نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۵۳۶-۵۲۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 525-536
ISSN: 2008 - 4730

نقش اکوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کشت تعلیقی سلولی چویل (*Ferulago angulata (Schlecht.) Boiss.*)

سید مهران علوی[۱]- اسد معصومی اصل[۲*]- ناصر زارع[۳]- رسول اصغری زکریا[۴]- پریسا شیخ زاده مصدق[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵

چکیده

گیاه چویل دارای خواص داروئی مختلف بوده و تاکنون گزارشی از کشت تعلیقی سلولی این گیاه بومی ایران ارائه نشده است. به منظور ارزیابی تأثیر عوامل مختلف بر پینه‌زایی چویل، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتورها شامل اکوتیپ (آب‌نهر، گایونه، وزگ و سی‌سخت)، ریز نمونه (ریشه، برگ و ساقه) به همراه ترکیبات هورمونی مختلف NAA و BAP (هر کدام در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ بودند. نتایج نشان دادند که بهترین اکوتیپ در واکنش به پینه‌زایی، اکوتیپ آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگی و بهترین ترکیب هورمونی شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. به منظور بررسی تأثیر عوامل مختلف بر کشت تعلیقی سلولی چویل، علاوه بر هورمون NAA، از سطوح مختلف (غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هورمون 2,4-D نیز در ترکیب با هورمون BAP استفاده شد. بهترین ترکیب هورمونی برای کشت تعلیق سلولی، ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA یا 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود و بهترین ریزنمونه و اکوتیپ به ترتیب، ریزنمونه برگی و اکوتیپ آب‌نهر بود. در مجموع، اکوتیپ آب نهر و ریزنمونه برگی هم در کشت پینه و هم در کشت تعلیقی سلولی نسبت به بقیه اکوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها برتری نشان دادند و بهترین ترکیب هورمونی در هر دو نوع کشت ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

واژه‌های کلیدی: پینه، تنظیم‌کننده رشد، ژنوتیپ، SCV، PCV

مقدمه

گیاه چویل با نام علمی *Ferulago angulata* متعلق به خانواده چتریان می‌باشد. جنس *Ferulago* دارای حدود ۳۵ گونه در سراسر دنیا می‌باشد که تعداد ۷ گونه از آن در ایران رویش دارد (۲۵). گیاه چویل معمولاً در نقاط مرطوب و نیمه مرطوب به صورت خودرو رویش دارد اما رویشگاه اصلی چویل در ایران، منطقه زاگرس می‌باشد. این گیاه کم و بیش در استان‌های مرکزی، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کرمانشاه، همدان، کرمان و نیز در قسمت‌هایی از سلسله کوه‌های البرز وجود دارد (۱). زمان گلدهی، از اواخر اردیبهشت تا اواسط خرداد ماه ادامه دارد، زمان رسیدگی بذر از اواخر شهریور تا اوایل مهرماه می‌باشد. به دلیل معطر بودن، در موسم بهار در اکثر خانه‌های روستایی دسته‌هایی از ساقه‌های این گیاه یافت می‌شود. از گل‌های باز شده و برگ‌های جوان گیاه نیز برای خوش‌بو و خوش‌طعم کردن انواع غذاها همچون دوغ، ماست و کره استفاده می‌شود (۱).

اسانس و شیرابه بسیار معطر ساقه و برگ گیاه چویل دارای خاصیت ضدعفونی‌کنندگی بوده و در پزشکی استفاده می‌شود. این گیاه اثر مسکن و تقویت‌کنندگی داشته و در درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای استفاده می‌شود (۱ و ۳۳). نتایج مطالعات بر روی چویل نشان داد که اسانس گیاه از فعالیت ضدمیکربی بالایی برخوردار است (۴). در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی اسانس حاصل از بذر و سرشاخه‌های هوایی چویل صورت گرفت، مشخص شد که اسانس آن دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشد (۴۱).

عوامل متعددی در موفقیت کشت بافت گیاهان داروئی دخیل می‌باشند طوری‌که نمی‌توان یک رویکرد را برای تمام گونه‌ها توصیه نمود. یکی از مهم‌ترین عوامل، تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف و برهمکنش آنها با یکدیگر است (۲۷). مشخص شده است که وجود

۱، ۳، ۴ و ۵- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران و استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
(*- نویسنده مسئول: (Email: Masoumiasl@yu.ac.ir
DOI: 10.22067/jhorts4.v33i3.79173

مقادیر کم اکسین در محیط کشت یک مانع عمده در راه تکثیر ساقه می‌باشد (۳۲). واکنش به کشت بافت تحت تاثیر ترکیبات هورمونی و نوع ژنوتیپ گونه‌های گیاهی است (۲۹). از آنجا که ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد، میزان متفاوتی پینه تشکیل می‌دهند، بنابراین انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشمگیری بر تولید پینه و رشد آن دارد (۱۷). جهت مطالعه الگوهای رشدی و تولید مواد گیاهی از جمله متابولیت‌های ثانویه، کشت پینه در مقایسه با کشت تعلیق سلولی، به دلیل محدودیت‌هایی که از نظر یکنواختی تولید سلول و نیز دسترسی یکنواخت تک تک سلول‌ها به اکسیژن و مواد غذایی دارد، از قابلیت کمتری برخوردار است (۲۱).

کشت تعلیقی سلولی، تعلیقی از سلول‌های در حال رشد و تقسیم سریع می‌باشد که در محیط مایع کشت و در پاسخ به دستورزی‌های آزمایشگاهی از انعطاف‌پذیری بیشتری برخوردارند. کشت تعلیقی مطلوب که به‌طور کامل از سلول‌های منفرد تشکیل شده باشد، به ندرت حاصل می‌شود، بیشتر تعلیق‌های سلولی، از مخلوطی از توده‌های سلولی و نیز سلول‌های منفرد پراکنده تشکیل شده‌اند. با این وجود از طریق چندین نسل گزینش می‌توان یک کشت تعلیق سلولی متشکل از تک سلول‌ها و توده‌های سلولی کوچک را ایجاد و نگهداری کرد (۸). در کشت سلولی، رشد و ریخت‌زایی به وسیله نوع و غلظت‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و برهمکنش آنها کنترل می‌شود (۳۰).

