

بهینه‌سازی ریزازدیادی دو گونه چویل بومی و در معرض انقراض ایران (*Ferulago subvelutina* Rech.f. and *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss)

رسول نریمانی^۱، لیلا سمیعی^۲ و محمد مقدم^{۳*}

۱- دانش آموخته دکتری، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استادیار، گروه گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

*۳- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

پست الکترونیکی: m.moghadam@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

چکیده

گیاه دارویی چویل (*Ferulago* spp.) متعلق به تیره چتریان و بومی ایران است. گونه‌های این جنس به دلیل برداشت بی‌رویه و تنش‌های محیطی از قبیل خشکسالی به شدت در معرض انقراض هستند. با در نظر گرفتن این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی-مرتعی ارزشمند، تولید و احیای آن امری ضروری محسوب می‌شود. این تحقیق با هدف بهینه‌سازی ریزازدیادی دو گونه بومی چویل شامل *Ferulago angulata* و *Ferulago subvelutina* انجام شد. بیشترین درصد پینه‌زایی در گونه *F. angulata* (۱۰۰ درصد) با کاربرد ریزنمونه ریشه‌چه (تحت تیمارهای $1 \text{ mg/L NAA} + 1 \text{ mg/L BAP}$ ، $5 \text{ mg/L NAA} + 1 \text{ mg/L BAP}$ ، $5 \text{ mg/L NAA} + 2 \text{ mg/L NAA}$) و در گونه *F. subvelutina* (تحت تیمارهای $5 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BAP}$ ، $5 \text{ mg/L NAA} + 1 \text{ mg/L BAP}$) و در گونه *F. subvelutina* (تحت تیمارهای $5 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BAP}$ ، $5 \text{ mg/L NAA} + 2 \text{ mg/L NAA}$) با کاربرد ریزنمونه برگ حقیقی (تحت تیمارهای $5 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BAP}$ ، $5 \text{ mg/L NAA} + 1 \text{ mg/L BAP}$) به ترتیب به میزان $72/33$ و $71/66$ درصد حاصل شد. به نحوی که کاربرد توأم هورمون‌های سیتوکینین و اکسین در باززایی گونه‌های چویل مؤثر واقع شد؛ به طوری که بیشترین باززایی در گونه *F. angulata* به ترتیب به مقدار $53/33$ و $46/66$ درصد تحت تیمارهای $5 \text{ mg/L NAA} + 2 \text{ mg/L BAP}$ و $5 \text{ mg/L NAA} + 4 \text{ mg/L BAP}$ بوده و در گونه *F. subvelutina* با میزان $53/33$ و 60 درصد به ترتیب در تیمارهای $5 \text{ mg/L NAA} + 2 \text{ mg/L BAP}$ و $5 \text{ mg/L NAA} + 4 \text{ mg/L BAP}$ حاصل شد. بهترین تیمار ریشه‌زایی برای هر دو گونه، محیط کشت $1/2 \text{ MS}$ شامل 0.5 mg/L IBA انتخاب شد. مرحله سازگاری در مخلوطی از خاک، خاک پیت و ماسه با نسبت وزنی ۱:۱:۱ انجام شد که در مجموع ۸۰ درصد از گیاهان تولیدشده از کشت بافت، در محیط بیرون با موفقیت سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: در معرض انقراض، پینه، باززایی، کشت درون شیشه‌ای، ریزنمونه، تنظیم‌کننده رشد

مقدمه

غیراصولی، کاهش زیستگاه‌ها و تغییر کاربری آنها در نتیجه عملیات کشاورزی، توسعه شهرها، افزایش تقاضای بازار و تجارت کنترل نشده، افزایش جمعیت بشر و تغییرات

امروزه گیاهان دارویی در مناطق مختلف جهان به دلیل بهره‌برداری بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی، برداشت تخریبی و

از حد دام، این گیاه را به طور جدی در معرض انقراض قرار داده است (Jalili & Jamzad, 1999; Rezazadeh et al., 2003). کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی برای حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا گونه‌های در حال انقراض طبیعت (منابع باارزش ژرم‌پلاسم) محسوب شود (Arikat et al., 2004). تکثیر گیاهان و درختان با تکنیک ریزازدیادی در آینده می‌تواند با سرعتی متناسب با سرعت تخریب برای کشت و تجدید حیات دوباره مراتع و جنگل‌ها مورد استفاده قرار گیرد. آنچه باعث برتری این روش بر سایر روش‌ها می‌باشد، سرعت تکثیر و امکان کاربرد آن در مورد گیاهان بالغ مسن است (Caboni et al., 2010). Alavi و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که کشت رویان در محیط کشت Murashige and Skoog (MS) ¼ در سبب رفع سریع و مؤثر خفتگی بذر گیاه چویل *F. angulata* گردید و در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی، اکوتیپ گایونه بیشترین درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را روی محیط ¼MS نشان داد (Alavi et al., 2020). در پژوهشی دیگر برای تکثیر چویل از جنین‌زایی سوماتیکی استفاده شد که حداکثر جنین‌زایی سوماتیکی در محیط کشت MS با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D از طریق ریزنمونه‌های مشتق از هیپوکوتیل به‌دست آمد (Naghdi Badi et al., 2017).

