkol Afshari R. 2018. The morphophysiological dormancy of *Ferula ovina* seeds is alleviated by low temperature and hydrogen peroxide. Seed Science Research, 28(1): 52-62.
8- Ferretti M., Bertoni L., Cavani F., Zavatti M., Resca E., Carnevale G., Benelli A., Zanoli P., and Palumbo C. 2010. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. II: Role in recovering osteoporosis. Journal of Anatomy, 217(1): 48-56.
9- Ferretti M., Cavani F., Bertoni L., Zavatti M., Taronna A., Carnevale G., Benelli A., Zanoli P., Marotti G., Palumbo C. 2010. New aspects of Ferutinin effect in preventing osteoporosis. Italian Journal of Anatomy and Embryology, Vol 115(1/2).
10- Ghasemi S., Heidary M., Rezaalizadeh Rooshan F., and Habibi Z. 2013. New Monoterpene Ester Derivative from Aerial Parts of *Ferula Ovina* Boiss. 2nd National Congress on Medicinal Plants. Tehran- Iran.
11- Hadi N., Omidbaigi R., and Moeinei 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): 38.
12- Iranshahi M., Famili A., Basarlv C., and Pyasnth S. 2009. Purification and determination of compounds in *Ferula ovina* Boiss. roots. Journal of Medicinal Plants, 9(36): 72-80. (In Persian)

13- Mozaffarian V. 1996. Dictionary of Iranian Plant Names; Farhang Moaser publishers, Tehran, Iran.
14- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497.
15- Omidi M., and Farzin N. 2012. Biotechnology Approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal. 7(3): 209-220.
16- Palumbo C., Ferretti M., Bertoni L., Cavani F., Resca E., Casolari B., Carnevale G., Zavatti M., Montanari C., Benelli A., and Zanoli P. 2009. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 27(5): 538-545.
17- Rahnama-Ghahfarokhi A., and Tavakkol-Afshari R. 2007. Methods for Dormancy Breaking and Germination of Galbanum Seeds (*Ferula gummosa*). Asian Journal of Plant Sciences, 6(4): 611-616.
18- Tabrizi L., and Koocheki A.R. 2014. Medicinal Plants Ecology, Production and Sustainable Utilization. University of Tehran. (In Persian)
19- Zanoli P., Zavatti M., Geminiani E., Corsi L., and Baraldi M. 2009. The phytoestrogen ferutinin affects female sexual behavior modulating ERα expression in the hypothalamus. Behavioural Brain Research, 199(2): 283-287.
20- Zavatti M., Benelli A., Montanari C., and Zanoli P. 2009. The phytoestrogen ferutinin improves sexual behavior in ovariectomized rats. Phytomedicine, 16(6): 547-554.

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No. 4, Winter 2019, p. 641-654
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷، ص. ۶۵۴-۶۴۱
شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸

In Vitro Achievement of Ferutinin from Root of *Ferula ovina* with Emphasis on Germplasm Resources Conservation

H. Zare Mirakabad[1]- M. Farsi[2*]- S. Malekzadeh Shafaroudi[3]- M. Iranshahi[4]- A. Bagheri[5]- N. Moshtaghi[6]

Received: 27-06-2018
Accepted: 12-08-2018

Introduction: There is a growing body of the literature that recognizes the importance of ferutinin ($C_{22}H_{30}O_4$) as one of the natural phytoestrogens with potency to treat osteoporosis and some kind of cancers. One of the greatest challenges is availability of ferutinin that is found just in root of some plants of the genus *Ferula* (Apiaceae), which is the reason of high price of it in global markets. *Ferula ovina* , an endemic plant of Iran, is known as one of the greatest sources of ferutinin. Unfortunately, access to ferutinin requires uprooting *Ferula ovina* especially older plants with more secondary metabolites content. There is a large volume of published studies describing the importance of tissue culture in propagation of endangered plants including secondary metabolites without possibility of chemical production and with deep dormancy seed exactly like the characters of *F. ovina*. Up to now, far too little attention has been paid to importance of tissue culture in accessing ferutinin without degrading the germplasm resources of it. The main aim of this study was to find an approach to access ferutinin associated *F. ovina* germplasm conservation.

Materials and Methods: In this experiment, the aerial parts of *F. ovina* were collected from Zoshk area (Mashhad, Iran). The plants were recognized as *F. ovina* by the Institute of Plant Sciences (Ferdowsi University of Mashhad). Tissue culture part was performed with preparation of sterilized media and explants. Therefore, the MS salts and vitamins was applied as basic medium, however MS salt was decreased to half strength for rooting of shoots. The node (root junction) explants were cultured on 24 callus induction/shooting media with different combinations of plant growth regulators (BAP, IAA, Kin, NAA and IBA). The shoots from direct and indirect regeneration were then transferred to media with different combinations of PGRs (BAP, IBA, IAA and NAA) in order to find rooting medium. Following these treatments, unbalanced ANOVA for analysis of data were performed using IBM SPSS 19. The final stage of the study comprised a TLC test for the purpose of finding ferutinin in samples which resulted from tissue culture. For this purpose, air-dried parts of samples were powdered and extraction was done after being in 3-5 times dichloromethane for 24hours. Then after optimizing solvent system was done with selection the ratio that presented bands in middle of TLC paper.

Results and Discussions: The results indicated that from 24 tested media, just 8 of them had potency of callus formation, but just L6 on MS medium containing 1 mg/l BAP and 1.5 mg/l IAA showed significant difference for percentage of callus induction at 5% level with compact green and the heaviest calluses. Although direct and indirect shoot regeneration was observed in this study, L9 on MS medium along with 1.5 mg/l IAA and 3 mg/l kin demonstrated significant difference for percentage of shooting at 5% level. Moreover, R6 on ½MS with 1 mg/l IBA showed significant difference for percentage of rooting of shoots at 5% level. The most surprising observation to emerge from the data comparison was L24 on half strength MS medium containing 0.2 mg/l BAP and 3 mg/l IBA with potency of callus induction, shooting and rooting of shoots. Regarding to the results of TLC test, ferutinin positive bands were observed in some samples.

Conclusions: The aim of the present research was to examine possibility of achieving ferutinin without need to uproot *F. ovina* because there are several problems to achieve this valuable sesquiterpene: 1) Chemical production of ferutinin is impossible, 2) It could be accessible just from roots of genus *Ferula*, 3) Propagation with seeds of *F. ovina*

1, 2, 3, 5 and 6- Ph.D. of Agricultural Biotechnology, Professor, Associate Professor, Professor and Associate Professor Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Respectively
(*- Corresponding Author Email: farsi@um.ac.ir)
4- Professor of Department of Pharmacognosy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

is limited because of morphophysiological dormancy of them, 4) Natural habitat of this plant in Iran is going to be destructed, 5) Access to natural habitat is difficult, 6) Time of access is limited with short growth season, 7) Maintaining *F. ovina* in greenhouse condition is impossible. The results of this research support the idea that producing ferutinin in Iran without any harmful effect on germplasm resources of *F. ovina* is possible. This is the first study of high scale commercial production of ferutinin which examine associations between tissue culture and ferutinin production.

Keywords: *Ferula ovina*, Ferutinin, Germplasm resources conservation, Thin Layer Chromatography, Tissue culture