مشخص شده که 2,4-D به عنوان قویترین اکسین می‌باشد و اکسین‌ها با غلظت بالا سبب افزایش رشد طولی و افزایش تقسیم می‌شوند (۳۶). اغلب مطالعات نشان می‌دهد به طور معمول 2,4-D برای تولید پینه و تمایززدایی مؤثرتر می‌باشند و از میان سیتوکنین‌ها، BAP در تولید پینه کارایی بیشتری دارد (۵). در گیاه دارویی آنغوزه به‌منظور تولید پینه از ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل وکوتیلدون حاصل از گیاهچه به‌دست آمده از کشت بافت،آزمایشی انجام شد و نتایج نشان داد که فراوانی القاءپینه در ریزنمونه ریشه به‌میزان قابل توجهی بیشتر از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون می‌باشد، همچنین از بین تیمارها به کار رفته، هورمون NAA در ترکیب با BAP جهت تشکیل پینه مؤثرتر بود (۴۲). فولادوند و همکاران ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP را جهت تولید تعداد زیاد سلول معرفی نمودند (۱۰). سیتوکینین‌ها به‌طور مستقیم روی چرخه سلولی اثر گذاشته و در تنظیم تولید پروتئین‌های دخیل در تشکیل و عملکرد رشته‌های دوک نقش دارند. اکسین‌ها نیز از طریق افزایش انبساط‌پذیری دیواره سلول و تحریک رونویسی mRNAهای رمزکننده پروتئین‌های درگیر با رشد سلول، در چرخه سلولی تأثیر می‌گذارند (۳۳).

تاکنون مطالعات بسیار اندکی درخصوص کشت درون شیشه‌ای گیاه چویل صورت گرفته است. طی یک مطالعه بر روی گیاه چویل مشخص شد بهترین محیط کشت جهت کشت رویان چویل و تولید پینه، محیط ۱/۴MS می‌باشد (۲۴)، همچنین طی تحقیقاتی که بر روی گیاه باریجه انجام شده محیط کشت ۱/۴MS بهترین محیط برای رشد تشخیص داده شد (۳۵). این روند نیز در گیاه وشاء (*Dorma ammoniacum*) گزارش گردید (۱۱). در یک آزمایش به‌منظور تولید جنین‌رویشی از پینه گیاه چویل، از هورمون‌های NAA و BAP استفاده شد، نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های ریشه‌چه و ساقچه در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP تشکیل پینه دادند (۳۷). در مورد بهینه‌سازی پینه‌زایی و کشت تعلیقی سلولی آن با هدف بهبود تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه گزارشی موجود نیست. لذا این مطالعه جهت تعیین مطلوب‌ترین شرایط برای تولید پینه و کشت تعلیق سلولی در گیاه داروئی چویل طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور چویل (*Ferulago angulata (Schlecht.)* Boiss.) در شهریور ماه سال ۱۳۹۴ از ارتفاعات چهار رویشگاه مختلف در استان کهگیلویه و بویراحمد (آبنهر، گایونه، وزگ و سی‌سخت) همراه با ثبت مختصات جغرافیایی با استفاده از دستگاه GPS جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی اکوتیپ‌های چویل جمع‌آوری شده

Table 1- Geographic coordination of collected *Ferulago angulata* ecotypes

رویشگاه Habitat (Ecotype)	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude
آب‌نهر Abenahr	2843	30° 40′ 49″	51° 41′ 42″
گایونه Gauoneh	3053	30° 43′ 56″	51° 40′ 18″
وزگ Vezg	2677	30° 30′ 8″	51° 41′ 37″
سی‌سخت Sisakht	2861	30° 50′ 1″	51° 33′ 37″

با توجه به اینکه بذور در زمان رسیدگی از گیاه مادری برداشت شده بود، به منظور خشک شدن و از بین رفتن رطوبت احتمالی، بذرها به مدت یک تا دو روز در هوای معمولی و زیر نور آفتاب قرار گرفتند. ابتدا بذور با استفاده از آب و مایع ظرف‌شویی شسته شدند و سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و بذور ضدعفونی شده به مدت ۱ تا ۲ روز قبل از کشت، درون آب مقطر گرفتند تا پوسته بذر متورم و نرم شود. در زمان کشت نیز زیر هود لامینارایرفلو ضدعفونی مجدد بذور با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه انجام و سپس شستشو با آب دوبار تقطیر استریل انجام شد و به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲٪ غوطه‌ور شدند و سپس بذور سه مرتبه با آب دوبار تقطیر شستشو داده شدند و آب اضافی آنها توسط کاغذ صافی استریل گرفته شد و اقدام به استخراج جنین و کشت جنین بر روی محیط کشت شد تا گیاهچه استریل به منظور تهیه ریزنمونه بدست آید. ظروف کشت به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت MS (۲۶) با غلظت یک چهارم نمک بود (۲۳). برای تهیه ریزنمونه، از گیاهچه‌های استریل حاصل از کشت جنین استفاده شد. از اندام‌های برگ، ریشه و ساقه ریزنمونه‌های مختلف به ابعاد ۵ میلی‌متر تهیه شد و روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP کشت شد. پس از دو هفته، نمونه‌های فاقد آلودگی متورم شده و آثار تشکیل پینه در آنها مشاهده گردید. میزان پینه‌زایی به صورت درصد پینه‌زایی بر اساس تولید و یا عدم تولید پینه در ریزنمونه‌ها یادداشت برداری گردید. در طی دوره رشد، پینه‌ها با توجه به علائم نکروزه شدن به علت پخش مواد زاید گیاه از جمله فنل در محیط کشت و یا توقف رشد، هر ۲ هفته یکبار واکشت می‌شدند. ۵ هفته بعد از کشت، صفات وزن تر پینه، وزن خشک پینه، طول پینه و حجم پینه اندازه‌گیری و نوع پینه و رنگ آن یادداشت‌برداری شدند. صفت کیفی بافت پینه بر اساس سفت و نرم بودن پینه و صفت رنگ پینه هم بر اساس رنگ‌های سبز، زرد، شیری و سفید ارزیابی شدند.

استقرار کشت تعلیق سلولی

بهترین اکوتیپ از نظر پینه‌دهی انتخاب و به محیط کشت تعلیق منتقل شدند. برای تهیه محیط کشت تعلیقی سلولی از محیط کشت استقرار پینه (پینه‌زایی)، بدون افزودن آگار استفاده شد و از قطعات پینه تولید شده برای انتقال به محیط مایع و تشکیل تعلیق سلولی استفاده شد. بدین منظور بهترین محیط کشت و بهترین ترکیب هورمونی به همراه بهترین ریزنمونه از هر اکوتیپ با پینه‌دهی مناسب مشخص و پس از تیمار با اسکالپل به نحو ملایم به محیط کشت مایع انتقال داده شد و در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت انجام واکشت، هر ۱۴ روز یکبار سوسپانسیون سلولی با محیط کشت مایع تازه به نسبت ۱ به ۲ رقیق گردید. علاوه بر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و BAP از سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نیز در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد گیاهیBAP به منظور استقرار تعلیق سلولی استفاده شد.

شاخص‌های مورد مطالعه

به منظور بررسی میزان رشد سلول‌ها در کشت تعلیق و ترسیم منحنی رشد سلول‌ها، از دو شاخص حجم سلول متراکم شده (PCV[1]) و شاخص حجم سلول ساکن (SCV[2]) استفاده شد. برای تعیین شاخص PCV هر سه روز یکبار، ۱۰ میلی‌لیتر از تعلیق سلولی به فالکون دارای درجه‌بندی منتقل شد و با سرعت ۲۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مقدار PCV از طریق اندازه‌گیری درصد سلول‌های رسوب یافته نسبت به حجم کل سانتریفیوژ شده محاسبه شد. برای تعیین شاخص SCV نیز هر سه روز یکبار، ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سلول‌ها و توده‌های سلولی در فالکون درجه‌بندی ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حالت سکون نگهداری شد تا سلول‌ها و توده‌های سلولی رسوب کنند. در نهایت، حجم سلول یادداشت گردید و به صورت درصد از کل محیط برداشت شده محاسبه گردید.