به دلیل پراکنش اکولوژیکی محدود این گیاه، تجدید حیات طبیعی ضعیف و مشکلات تکثیر با بذر، چویل در لیست گیاهان دارویی در معرض تهدید قرار دارد. این پژوهش با هدف رسیدن به شیوه‌نامه تکثیر، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی نوساقه این گیاه را در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بررسی کرده تا نتایج آن مورد استفاده پژوهشگران و بخش‌های اجرایی و خصوصی کشور قرار گیرد. بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی اثر گونه و مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر تشکیل پینه و شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در محیط درون شیشه‌ای طراحی شد.

اقتصادی - اجتماعی، در معرض تهدید و انقراض قرار دارند که این موضوع در درازمدت منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در این گونه‌ها شده است (Okonkwo, 2015). از جمله گیاهان در معرض انقراض، گونه‌های مختلف جنس چویل (*Ferulago ssp.*) می‌باشد (Eyog-Matig et al., 2007). گیاه دارویی چویل دارای گونه‌های چندساله بوده که متعلق به خانواده چتریان است. اسانس موجود در بذر و سرشاخه‌های هوایی این گیاه در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی با ارزش است. در صنایع دارویی به دلیل خاصیت ضد عفونی‌کنندگی، تقویت‌کنندگی و تسکین‌دهندگی و درمان بیماری‌های گوارشی و کرم‌های روده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Abrazezh, 2003). اسانس *F. angulata* به عنوان یک نگهدارنده در غذا و کره حیوانی استفاده می‌شود (Taran et al., 2010; Ghasempour et al., 2007). مطالعات اخیر نشان داده است که *F. angulata* توانایی جذب فلزات سنگین مانند کادمیوم، روی و نیکل را دارد و همچنین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در رفع سمیت فلزی عمل می‌کند (Asgari & Rafieian-Kopaei, 2015; Jallilian & Ziarati, 2016). البته، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس (Hosseini et al., 2012; Pirbalouti et al., 2013; Hosseini et al., 2015) و عصاره (Golfakhrabadi et al., 2015) نیز در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شده است. مطالعات، اثربخشی این گیاه را در مدل‌های حیوانی آمیازیس و آسیب مغزی (Hritcu et al., 2015)، بیماری آلزایمر (Dhivya et al., 2014; Hajimehdipoor et al., 2015) و بیماری پارکینسون (Golfakhrabadi et al., 2014; Mahmoudi et al., 2018; Sharifi et al., 2015) نشان داده است. اثرهای ترکیبات *F. angulata* بر سیستم عصبی مربوط به مونوترپن‌های خاصی مانند α -pinene، β -pinene، β -phellandrene و β -phellandren است (Mirzapour et al., 2015).

جنس چویل پراکنش وسیعی در ایران به‌ویژه در شمال و شمال‌غرب کشور دارد که بهره‌برداری بی‌رویه به‌علت ارزش دارویی و تخریب رویشگاه‌های طبیعی به دلیل چرای بیش

مواد و روش‌ها

۱- جمع‌آوری بذر و تهیه ریزنمونه

این پژوهش در آزمایشگاه ریزافزایی گیاهی، پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۸ انجام شد. برای مطالعه ریزازدیادی دو گونه چویل

شامل *F. angulata* و *F. subvelutina*، بذرهای این گیاهان پس از شناسایی و تأیید جمعیت‌ها در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی از رویشگاه طبیعی آن جمع‌آوری (جدول ۱) و به آزمایشگاه ریزافزایی برای ادامه آزمایش منتقل شد.

جدول ۱- مشخصات هرباریومی بذرهای جمع‌آوری شده گونه‌های چویل *F. angulata* و *F. subvelutina*

در استان خراسان رضوی و خراسان شمالی

Table 1. Herbarium characteristics of collected seeds of *F. angulata* and *F. subvelutina* species in Razavi Khorasan and North Khorasan provinces

نام گونه	محل نمونه‌برداری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
Name of species	Collection sites	Altitude (m)	Longitude	Latitude
<i>F. subvelutina</i>	بجنورد- گیفان- ایزمان سفلی Bojnourd- Gifan- Izmane sofla	1184	57°49' E	37°85' N
<i>F. angulata</i>	کاشمر- گردنه ریوش Kashmar- Rivash Pass	1441	58°27' E	35°21' N

بر پایه طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار و ۵ ریزنمونه در هر تکرار پایه‌ریزی گردید که فاکتورهای آزمایش شامل نوع ریزنمونه (ریزنمونه‌های ریشه، برگ حقیقی و برگ‌های پهای) و نوع محیط کشت (تنظیم‌کننده رشد BAP و NAA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به صورت منفرد و ترکیب با همدیگر) بودند (جدول ۲). پس از گذشت یک ماه از کشت ریزنمونه، درصد پینه‌زایی، وزن تر و وزن خشک پینه اندازه‌گیری شد. درصد پینه‌زایی ریزنمونه براساس تولید پینه در هر ریزنمونه تعیین شد. وزن تر پینه با ترازوی دقیق اندازه‌گیری گردید. وزن خشک پینه پس از قرارگرفتن پینه در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

۳- باززایی غیرمستقیم

برای ادامه آزمایش و انجام باززایی غیرمستقیم، از پینه‌های حاصل از برگ‌های پهای (که دارای پینه سبز، ترد و شکل ظاهری قابل قبولی بودند) استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار که هر تکرار دارای ۵ ریزنمونه

برای ضدعفونی بذرها از تیمار شستشو با آب جاری (۳۰ دقیقه) + ۱ دقیقه الکل اتیلیک ۷۰ درصد + ۱۵ دقیقه وایتکس ۲ درصد + شستشو با آب مقطر سترون + ۵۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم (افزوده شده به محیط کشت) استفاده گردید و برای جوانه‌زنی بذرها و رفع خواب آنها از تیمار ۴۸ ساعت آبشویی + ۶۰ روز سرمادهی استفاده شد.