واکاوی آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. اکوتیپ (چهار سطح)، ریزنمونه (سه سطح) هورمون‌های NAA و BAP (هرکدام در چهار سطح) به عنوان فاکتورهای آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم گردید. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

آزمایش پینه‌زایی

با توجه به اینکه بذور اکوتیپ‌های مختلف از ارتفاعات صعب‌العبوری جمع‌آوری شده بود که از لحاظ ارتفاع و شرایط جوی با هم تفاوت‌هایی دارند و به صورت طبیعی نیز زمان رویش این گیاه در این مناطق بسته به ذوب شدن برف‌ها و رسیدن به دمای بهینه، از اواسط اسفند تا اواسط اردیبهشت متغیر می‌بود.

1- Packed Cell Volume (PCV)
2- Settled Cell Volume (SCV)

جدول ۲- کدهای مربوط به تیمارها

Table 2- Treatment codes

کد تیمار Treatment code					
اکوتیپ Ecotype (A)		A1: Abnahr آب نهر	A2: Gauoneh گاونه	A3: Sisakht سی سخت	A4: vezg وزگ
تنظیم کننده رشد گیاهی Plant Growth Regulator	BAP (B)	B1: 0 mgl^{-1}	B2: 0.5 mgl^{-1}	B3: 1 mgl^{-1}	B4: 2 mgl^{-1}
	NAA (C)	C1: 0 mgl^{-1}	C2: 0.5 mgl^{-1}	C3: 1 mgl^{-1}	C4: 2 mgl^{-1}
نمونه Explant (D)		D1: Leaf برگ	D2: Stem ساقه	D3: Root ریشه	

نتایج نشان داد اولین ریزنمونه‌ای که شروع به پینه‌دهی نمود، مربوط به ریزنمونه ریشه اکوتیپ آب‌نهر بود که تقریباً یک هفته بعد از قرار گرفتن در محیط کشت، شروع به پینه‌دهی نمود و سایر اکوتیپ‌ها بعد از ۱۰ تا ۱۵ روز شروع به پینه‌دهی نمودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات اصلی اکوتیپ، ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی روی کلیه صفات ارزیابی شده معنی‌دار بود. برهمکنش چهارگانه اکوتیپ*BAP*NAA*ریزنمونه برای صفت وزن خشک پینه معنی‌دار نبود ولی برای صفات دیگر معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات ارزیابی شده در مرحله پینه‌زایی گیاه چویل

Table 3- ANOVA (mean squares) of evaluated traits in callogenesis step of Chavil

منابع تغییرات Source of Variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of Squares			
		حجم پینه Callus volume	پینه‌زایی Callogenesis	طول پینه Callus length	وزن خشک پینه Callus dry weight
اکوتیپ Ecotype	3	1.648**	21265.432**	56.277**	10.158**
BAP	3	0.793**	35117.798**	382.220**	94.511**
NAA	3	0.925**	39224.803**	395.873**	56.213**
ریزنمونه Explant	2	0.400**	3403.096**	44.753**	25.650**
اکوتیپ×BAP BAP×Ecotype	9	0.049**	389.074**	2.742**	0.688**
Ecotype×NAA NAAاکوتیپ×	9	0.51**	145.184**	2.939**	0.308**
اکوتیپ×ریزنمونه Ecotype × Explant	6	0.243**	2839.644**	27.790**	9.368**
NAA×BAP	9	0.026**	848.031**	8.507**	0.861**
BAP×ریزنمونه BAP×Explant	6	0.044**	516.017**	2.343**	1.55**
NAA× ریزنمونه NAA ×Explant	6	0.023**	326.501**	3.580**	0634**
اکوتیپ × BAP×NAA BAP×NAA×Explant	27	0.022**	440.149**	0.327*	0.127
ریزنمونه× BAP × اکوتیپ Ecotype×BAP×Explant	18	0.049**	446.467**	1.775**	0.649**
ریزنمونه×NAA × اکوتیپ Ecotype×NAA×Explant	18	0.019**	397.352**	2.605**	0.492**
ریزنمونه×BAP×NAA BAP×NAA×Explant	18	0.025**	330.919**	0.520**	0.127
ریزنمونه ×BAP×NAA× اکوتیپ Ecotype×BAP×NAA×Explant	54	0.026**	256.877**	0.643**	0.104
اشتباه آزمایشی Error	384	0.009	47.238	0.200	0.108

جدول ٤- مقایسه میانگین وزن خشک پینه در مرحله پینه‌زایی گیاه چویل تحت تاثیر تیمارهای مورد بررسی

Table 4- Mean comparison for Callus dry weight in callogenesis step of Chavil

تیمار Treatment	وزن خشک پینه Callus dry weight (g)	تیمار Treatment	وزن خشک پینه Callus dry weight (g)	تیمار Treatment	وزن خشک پینه Callus dry weight (g)
A1C3D1	2.36^{e-i}	B1C1	2.25^{d}	A2B1D3	2.52^{b-e}
A2C1D2	2.29^{e-j}	B1C2	2.36^{dc}	A2B2D1	2.54^{b-e}
A2C2D2	2.46^{e-h}	B1C3	2.68^{ba}	A2B2D2	2.55^{b-e}
A2C3D1	2.56^{e-f}	B1C4	1.12^{fe}	A2B3D1	2.5^{e-d}
A2C3D2	2.51^{e-g}	B2C1	2.38^{dc}	A2B3D2	2.82^{b}
A2C3D3	2.59^{ed}	B2C2	2.53^{bc}	A2B3D3	2.38^{c-f}
A3C1D1	2.5^{e-g}	B2C3	2.86^{a}	A3B1D1	2.66^{cb}
A3C2D1	2.57^{e-f}	B2C4	1.19^{e}	A3B2D1	2.67^{cb}
A3C3D1	2.58^{ed}	B3C1	2.57^{bc}	A3B3D1	2.67^{cb}
A4C1D1	2.75^{dc}	B3C2	2.6^{abc}	A4B1D1	2.61^{b-d}
A4C1D2	2.92^{bc}	B3C3	2.76^{ba}	A4B1D2	3.1^{a}
A4C2D1	2.88^{bc}	B3C4	1.28^{e}	A4B2D1	3.36^{a}
A4C2D2	2.98^{bac}	B4C1	0.75^{g}	A4B2D2	3.13^{a}
A4C3D1	3.21^{a}	B4C2	0.78^{g}	A4B3D1	3.38^{a}
A4C3D2	3.07b^{a}	B4C3	0.89^{fg}	A4B3D2	3.17^{a}