در این پژوهش از محیط کشت MS در مراحل مختلف آزمایش استفاده گردید (Murashige & Skoog, 1962). ساکارز به مقدار ۳۰ گرم بر لیتر و آگار ۸ گرم بر لیتر به محیط کشت اضافه شد و پس از حل شدن آگار و شفاف شدن محیط کشت، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت در ظروف شیشه‌ای مورد نظر توزیع گردید و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد.

۲- پینه‌زایی

پس از به دست آوردن تعداد کافی گیاهچه سترون، مرحله بعدی (پینه‌زایی) انجام شد. این قسمت از آزمایش به صورت فاکتوریل

بود، انجام گردید که در آن از پینه‌های یکسان با تیمار هورمونی BA (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و ۰/۵ mg/L BA + ۰/۲mg/L NAA + ۱ mg/L BA و ۱ mg/L BA + ۰/۲mg/L NAA (جدول ۳).

جدول ۲- تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در آزمایش برای بررسی صفات مربوط به پینه‌زایی

Table 2. Growth regulators used in the experiment to evaluate the traits of callus induction

شماره تیمار Number of treatment	نوع تیمار هورمونی Type of hormone treatment	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)	شماره تیمار Number of treatment	نوع تیمار هورمونی Type of hormone treatment	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)
1	NAA + BAP	0 + 0	14	NAA + BAP	1.5 + 1
2	NAA + BAP	0.5 + 0	15	NAA + BAP	2 + 1
3	NAA + BAP	1 + 0	16	NAA + BAP	0 + 1.5
4	NAA + BAP	1.5 + 0	17	NAA + BAP	0.5 + 1.5
5	NAA + BAP	2 + 0	18	NAA + BAP	1 + 1.5
6	NAA + BAP	0 + 0.5	19	NAA + BAP	1.5 + 1.5
7	NAA + BAP	0.5 + 0.5	20	NAA + BAP	2 + 1.5
8	NAA + BAP	1 + 0/5	21	NAA + BAP	2 + 0
9	NAA + BAP	1.5 + 0.5	22	NAA + BAP	0 + 2
10	NAA + BAP	2 + 0.5	23	NAA + BAP	1 + 2
11	NAA + BAP	0 + 1	24	NAA + BAP	1.5 + 2
12	NAA + BAP	0.5 + 1	25	NAA + BAP	2 + 2
13	NAA + BAP	1 + 1			

جدول ۳- مشخصات تیمارهای مورد استفاده در آزمایش برای انجام باززایی غیرمستقیم

Table 3. Specifications of treatments used in the experiment to perform indirect regeneration

شماره تیمار Number of treatment	نوع تیمار هورمونی Type of hormone treatment	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)
1	BA	0.5
2	BA	1
3	BA	1.5
4	BA	2
5	NAA+ BA	0.2+0.5
6	NAA+ BA	0.4+0.5
7	NAA+ BA	0.2+1
8	NAA+ BA	0.4+1

۴- ریشه‌زایی (گیاهچه‌های باززایی شده)

برای بررسی ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها، گیاهچه‌های باززایی شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار که در هر تکرار ۵ ریزنمونه کشت شده در دو محیط کشت پایه مختلف، ۱/۲ و غلظت کامل MS حاوی هورمون IBA (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و نیز محیط کشت فاقد هورمون (شاهد) قرار داده شدند. چهار هفته پس از کاشت پارامترهای لازم از قبیل

درصد ریشه‌زایی و طول ریشه‌ها ثبت شد.

۵- سازگاری

برای سازگاری، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت خود و در ویال‌هایی که درب آنها نیمه باز نگه‌داشته شده، به مدت ۶ هفته در اتاقک رشد و در شرایط دمایی 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت جریان

برای داده‌های درصدی نیز از تبدیل داده Arcsin برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

نتایج

۱- پینه‌زایی

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل نوع ریزنمونه و تیمار هورمونی بر صفات مربوط به پینه‌زایی از قبیل درصد پینه‌زایی، وزن تر پینه و وزن خشک پینه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار نوع ریزنمونه و تیمارهای هورمونی بر درصد پینه‌زایی بود؛ به طوری که در گونه *F. angulata* ریزنمونه برگ حقیقی و ریشه بیشترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) را داشتند.