برای صفت وزن خشک پینه برهمکنش چهارگانه معنی‌دار نشد لذا مقایسه میانگین‌ها برای این صفت، برای برهمکنش‌های سه گانه اکوتیپ*NAA*ریزنمونه و اکوتیپ*BAP*ریزنمونه که معنی‌دار شده بودند، انجام گرفت. برای مقایسات میانگین برهمکنش سه‌گانه، با توجه به کثرت و تعداد سطوح هر تیمار، بهترین برهمکنش‌های سه‌گانه برای صفت وزن خشک پینه ارزیابی شد. برهمکنش دوگانه NAA*BAP نیز برای صفت وزن خشک مورد بررسی قرار گرفت. مقایسات میانگین نشان داد بهترین سطح ریزنمونه، اکوتیپ و هورمون NAA، با ریزنمونه ریشه در سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA برای اکوتیپ وزگ با میانگین ۳/۲۱ بدست آمد. برای برهمکنش اکوتیپ*BAP*ریزنمونه، نیز بالاترین میانگین وزن خشک پینه متعلق به اکوتیپ وزگ برای ریزنمونه ریشه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP با میانگین ۳/۳۸ بود. با این تفاسیر می‌توان گفت که اکوتیپ وزگ دارای بیشترین میانگین وزن خشک پینه می‌باشد که در اثرات اصلی برای این صفت نیز این روند مشاهده شده بود. مقایسه میانگین‌ها مشخص نمود برای برهمکنش سه گانه، بهترین ریزنمونه و اکوتیپ، ریزنمونه‌های ریشه از اکوتیپ وزگ می‌باشد. برهمکنش دوگانه BAP*NAA برای صفت وزن خشک پینه نشان داد که بالاترین وزن خشک پینه با میانگین ۲/۸۶ متعلق به ترکیب سطوح هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود.

برای مقایسات میانگین برهمکنش چهارگانه، با توجه به کثرت و تعداد سطوح هر تیمار، بهترین برهمکنش‌های چهارگانه برای صفات ارزیابی شده در جدول ۵ آورده شده است.

بر اساس صفات درصد پینه‌زایی، بهترین اکوتیپ، آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگی می‌باشد اما در مورد هورمون NAA، بهترین سطح هورمون ۲ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین سطح هورمونBAP، ۲ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که باعث انجام صد در صد پینه‌زایی می شوند. بر اساس صفت حجم پینه، بهترین اکوتیپ، آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگی می‌باشد اما در مورد هورمون NAA، بهترین سطح هورمون ۱ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین سطح هورمونBAP، ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که بیشترین حجم پینه را تولید کرده است. بر اساس صفت طول پینه، بهترین اکوتیپ، آب‌نهر و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگی می‌باشد اما در مورد هورمون NAA، بهترین سطح هورمون ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و بهترین سطح هورمون BAP، ۰/۵میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که بیشترین طول پینه را تولید کرده است (جدول ۵). می‌توان چنین اظهار نظر نمود که برای صفات مختلف اکوتیپ آب‌نهر نسبت به سایر اکوتیپ‌ها وضعیت مطلوب‌تری داشت، نیز ریزنمونه برگی از سایر ریز نمونه‌ها بهتر بود. اما در مورد هورمون‌ها، برهمکنش چهارگانه با اثرات اصلی تفاوت دارد.

پینه‌های تولیدی در اکوتیپ‌های مختلف از نظر تردی و رنگ تفاوت‌های زیادی داشتند حتی در ریزنمونه‌های بدست آمده از یک اکوتیپ، ترد و سفت بودن پینه‌ها و رنگ آنها با هم تفاوت داشت و از اینرو روند خاصی از جهت رنگ و یا تردی و سفتی در یک اکوتیپ و یا ریزنمونه وجود نداشت. به طورکلی رنگ پینه‌ها از شیری رنگ تا قهوه‌ای و تردی پینه‌ها نیز از شل آبکی تا سفت متغیر بود (شکل ۱).

جدول ۵- مقایسه میانگین بهترین برهمکنش‌های چهارگانه پینه‌زایی، حجم پینه و طول پینه در گیاه چویل

Table 5- Mean comparison of the best quadratic interactions for callogenesis, callus volume and callus length in Chavil

تیمار Treatment	طول پینه Callus length (cm)	تیمار Treatment	حجم پینه Callus volume (mm^3)	تیمار Treatment	پینه‌زایی Callogenesis (%)
A1B2C2D2	8.20^{a}	A1B2C3D2	1.30^{a}	A1B2C2D2	96^{ab}
A1B2C3D2	7.76^{ab}	A1B1C2D3	0.33^{g-m}	A1B2C3D1	91.67^{a-c}
A1B3C2D2	6.93^{b-l}	A1B1C3D3	0.37^{f-n}	A1B2C3D2	100^{a}
A1B3C3D2	7.70^{abc}	A1B1C4D3	0.42^{e-k}	A1B2C3D3	96^{ab}
A1B3C4D2	7.16^{b-i}	A1B2C2D1	0.52^{def}	A1B2C4D1	91.67^{a-c}
A1B4C3D2	7.53^{a-e}	A1B2C2D2	0.56^{cde}	A1B2C4D2	100^{a}
A1B4C4D2	7.20^{b-i}	A1B2C3D1	0.40^{e-m}	A1B2C4D3	100^{a}
A2B2C3D2	7.13^{b-j}	A1B2C4D1	0.43^{e-k}	A1B3C2D1	100^{a}
A2B2C4D2	6.83^{d-m}	A1B2C4D2	0.70^{bc}	A1B3C2D2	100^{a}
A2B3C3D2	7.00^{b-k}	A1B3C1D2	0.46^{e-j}	A1B3C2D3	91.67^{a-c}
A2B3C4D2	7.60^{a-d}	A1B3C2D1	0.32^{h-p}	A1B3C3D1	91.67^{a-c}
A2B4C4D2	6.67^{d-n}	A1B3C2D2	0.66^{cbd}	A1B3C3D2	100^{a}
A3B2C2D3	7.62^{a-d}	A1B3C3D1	0.31^{h-q}	A1B3C3D3	100^{a}
A3B2C3D3	7.51^{a-f}	A1B3C4D1	0.34^{g-n}	A1B3C4D1	100^{a}
A3B2C4D3	7.66^{abc}	A1B3C4D2	0.57^{de}	A1B3C4D3	96^{ab}
A3B3C2D3	7.24^{b-h}	A1B4C1D2	0.47^{e-i}	A1B4C2D2	100^{a}
A3B3C3D3	7.62^{a-d}	A1B4C2D2	0.41^{e-l}	A1B4C2D3	100^{a}
A3B3C4D2	6.67^{d-n}	A1B4C3D1	0.30^{i-r}	A1B4C3D2	100^{a}
A3B3C4D3	7.66^{abc}	A1B4C3D2	0.51^{d-g}	A1B4C4D1	100^{a}
A3B4C2D3	7.40^{a-g}	A1B4C4D1	0.50^{d-h}	A1B4C4D2	100^{a}
A3B4C3D3	7.66^{abc}	A1B4C4D2	0.70^{bc}	A2B3C4D3	92^{abc}
A3B4C4D2	6.76^{d-n}	A3B3C3D2	0.30^{i-r}	A3B3C4D2	92^{abc}
A3B4C4D3	7.65^{abc}	A3B4C4D2	0.33^{g-m}	A3B4C4D2	100^{a}