فتون فتوسنتزی ($PPFD = 40 \mu mol m^{-2}s^{-1}$) نگهداری شدند. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از محیط‌های کشت با احتیاط و به کمک پنس خارج شده و پس از شست‌وشوی آرام ریشه‌ها با جریان آب و حذف آگار، گیاهچه‌ها به صورت مستقیم در مخلوطی از خاک، خاک پیت و ماسه با نسبت وزنی، ۱:۱:۱ در گلخانه نگهداری شد.

۶- تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش براساس طرح آماری استفاده شده، با استفاده از نرم‌افزار JMP13 تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید. رسم شکل‌ها و برخی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد.

جدول ۴- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در آزمایش پینه‌زایی ریزنمونه‌ها تحت شرایط تیمارهای هورمونی مختلف

Table 4. Analysis of variance for studied traits in callus induction of explants under different hormone treatments

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	Mean square میانگین مربعات					
		<i>F. angulata</i>			<i>F. subvelutina</i>		
		درصد پینه‌زایی Callus induction %	وزن تر پینه (میلی‌گرم) Callus fresh weight (mg)	وزن خشک پینه (میلی‌گرم) Callus dry weight (mg)	درصد پینه‌زایی Callus induction %	وزن تر پینه (میلی‌گرم) Callus fresh weight (mg)	وزن خشک پینه (میلی‌گرم) Callus dry weight (mg)
ریزنمونه Explant	2	7.58 ^{ns}	1320**	9090**	635.231**	350**	310**
تیمار هورمونی Hormone	24	5131.88**	3570**	1890**	2719.36**	2580**	1080**
ریزنمونه × هورمونی Explant × Hormone	48	1722.71**	1240**	801**	1341.07**	1160**	570**
خطا Error	150	16.64	12.00	9.00	4.16	2.00	1.00

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and ** = nonsignificant and significant at the 5 and 1% probability levels, respectively

۱ mg/L BAP + ۲ NAA نشان داد که تفاوت معنی‌داری با تیمار هورمونی ۰/۵ mg/L BAP + ۱ mg/L NAA و ۰/۵ mg/L BAP + ۱ mg/L NAA نداشت. در گونه *F. subvelutina* ریزنمونه برگ حقیقی نسبت به ریزنمونه‌های دیگر واکنش بهتری نسبت به تیمارهای هورمونی و پینه‌زایی نشان داد، به طوری که

ریزنمونه ریشه دارای پینه‌زایی ۱۰۰ درصد در تیمارهای ۰ mg/L BAP + ۱ mg/L NAA، ۰ mg/L BAP + ۱ mg/L NAA و ۰/۵ mg/L BAP + ۲ mg/L NAA بود و ریزنمونه برگ حقیقی بیشترین پینه‌زایی (۱۰۰ درصد) را در تیمار هورمونی ۰/۵ mg/L BAP + ۰/۵ mg/L NAA و ۰/۵ mg/L BAP + ۰/۵ mg/L NAA

بیشترین میزان پینه‌زایی در این گونه مربوط به ریزنمونه برگ حقیقی در تیمار هورمونی ۰/۵mg/L NAA + ۰/۵mg/L BAP به ترتیب با میزان ۷۲/۳۳ و ۷۱/۶۶ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با ریزنمونه ریشه در تیمار هورمونی ۱mg/L NAA + ۰ mg/L BAP با میزان پینه‌زایی ۷۰ درصد نداشت (جدول ۵ و شکل ۴).

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های برگ حقیقی، برگ لپه‌ای و ریشه دو گونه *F. subvelutina* و *F. angulata*

تحت تیمارهای هورمونی مختلف

Table 5. Mean comparison of percentage of callus induction from true leaf, cotyledon leaf and root explants of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments

شماره تیمار Number of treatment	نوع تیمار هورمونی Type of hormone treatment	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)	درصد پینه‌زایی ریزنمونه برگ حقیقی Callus induction from true leaf explant (%)		درصد پینه‌زایی ریزنمونه برگ لپه‌ای Callus induction from cotyledonleaf explant (%)		درصد پینه‌زایی ریزنمونه ریشه Callus induction from root explant (%)	
			<i>F.ang</i> #	<i>F.sub</i>	<i>F.ang</i>	<i>F.sub</i>	<i>F.ang</i>	<i>F.sub</i>
1	NAA + BAP	0 + 0	0.0 ^z	0.0 ^x	0.0 ^z	0.0 ^x	0.0 ^x	0.0 ^x
2	NAA + BAP	0 + 0.5	13.7 ^{yz}	0.0 ^x	0.0 ^z	0.0 ^x	77.8 ^d	54.3 ^e
3	NAA + BAP	1 + 0	17 ^{w-z}	0.0 ^x	34.1 ^{qf}	20.7 ^{stu}	100 ^a	70 ^{ab}
4	NAA + BAP	1.5 + 0	49.3 ^{lm}	37.7 ^{klm}	18.6 ^{v-y}	0.0 ^x	100 ^a	67.7 ^{bc}
5	NAA + BAP	2 + 0	46.6 ^{lmn}	35.2 ^{mno}	42.5 ^{no}	27.5 ^q	100 ^a	62.7 ^d
6	NAA + BAP	0 + 0.5	26.8 ^{stu}	0.0 ^x	24.4 ^{uvw}	0.0 ^x	21.7 ^{uvw}	0.0 ^z
7	NAA + BAP	0.5 + 0.5	100 ^a	72.3 ^a	90.6 ^{bc}	66.3 ^c	75 ^{de}	45 ^{ghi}
8	NAA + BAP	1 + 0.5	93.7 ^{ab}	66.8 ^{bc}	60.7 ^{ghi}	40.1 ^{kl}	50.3 ^{klm}	23.4 ^{rs}
9	NAA + BAP	1.5 + 0.5	56.4 ^{ijk}	47.7 ^{fg}	70 ^{ef}	38.3 ^{klm}	41.1 ^{nop}	20 ^{tu}
10	NAA + BAP	2 + 0.5	69 ^{ef}	55.1 ^e	69.9 ^{ef}	33.3 ^o	45.8 ^{mno}	20.4 ^{stu}
11	NAA + BAP	0 + 1	14.5 ^{xyz}	0.0 ^x	16.2 ^{w-z}	0.0 ^x	11.8 ^{yz}	0.0 ^x
12	NAA + BAP	0.5 + 1	66.9 ^{fg}	55.7 ^e	66.3 ^{fg}	37.6 ^{klm}	22.7 ^{uvw}	0.0 ^x
13	NAA + BAP	1 + 1	65.6 ^{fg}	55.1 ^e	58.6 ^{ghi}	33 ^{op}	65.8 ^{fg}	36.8 ^{lmn}
14	NAA + BAP	1.5 + 1	61.3 ^{ghi}	49.1 ^f	35.1 ^{pqr}	21 ^{r-u}	20.9 ^{u-x}	0 ^x
15	NAA + BAP	2 + 1	100 ^a	71.7 ^a	89 ^{bc}	50 ^f	45.7 ^{mno}	29.8 ^{pq}
16	NAA + BAP	0 + 1.5	0.0 ^z	0.0 ^x	0.0 ^z	0.0 ^x	0.0 ^z	0.0 ^x
17	NAA + BAP	0.5 + 1.5	23.8 ^{uvw}	14.8 ^v	32.6 ^{rs}	15.2 ^v	66.4 ^{fg}	42.4 ^{hij}
18	NAA + BAP	1 + 1.5	94.8 ^{ab}	67.7 ^{bc}	39.9 ^{opq}	22.9 ^{rst}	64.4 ^{fgh}	45.7 ^{gh}
19	NAA + BAP	1.5 + 1.5	18.5 ^{v-y}	10.3 ^w	70.6 ^{ef}	42.7 ^{hij}	91.1 ^{bc}	61.7 ^d
20	NAA + BAP	2 + 1.5	56.1 ^{ijk}	40 ^{mn}	65.5 ^{fg}	40.3 ^{jk}	26.3 ^{stu}	10 ^w
21	NAA + BAP	0 + 2	0.0 ^z	0.0 ^x	0.0 ^z	0.0 ^x	0.0 ^z	0.0 ^x
22	NAA + BAP	0.5 + 2	24.1 ^{uvw}	0.0 ^x	42.2 ^{no}	27.5 ^q	18.3 ^{v-z}	0.0 ^x
23	NAA + BAP	1 + 2	44.3 ^{mno}	23.1 ^r	56.8 ^{ijk}	32 ^p	29.4 ^{rst}	17.8 ^{uv}
24	NAA + BAP	1.5 + 2	46.5 ^{lmn}	33.8 ^{no}	56.3 ^{ijk}	31.5 ^p	21.2 ^{uvw}	0 ^x
25	NAA + BAP	2 + 2	53 ^{kl}	37.3 ^{klm}	86.8 ^c	62.3 ^d	35.6 ^{pqr}	21.1 ^{r-u}

F. angulata و *F. subvelutina* به ترتیب

F.ang # and F.sub, *F. angulata* and *F. subvelutina*, respectively

وزن تر پینه در گونه *F. angulata* در ریزنمونه ریشه و تیمار هورمونی ۱mg/L NAA + ۰mg/L BAP با میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داد (جدول ۶) که تفاوت معنی‌داری با تیمار هورمونی ۱mg/L NAA + ۰mg/L BAP بود (جدول ۶).

وزن تر پینه در گونه *F. angulata* در ریزنمونه ریشه و تیمار هورمونی ۱mg/L NAA + ۰mg/L BAP با میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بیشترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داد (جدول ۶) که تفاوت معنی‌داری با تیمار هورمونی ۱mg/L NAA + ۰mg/L BAP بود (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین وزن تر پینه ریزنمونه‌های برگ حقیقی، برگ لپه‌ای و ریشه دو گونه *F. angulata* و *F. subvelutina*

تحت تیمارهای هورمونی مختلف

Table 6. Mean comparison of callus fresh weight from true leaf, cotyledon leaf and root explants of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments

شماره تیمار Number of treatment	نوع تیمار هورمونی Type of hormone treatment	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)	وزن تر پینه ریزنمونه برگ لپه‌ای (میلی‌گرم) Callus fresh weight cotyledon leaf explant (mg)		وزن تر پینه ریزنمونه برگ حقیقی (میلی‌گرم) Callus fresh weight true leaf explant (mg)		وزن تر پینه ریزنمونه ریشه (میلی‌گرم) Callus fresh weight root explant (mg)	
			<i>F.ang</i> #	<i>F.sub</i>	<i>F.ang</i>	<i>F.sub</i>	<i>F.ang</i>	<i>F.sub</i>
			1	NAA + BAP	0 + 0	0.0 ^s	0.0 ^z	0 ^s
2	NAA + BAP	0.5 + 0	0.0 ^s	0.0 ^z	10 ^f	0.0 ^z	73 ^e	63 ^e
3	NAA + BAP	1 + 0	23 ^{op}	9 ^y	20 ^{pq}	0.0 ^z	100 ^a	82 ^a
4	NAA + BAP	1.5 + 0	20 ^{pq}	0.0 ^z	33 ^{lm}	24 ^{vw}	83 ^{cd}	74 ^c
5	NAA + BAP	2 + 0	20 ^{pq}	9 ^y	30 ^{mn}	19 ^x	80 ^d	68 ^d
6	NAA + BAP	0 + 0.5	50 ^{gh}	0.0 ^z	20 ^{pq}	0.0 ^z	20 ^{pq}	0.0 ^z
7	NAA + BAP	0.5 + 0.5	73 ^e	61 ^e	70 ^e	61 ^e	70 ^{jk}	30 ^{nop}
8	NAA + BAP	1 + 0.5	60 ^f	49 ^h	70 ^e	57 ^f	33 ^{lm}	28 ^{t-w}
9	NAA + BAP	1.5 + 0.5	80 ^d	68 ^d	53 ^g	44 ⁱ	33 ^{lm}	28 ^{t-w}
10	NAA + BAP	2 + 0.5	63 ^f	53 ^g	50 ^{gh}	41 ^j	27 ^{no}	17 ^x
11	NAA + BAP	0 + 1	10 ^f	0 ^z	10 ^f	0 ^z	7/6 ^f	0.0 ^z
12	NAA + BAP	0.5 + 1	20 ^{pq}	12 ^{xy}	20 ^{pq}	15 ^{xy}	10 ^f	0.0 ^z
13	NAA + BAP	1 + 1	20 ^{pq}	15 ^{xy}	17 ^q	12 ^y	20 ^{pq}	8.0 ^y
14	NAA + BAP	1.5 + 1	30 ^{mn}	19 ^x	23 ^{op}	18 ^x	10 ^f	0.0 ^z
15	NAA + BAP	2 + 1	37 ^{kl}	25 ^{s-v}	30 ^{mn}	24 ^{vw}	10 ^f	6 ^y
16	NAA + BAP	0 + 1.5	0.0 ^s	0.0 ^z	0.0 ^s	0.0 ^z	0.0 ^s	0.0 ^z
17	NAA + BAP	0.5 + 1.5	40 ^{jk}	27 ^{q-t}	40 ^{jk}	26 ^{t-u}	33 ^{lm}	23 ^{vw}
18	NAA + BAP	1 + 1.5	40 ^{jk}	25 ^{s-v}	50 ^{gh}	40 ^j	37 ^{kl}	27 ^{qrs}
19	NAA + BAP	1.5 + 1.5	40 ^{jk}	29 ^{opq}	30 ^{mn}	22 ^w	33 ^{lm}	31 ^{mno}
20	NAA + BAP	2 + 1.5	40 ^{jk}	32 ^{mn}	47 ^{hi}	34 ^{kl}	30 ^{mn}	15 ^x
21	NAA + BAP	0 + 2	0.0 ^s	0.0 ^z	0.0 ^s	0.0 ^z	0.0 ^s	0.0 ^z
22	NAA + BAP	0.5 + 2	40 ^{jk}	24 ^{t-v}	40 ^{jk}	0.0 ^z	47 ^{hi}	0.0 ^z
23	NAA + BAP	1 + 2	40 ^{jk}	23 ^{uvw}	43 ^{hi}	34 ^{kl}	93 ^b	73 ^c
24	NAA + BAP	1.5 + 2	43 ^{ij}	33 ^{klm}	50 ^{gh}	42 ^{ij}	87 ^c	0.0 ^z
25	NAA + BAP	2 + 2	47 ^{hi}	35 ^k	53 ^g	44 ⁱ	97 ^{ab}	77 ^b

F. ang # و *F. sub* به ترتیب *F. angulate* و *F. subvelutina*

F.ang # and *F.sub*, *F. angulate* and *F. subvelutina*, respectively

ریزنمونه ریشه با ترکیب هورمونی $2 \text{ mg/L NAA} + \text{mg/L}$ BAP به ترتیب با مقدار ۸۰ میلی‌گرم و ۵۹ میلی‌گرم به خود اختصاص داد. در گونه *F. angulata* در ریزنمونه برگ لپه‌ای و برگ حقیقی بیشترین مقدار این صفت مربوط به تیمار هورمونی $1 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BAP}$ و در گونه *F. subvelutina* در ترکیب هورمونی $1 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BAP}$ بود (جدول ۷).