شکل ۱- پینه‌های تولیدی از ریزنمونه‌های برگی اکوتیپ آب‌نهر گیاه چویل در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP

Figure 1- Produced callus types from leaf explants of Abenahr's *Ferulago angulata* ecotype in MS medium containing 2 mgl^{-1} NAA plus 0.5 mgl^{-1} BAP

نتایج و بحث آزمایش تعلیق سلولی

به منظور دست‌یابی به کشت تعلیقی سلولی، از پینه‌هایی که از لحاظ ظاهری نسبت به بقیه پینه‌ها در وضعیت مطلوب‌تری قرار داشتند، استفاده شد. بدین ترتیب پینه‌ها از اکوتیپ‌ها و ریزنمونه‌هایی

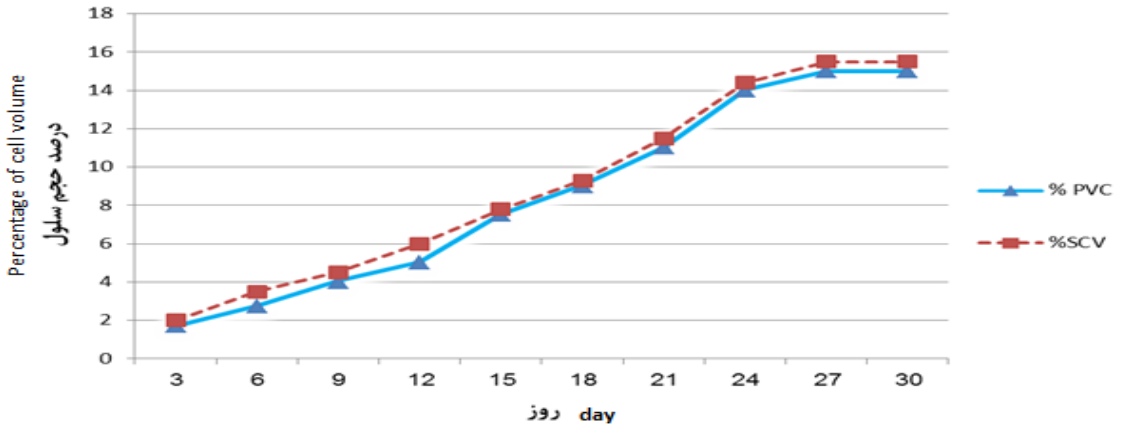
انتخاب شدند که تفاوت معنی‌داری نسبت به بقیه داشتند. از پینه های حاصل از ریزنمونه برگ و ریشه سایر اکوتیپ‌ها نیز استفاده گردید و علاوه بر محیط کشت‌هایی که از لحاظ هورمونی بهترین محیط کشت معرفی شد، به منظور اطمینان بیشتر از سایر نسبت‌های هورمونی به کار رفته در آزمایشات پینه‌زایی نیز استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده بهترین محیط کشت تعلیق سلولی، محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP بوده که پینه بدست آمده از ریزنمونه برگی اکوتیپ آب‌نهر در آن بکار رفته بود (شکل ۲). غلظت هورمونی مناسب برای هورمون NAA قابل پیش‌بینی بود زیرا اثرات اصلی این هورمون در سطح ۲ میلی‌گرم نسبت به سایر سطوح تفاوت معنی‌داری داشت. ولی در مورد هورمون BAP قضاوت کمی سخت‌تر بود، چون اثر اصلی این هورمون فقط به بود و نبود آن بستگی داشت و سطوح مختلف آن با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. بنابراین، این هورمون در حضور NAA تعیین کننده است و برهمکنش آن با هورمون NAA نشان دهنده تأثیر مثبت بر صفات ارزیابی شده بود. غلظت مواد تنظیم کننده رشد در محیط کشت برای پینه‌زایی بسیار مهم است. اکسین با غلظت متوسط تا زیاد، اولین هورمون مورد استفاده برای تولید پینه است. در بعضی گونه‌ها غلظت زیاد اکسین و غلظت کم سیتوکینین در محیط کشت، روند تولید پینه را بهبود می‌دهند (۹). هورمون NAA به تنهایی یا در ترکیب با هورمون BAP در القای پینه از ریزنمونه‌های ساقه و دمبرگ در دو محیط کشت MS و B5 بر روی گیاه *Salvia canariensis* L. بسیار موثر بود (۲۲). در مطالعه حاضر نیز محیط کشت MS حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با BAP در القای پینه از ریزنمونه‌های مختلف موثر واقع شد. عوامل مؤثر بر رشد و نمو در کشت درون شیشه‌ای، شامل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد می‌باشد (۲).

شکل ۳ بیانگر روند رشد سلولی در کشت تعلیقی سلولی حاصل از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر است. این نمودار بر اساس شاخص‌های PCV و SCV ترسیم شده است. از روش‌های ارزیابی رشد در کشت‌های تعلیق سلول گیاهی، محاسبه مقادیر SCV و PCV می‌باشد (۳۹). نتایج نشان داد پینه‌های حاصل از ریزنمونه برگی دارای PCV و SCV قویتری نسبت به پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه می‌باشند. سایر اکوتیپ‌ها در مقایسه با اکوتیپ آبنهر وضعیت مطلوبی نداشتند و این قضیه نیز از لحاظ ظاهری قابل مشاهده بود. PCV و SCV اندازه‌گیری شده در سایر اکوتیپ‌ها نیز این موضوع را تایید نمود به طوری غلظت تعلیق در آنها برای مدت زیادی بدون تغییر باقی ماند. نشان داده شده که در کشت تعلیق موز نیز به مرور زمان مقدار PCV افزایش یافت (۱۶). در مطالعه‌ای که بر روی *Taxus x media* Rehd. انجام شد مشخص گردید که PCV به عنوان روشی قابل اطمینان و سریع برای اندازه‌گیری رشد سلول به جای وزن خشک و تر سلول می‌باشد (۱۳). در کشت تعلیقی سلولی خشخاش ایرانی PCV و SCV همبستگی بسیار بالای با تراکم سلولی نشان داده است (۸). وقتی سلول‌های جدید در محیط تعلیق تشکیل می‌شوند، به صورت پراکنده یا توده در می‌آیند. این سلول‌ها سرعت تقسیم سلولی بیشتری نسبت به سلول‌های پینه نشان می‌دهند و به این دلیل تعلیقی سلولی در شرایطی که تقسیم سلولی سریع و نسل‌های سلولی پر جمعیت مورد نیاز باشد، کاربرد دارد (۳۱).