بررسی مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد وزن خشک پینه برخلاف وزن تر آن در ریزنمونه ریشه و ترکیب هورمونی $1 \text{ mg/L NAA} + 0 \text{ mg/L BAP}$ نسبت به تیمارهای دیگر افت قابل ملاحظه‌ای داشت که دلیل آن شیشه‌ای شدن پینه‌های حاصل از ریزنمونه ریشه به‌ویژه در ترکیب‌های هورمونی فاقد BAP بود (جدول ۷). در گونه *F. angulata* و *F. subvelutina* بیشترین وزن خشک پینه را

جدول ۷- مقایسه میانگین وزن خشک پینه ریزنمونه‌های برگ حقیقی، برگ لپه‌ای و ریشه دو گونه *F. angulata* و *F. subvelutina*

تحت تیمارهای هورمونی مختلف

Table 7. Mean comparison of callus dry weight from true leaf, cotyledon leaf and root explants of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments

شماره تیمار Number of treatment	نوع تیمار هورمونی Type of hormone treatment	غلظت‌ها (میلی‌گرم بر لیتر) Concentrations (mg/l)	وزن تر پینه ریزنمونه برگ حقیقی (میلی‌گرم) Callus dry weight from true leaf explant (mg)		وزن خشک پینه ریزنمونه برگ لپه‌ای (میلی‌گرم) Callus dry weight from cotyledon leaf explant (mg)		وزن تر پینه ریزنمونه ریشه (میلی‌گرم) Callus dry weight from root explant (mg)	
			<i>F.ang</i> #	<i>F.sub</i>	<i>F.ang</i>	<i>F.sub</i>	<i>F.ang</i>	<i>F.sub</i>
1	BAP + NAA	0 + 0	0.0 ^q	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z
2	BAP + NAA	0.5 + 0	3.3 ^{pq}	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z	40 ^f	32 ^g
3	BAP + NAA	1 + 0	10 ^{mo}	0.0 ^z	6.7 ^{op}	3.6 ^{yz}	60 ^c	47 ^c
4	BAP + NAA	1.5 + 0	20 ^{kl}	6.7 ^{uvw}	6.7 ^{op}	0.0 ^z	50 ^{de}	41 ^e
5	BAP + NAA	2 + 0	13 ^{kl}	4.3 ^{xyz}	6.7 ^{op}	3 ^{yz}	50 ^{de}	37 ^f
6	BAP + NAA	0 + 0.5	10 ^{mo}	0.0 ^z	30 ^{hi}	0.0 ^z	6.7 ^{op}	0.0 ^z
7	BAP + NAA	0.5 + 0.5	53 ^d	44 ^d	53 ^d	41 ^e	20 ^{kl}	10 ^{pqr}
8	BAP + NAA	1 + 0.5	60 ^c	48 ^c	40 ^f	31 ^g	20 ^{kl}	9.3 ^{prs}
9	BAP + NAA	1.5 + 0.5	40 ^f	31 ^g	60 ^c	48 ^c	20 ^{kl}	13 ⁿ
10	BAP + NAA	2 + 0.5	40 ^f	28 ^h	47	35 ^f	10 ^{no}	2 ^{yz}
11	BAP + NAA	0 + 1	6.7 ^{op}	0.0 ^z	3.3 ^{pq}	0.0 ^z	3.3 ^{pq}	0.0 ^z
12	BAP + NAA	0.5 + 1	10 ^{mo}	5.3 ^{wxy}	10 ^{mo}	3 ^{yz}	10 ^{no}	0.0 ^z
13	BAP + NAA	1 + 1	6.7 ^{op}	2 ^{yz}	10 ^{mo}	5.7 ^{wxy}	10 ^{no}	3 ^{yz}
14	BAP + NAA	1.5 + 1	13 ^{mn}	8 ^{r-v}	17	7.3 ^{s-w}	10 ^{no}	0.0 ^z
15	BAP + NAA	2 + 1	20 ^{kl}	12 ^{no}	20 ^{kl}	10 ^{pqr}	10 ^{no}	1 ^{yz}
16	BAP + NAA	0 + 1.5	0.0 ^q	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z
17	BAP + NAA	0.5 + 1.5	20 ^{kl}	12 ^{no}	20 ^{kl}	8.7 ^{r-u}	20 ^{kl}	14 ⁿ
18	BAP + NAA	1 + 1.5	36 ^{fg}	25 ⁱ	20 ^{kl}	7 ^{t-w}	20 ^{kl}	17 ^{lm}
19	BAP + NAA	1.5 + 1.5	20 ^{kl}	7.3 ^{s-w}	20 ^{kl}	11 ^{opq}	20 ^{kl}	18 ^{kl}
20	BAP + NAA	2 + 1.5	30 ^{hi}	20 ^{jk}	20 ^{kl}	13 ^{no}	13 ^{mn}	9 ^{q-t}
21	BAP + NAA	0 + 2	0.0 ^q	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z	0.0 ^q	0.0 ^z
22	BAP + NAA	0.5 + 2	20 ^{kl}	0.0 ^z	20 ^{kl}	6.3 ^{vwx}	33 ^{gh}	0.0 ^z
23	BAP + NAA	1 + 2	30 ^{hi}	18 ^{kl}	20 ^{kl}	6 ^{vwx}	73 ^b	54 ^b
24	BAP + NAA	1.5 + 2	33 ^{gh}	25 ⁱ	23 ^{jk}	13 ^{no}	73 ^b	0.0 ^z
25	BAP + NAA	2 + 2	40 ^f	27 ^{hi}	27 ^{ij}	15 ^m	80 ^a	59 ^a

F. ang و *F. sub* به ترتیب *F. angulate* و *F. subvelutina*

F. ang and *F. sub*, *F. angulate* and *F. subvelutina*, respectively

۲- باززایی غیرمستقیم (شاخساره نابجا) مطالعه در این پژوهش بر روی صفت درصد باززایی تفاوت براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، بین تیمارهای مورد معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت (جدول ۸).