الف (A) ب (B)

شکل ۲- رشد سلول‌های چویل در کشت تعلیقی سلولی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP. الف) توده‌های سلولی کشت تعلیق، ب) تغییر رنگ محیط کشت بر اثر افزایش تراکم سلولی

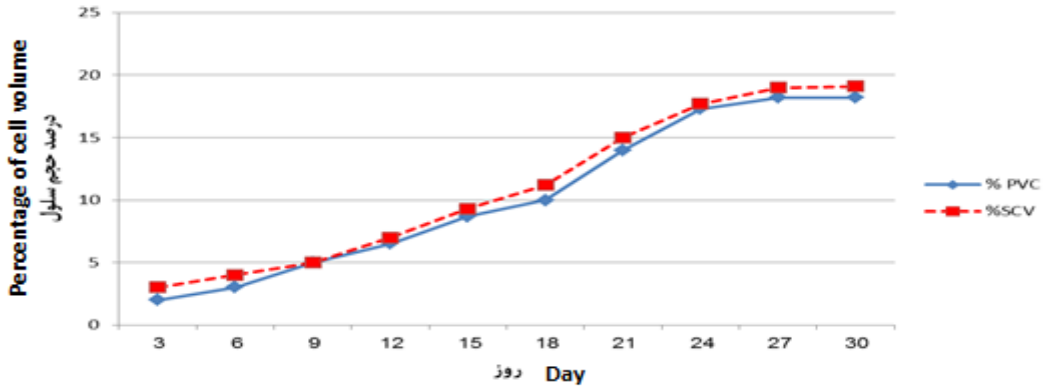
Figure 2- Growth of *Ferulago angulata* cells in cell suspension culture in MS medium containing 2 mgl^{-1} NAA and 0.5 mgl^{-1} BAP. A) Cell clumps suspensions, B) Color change in the culture medium due to increased cell density



شکل ۳- منحنی رشد تعلیق سلولی گیاه چویل از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP

Figure 3- Growth curve of *Ferulago angulata* cell suspension from leaf explant of Abenahr ecotype in MS medium containing 2 mgl^{-1} NAA and 0.5 mgl^{-1} BAP

با توجه به اینکه درکشت تعلیقی سلولی ورود به مرحله تعلیق کمی وقت‌گیر بود. جستجوی راهی که سریعتر تعلیق تشکیل گردد، اجتناب ناپذیر بود. لذا در کنار هورمون‌های ذکر شده اقدام به استفاده از هورمون 2,4-D در ترکیب با هورمون BAP به منظور تشکیل تعلیق شد. نتایج نیز نشان داد 2,4-D در سطح ۲ میلی‌گرم بر لیتر و BAP در سطح ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به منظور تولید تعلیق مفید واقع شده‌اند (شکل ۴)، اما تفاوتی که با هورمون NAA در ترکیب با هورمون BAP داشت این بود که با اندازه گیری PCV و SCV حجم سلولی بیشتری مشاهده گردید و تعلیق سلولی با سرعت بیشتر و در مدت زمان کمتر ایجاد شد که این روند نیز در کارهای تحقیقاتی مزیت محسوب می‌شود. با این‌حال استفاده از NAA هیچ‌گونه کاستی در روند موجود ایجاد ننمود. نکته حایز اهمیت این بود که نگهداری تعلیق تیمار شده با 2,4-D کمی سخت‌تر از تعلیق تیمار شده با NAA بود زیرا سلول‌های تعلیقی سریعتر وارد فاز لایتیک می‌شدند که این نیز نوعی نقص جهت استفاده بلند مدت بود. معمولا برای افزایش شکنندگی و تردی پینه و ایجاد یک تعلیق خوب، از نسبت بالای اکسین به سیتوکینین استفاده می‌شود (۴).



شکل ٤- منحنی رشد تعلیق سلولی گیاه چویل از ریزنمونه برگ اکوتیپ آب‌نهر در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BAP

Figure 4- Growth curve of *Ferulago angulata* cell suspension from leaf explant of Abenahr ecotype in MS medium containing 2 mgl^{-1} 2,4-D and 0.5 mgl^{-1} BAP

در کشت تعلیق *Cyperus aromaticus* با اعمال سطوح مختلف NAA، رشد سلول تا ۳ هفته پس از اعمال تیمار افزایش و پس از آن

کاهش یافت. با اعمال 2,4-D نیز رشد سلول تا هفته سوم افزایش یافت و پس از هفته سوم، رشد سلول کاهش نشان داد که این کاهش در مقایسه با هورمون NAA بسیار کم بود (۳). با توجه به نتایج، نوع ریزنمونه می‌تواند قدرت پینه‌زایی و تولید تعلیق را تحت تأثیر قرار دهد. در گیاه چغندرقند پینه‌زایی با استفاده از 2,4-D بسیار موثرتر از NAA در همه ریزنمونه‌های مورد استفاده بوده و همچنین مقادیر کم سیتوکینین‌ها در محیط حاوی اکسین تأثیر مطلوبی بر پینه‌زایی داشته است (۱۲). در تحقیق حاضر نیز 2,4-D برای تشکیل تعلیق موثرتر از NAA عمل کرد.

طی تحقیقی، با استفاده از برگ‌های جوان *Gymnema sylvestre* در محیط MS حاوی ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D پینه‌زایی و سپس کشت تعلیقی سلولی انجام شد (۲۰). کشت تعلیقی سلولی با انتقال پینه‌های نرم حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل بابونه آلمانی به محیط کشت MS مایع حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر کینتین استقرار یافت. منحنی رشد سلولی بابونه آلمانی نشان داد که تکثیر سلول‌ها از روز چهارم به بعد شروع شده و تا روز سیزدهم ادامه می‌یابد. سپس رشد سلولی متوقف شده و کشت‌ها وارد مرحله ایستایی می‌شوند (۱۸). در مطالعه‌ای بر روی *Pinus taeda* L. گزارش شده که مقدار SCV تا روز بیستم بدون واکشت افزایش یافته و بعد ثابت باقی ماند که به‌دلیل توقف رشد در کشت سلول‌ها بود (۳۸). در شرایط مناسب، سلول‌های پینه در محیط تعلیق می‌توانند به رشد دایم و بدون تغییر خود به طور نامحدود و با سرعت بیشتری نسبت به سلول‌های پینه ادامه دهند (۲۵ و ۳۴). قطعات گره و برگ گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) به عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS تیمار شده با غلظت‌های مختلف 2,4-D و NAA در ترکیب با ۲/۲۲ میکرومولار BAP از لحاظ میزان پینه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که کاربرد هر دو تنظیم کننده رشد مذکور در القای پینه مؤثر هستند. همچنین مشخص شد که درصد پینه‌زایی در ریزنمونه‌های برگ بیشتر از ریزنمونه‌های قطعات گره است (۱۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های تحقیق می‌توان گفت اکسین‌ها جهت پینه‌زایی و تعلیق سلولی در گیاه چویل مهم می‌باشند. در این مطالعه مشاهده گردید هورمون NAA در حضور مقادیر کم از هورمون BAP باعث پینه‌زایی می‌شود و با افزایش غلظت اکسین NAA به ۲ میلی‌گرم در لیتر پینه‌زایی افزایش یافته است. همچنین مشخص گردید برای کشت تعلیقی سلولی دو هورمون NAA و 2,4-D در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه غلظت کم از هورمون BAP می‌تواند مفید واقع شود. لزوم وجود تنظیم کننده‌های اکسینی برای شروع پینه‌زایی در سایر گونه‌های علفی نیز مشاهده شده است (۱۴ و ۴۰). سیتوکینین‌ها به مقدار ناچیز برای پینه‌زایی و تولید کالوس موثر می‌باشند همان طور که در بسیاری گونه های دیگر استفاده از مقادیر اندک سیتوکینین توصیه شده است (۱۹ و ۲۸) در این تحقیق مشخص گردید که اکوتیپ‌های مختلف و حتی ریزنمونه‌های مختلف از یک اکوتیپ، از نظر واکنش به پینه‌زایی و تعلیق سلولی با هم تفاوت دارند و این تفاوت ممکن است ناشی از عوامل ژنتیکی یا عوامل محیطی گیاه مادری که بذر از آنها گرفته شده بود باشند چون شرایط آزمایشگاهی برای همه اکوتیپ‌های مورد مطالعه یکسان بود. در این مطالعه ریزنمونه برگی از اکوتیپ آبنهر به عنوان بهترین ریزنمونه و بهترین اکوتیپ از نظر واکنش به پینه‌زایی و تعلیق سلولی بود.

منابع

1–Abrazeh M. 2004. Investigation of some ecological characteristics of Chavil (*Ferulago angulata*) in protected Dena area. Ms.C thesis in Natural resources, Tarbiat Modarres University, Tehran. (In Persian)

2-Bhojwani S.S., and Razdan M.K. 1992. Plant tissue culture, Theory and practice. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo.

3-Daud Z., and Keng C.L. 2006. Effects of plant growth regulators on the biomass of embryogenic cells of *Cyperus aromaticus* (Ridly) Mattf and Kukenth. Biotechnology 5:75-78.

4-Darderafshi M.J., Bahrami G.h., Sadeghi E., Khanahmadi M., Mohammadi M., and Mohammadi R. 2014. The effect of *Ferulago angulata* essential oil on Staphylococcus aureus during the manufacture and preservation of Iranian white cheese. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology 8(4):13-20. (In Persian with English abstract)

5-Dixon R.A., and Gonzales R.A. 1996. Plant Cell Culture: A Practical Approach. 2nd Ed. IRL Press.

6-Ehsanpour A.A., and Amini F. 2003. Plant Cell and Tissue Culture. Jahad-Daneshgahi-Esfahan Publisher. (In Persian)

7-Evans D.E., Coleman J.O.D., and Kearns A. 2003. Plant cell culture: The basics. London, Taylor & Francis Publisher.

8-Farjaminezhad R., Zare N., Asghari-Zakaria R., and Farjaminezhad M. 2014. Establishment and optimization of cell growth in suspension culture of *Papaver bracteatum* a biotechnology approach for thebaine production. Turkish

Journal of Biology 37:689-697.
9-Farsi A.R., and Zulali J. 2014. Principles of plant biotechnology. Six Edition. Mashhad Ferdousi University Press. Iran. (In Persian)
10-Foladvand Z., Fazelinasab B., darikvand R., and Gasmi-pirbaloti A. 2014. Optimization of Callus Induction and Cell Suspension in *Catharanthus roseus*. Journal of Herbal Drugs, 5(3):157-163. (In Persian)
11-Ghasemian K.h., Nazeri S., Chehregani-Rad A., and Mirzaie-Asl A. 2012. The stages of somatic embryogenesis derived from zygotic embryo of *Dorema ammoniacum* D. Journal of Cell & Tissue (JCT) 3(1): 21-27. (In Persian with English abstract)
12-Gurel S., Gurel E., and Kaya Z. 2001. Callus development and indirect shoot regeneration from seedling of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. Turkish Journal of Botany 25: 25-33.
13-Hren M., Baebler S., Camloh M., Kovac M., Ravnikar M., and Zel J. 2006. Yew (*Taxus x media* Rehd.) cell suspension cultures as a source of taxanes. Acta Physiological Plantarum 28: 3-8.
14-Hussain Z., Haroon M., Bano R., Rashid H., and Chaudhry Z. 2010. Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. Pakistan Journal of Botany, 42:879-887.
15-Janarthanam B., Gopalakrishnan M., Lakshmi Sai G., and Sekar T. 2009. Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Tissue Culture and Biotechnology 19(2): 133-141.
16-Khalil S.M., and Elbanna A.A.M. 2003. Highly efficient somatic embryogenesis and plant regeneration via suspension cultures of banana (*Musa* spp.). Arab Journal of Biotechnology 7: 99-110.
17-Khawar K.M., Sarihan E.O., Sevimay C.S., Cocu S., Parmaksiz I., Uranbey S., Ipek A., Kaya M.D., Sancak C., and Özcan S. 2005. Adventitious shoot regeneration and Micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Periodicum Biologorum 107:57–61.
18-Koohi L., Zare N., Asgari-zakaria R., Sheikhzadeh-Mosaddeg P., and Daryani P. 2013. The role of plant growth regulators and different explants on the tissue culture response and cell suspension in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Journal of Crop Ecophysiology 2 (30): 203-214. (In Persian with English abstract)
19-Kwon T.H., Abe T., and Sasahara T. 1993. Efficient callus induction and plant regeneration in *Sesamum* species. Plant Tissue and Culture Letters 10: 260-266.
20-Lee E., Mobin M., Hahn E.J., and Paek K.Y. 2006. Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on cell growth of *Gymnema sylvestre*. Journal of Plant Biology 49: 427-431.
21-Lukmanul Hakkim F., Kalyani S., Essaa M., Girija S., and Song H. 2011. Production of rosmarinic acid in *Ocimum sanctum* (L.) cell suspension cultures by the influence of growth regulators. International Journal of Biological and Medical Research 2(4): 1158-1161.
22-Molina S.M. 2004. *In vitro* callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. Plant and Tissue Culture 14: 167-172.
23-Mortazavi R., Dehdari M., and Masoumiasl A. 2016. Study of Callus Induction of Medicinal Chavil Plant (*Ferulago angulata* B.) Using Types of Explants and Growth Regulators. Agricultural Biotechnology 14(2): 73-80. (In Persian with English abstract)
24-Mozaffarian V. 2007. Iranian Plant Culture Names. First Volume, First edition, Farhang-e- Moaser Publisher. Tehran, Iran. (In Persian)
25-Mujib A., Bandhyopadhyay S., and Ghosh P.D. 2000. Tissue culture derived plantlet variation in *Caladium* an important ornamental. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 149-155.
26-Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum 15: 473-497.
27-Mythili J.B., and Thomas P. 1999. Micropropagation of Pointed Gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). Scientia Horticulture 79: 87-90.
28-Ozgen M., Turet M., Altinok S., and Sancak C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Reports 18: 331-335.
29-Palai S.K., Rout G.R., and Das P. 1997. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.): interaction of growth regulators and culture conditions. Proceeding of Biotechnology of Spices, Medicinal and Aromatic Plants, Kerala, 20–24.
30-Perez-Bermudez P., Cornejo M.J., and Segura J. 1983. *In vitro* propagation of *Digitalis obscura* L. Plant Science Letters 30: 77-82.
31-Phillips G.C., Hubstenberger J.F., and Hansen E.E. 1995. Plant regeneration by organogenesis from callus and cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Heidelberg: Springer and Verlag, 67-78.
32-Ramirez-Malagon R., Borodanenco A., Barrera-Guerra J.L., and Ochoa-Alejo N. 2001. Shoot number and shoot size as affected by growth regulators in *in vitro* Cultures of *Spathiphyllum floribundum* L. Scientia Horticulture 89: 227-236.
33-Richard D., Lescot M., Inze D., and De Veylder L. 2002. Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene

expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 167-176.
34-Senoussi M.M., Nora B., and Joe C. 2009. Impact of hypoxia on the growth and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension. Acta Physiologiae Plantarum 31: 359–362.
35. Sarabadani-tafreshi R., Omidi M., Bihamta M.R., and Davazdahemami S. 2008. Study of in vitro embryo culture and Effect of explants, different hormonal levels on callus induction and shooting of Ferula gummosa. Journal of Medicinal Plants 27: 71-81. (In Persian)
36-Shahadati-Moghadam Z. 2001. Plant growth regulators. M.Sc. Thesis of agriculture, Mazandaran University, Iran. (In Persian)
37-Sorbi E., Moradi a., Masoumiasl A., and Balochi H.R. 2017. Optimization of Callus Induction and somatic embryogenesis in twoGenotypes of medicinal Chavil plant (*Ferulago angulata* L.). Plant Production Research 21(3): 41-62. (In Persian)
38-Silveira V., Floh E.I.S., Handro W., and Pedro Guerra M. 2004. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 53-60.
39-Street H.E. 1977. Plant tissue and cell culture. 2nd Edition, Blackwell. Oxford.
40-Taha H.S., El-Bahr M.K., and Seif-El-Nasr M.M. 2008. *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: 1- calli Production, direct shootlets Regeneration and alkaloids determination. Journal of Applied Science Research 4: 1017-1022.
41-Taran M., Ghasempour H.R., and Shirinpour E. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* subsp. Carduchorum. Jundishapur Journal of Microbiology 3: 10-4. (In Persian)
42-Zare A., Solouki R., Omidi M., Irvani M., Mahdi-Nezad N., and Rezazadeh S.H. 2010. Callus induction and plant regeneration in *Ferula assa-foetida* L. (Asafetida), an endangered medicinal plant. Trakia Journal of Sciences 8(1): 11-18.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.3, Fall 2019, P. 525-536
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۵۳۶-۵۲۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

The Role of Ecotype, Explant and Plant Growth Regulators on Cell Suspension Culture of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss.

S.M. Alavi[1]- A. Masoumiasl[2*]- N. Zare[3]- R. Asghari Zakaria[4]- P. Sheikhzade Mosaddegh[5]

Received: 02-03-2019
Accepted: 27-08-2019

Introduction: The main habitat of Chavil, *Ferulago angulata*, in Iran is Zagros area. This plant has a rejuvenating effect and is used to treat digestive diseases and intestinal worms. Because the different explants show different amounts of callogenesis under the effect of different growth regulators, selection of an optimal explant and suitable plant growth regulators combination has a significant effect on the production of callus and their suspension culture. There is no reports on *Ferulago angulata* callogenesis and its cell suspension culture. Therefore, this study was designed and implemented to optimize callus production and cell suspension culture in this important medicinal plant.

Materials and Methods: Seeds of Chavil were collected from four different habitats in Kohgilooyeh and BoyerAhmad Province in Southwest of Iran include Abenahr, Guayoune, Vezg and Sisakhat. Seedlings obtained from embryo culture were used to prepare the explants. Various explants (leaf, root and stem) were cultured on MS medium supplemented with different concentrations (0, 0.5, 1 and 2 mgl^{-1}) of NAA and BAP. Callus traits were evaluated and from the best culture medium, the best explants and the best PGRs composition for callogenesis of each ecotype were used to cell suspension culture. In order to study the growth rate of cells in suspension culture and plotting the curve of cells growth, two cell density indices and packed cell volume index were evaluated. To determine the cell density index, every 3 days, 10 ml of cell suspension were transferred to the graded falcon and centrifuged at 5000 g for 5 minutes, and the percentage of sediment cells was calculated as the total volume. To determine the packed cell volume index, also every 3 days, 10 ml of culture medium containing cells were transferred to the graded falcon and stored for 30 minutes to precipitate cells and cell masses. Finally, the cell volume was recorded and was calculated as percentage of the total collected medium.

Results and Discussion: According to the callogenesis percentage, the best ecotype is Abenahr and best explant is leaf explant. The highest level of NAA is 2 mgl^{-1}, and the best level of BAP is 2 mgl^{-1}, which causes 100 callogenesis percentage. The best medium for cell suspension culture is MS medium containing 2 mgl^{-1} NAA and 0.5 mgl^{-1} BAP for callus was obtained from leaf explant of Abenahr ecotype. Along with these plant growth regulators, 2,4-D was used in combination with BAP to form suspension culture. The results also showed that 2 mgl^{-1} 2,4-D plus 0.5 mgl^{-1} BAP were useful in producing suspensions. The difference between 2,4-D +BAP and NAA + BAP combinations more cell volumes were observed, and cell suspension was created at a faster rate and in less time, which is an advantage in research work. Growth rate of cell suspension originated from the leaf explant was higher than root explant. In terms of culturing cell suspension, the Abenahr ecotype was favorable compared to other ecotypes. During cell suppression culture of *Cyperus aromaticus* by applying different levels of NAA, cell growth was increased up to 3 weeks after application, and then decreased. By applying 2,4-D, cell growth also increased until the third week, and after the third week, cell growth declined, which was very low growth rate compared with the NAA. In cell suspension culture of sugar beet, using 2,4-D was much more effective than NAA on all explants. In the present study, 2,4-D was also more effective than NAA for cell suspension culture of Chavil.

Conclusion: In general, the Abenahr was the best ecotype among of investigated. The explants in both callus culture and the suspension culture, and the best combination of plant growth regulator in both culture was 2 mgl^{-1} NAA plus 0.5 mgl^{-1} BAP.

Keywords: Callus, Genotype, PCV, Plant growth regulator, SCV

1, 3, 4 and 5- Ph.D. Student, Associate Professors and Assistant Professor of Department of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, respectively.
2- Associate Professor of Department of Agriculture, Yasouj University
(*- Corresponding Author Email: Masoumiasl@yu.ac.ir)