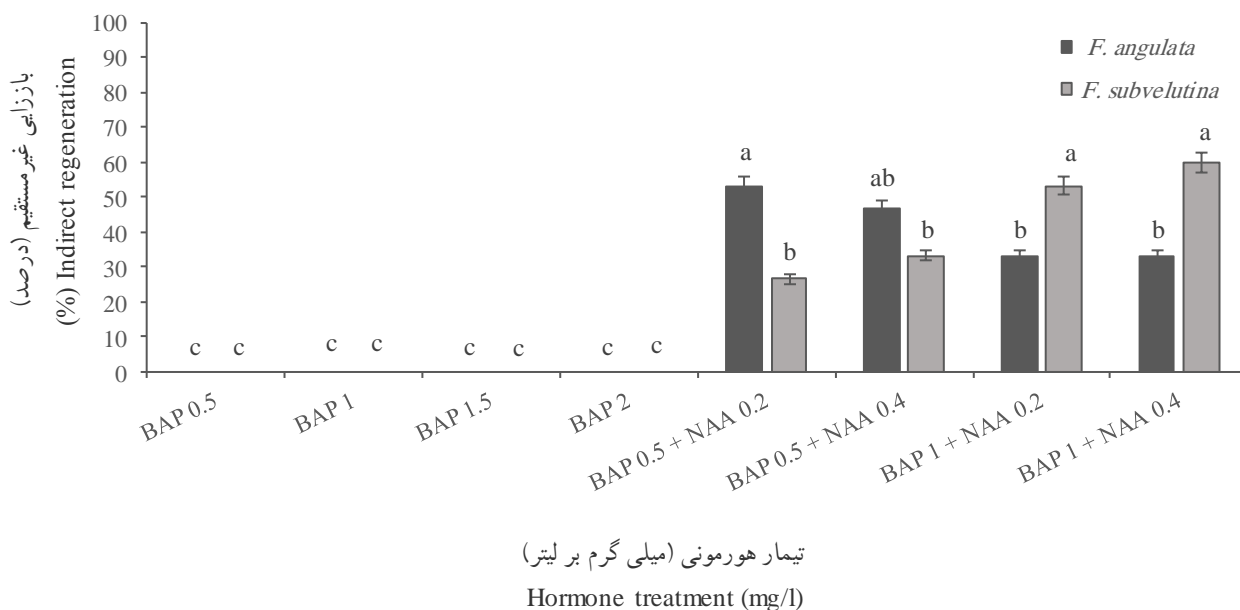
جدول ۸- تجزیه واریانس درصد باززایی غیرمستقیم (شاخساره نابجا) دو گونه *F. angulata* و *F. subvelutina* تحت شرایط تیمارهای هورمونی مختلف

Table 8. Analysis of variance of indirect regeneration percentage (ectopic shoots) of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square	
		<i>F. angulata</i>	<i>F. subvelutina</i>
تیمار هورمونی Hormone treatment	7	16162.66**	1933.33**
خطا Error	16	66.67	50.00

** = معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

** = significant at 1% probability level



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد باززایی غیرمستقیم از پینه برگ لپه‌ای دو گونه *F. subvelutina* و *F. angulata* تحت تیمارهای هورمونی مختلف

Figure 1. Mean comparison of indirect regeneration percentage of cotyledon leaf callus of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments

۰/۵BAP و ۰/۴mg/L NAA + ۰/۵mg/L BAP بوده است و در گونه *F. subvelutina* با میزان ۵۳/۳۳ و ۶۰ درصد به ترتیب در تیمارهای ۰/۲mg/L NAA + mg/L

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین باززایی در گونه *F. angulata* به ترتیب با مقدار ۵۳/۳۳ درصد و ۴۶/۶۶ درصد مربوط به تیمار ۲mg/L NAA + mg/L

۳- ریشه‌زایی (گیاهچه‌های باززایی شده)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس شاخص‌های ریشه‌زایی اندازه‌گیری شده در ریزنمونه چوبل تحت تأثیر ترکیبات مختلف هورمونی نشان داد که کاربرد تیمارهای مختلف تأثیر معنی‌داری بر صفات ارزیابی شده در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۹).

۱BAP و ۰/۴mg/L NAA + ۱mg/L BAP حاصل شد که تفاوت معنی‌داری بین این تیمارها وجود نداشت. نتایج این آزمایش نشان داد که کاربرد توأم سیتوکینین به همراه اکسین در باززایی گونه‌های چوبل مؤثر واقع شد، در حالی که کاربرد تنهای سیتوکینین BAP در هر دو گونه نشانه‌ای از باززایی نداشت (شکل ۱ و ۴).

جدول ۹- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در آزمایش ریشه‌زایی دو گونه *F. subvelutina* و *F. angulata* تحت شرایط

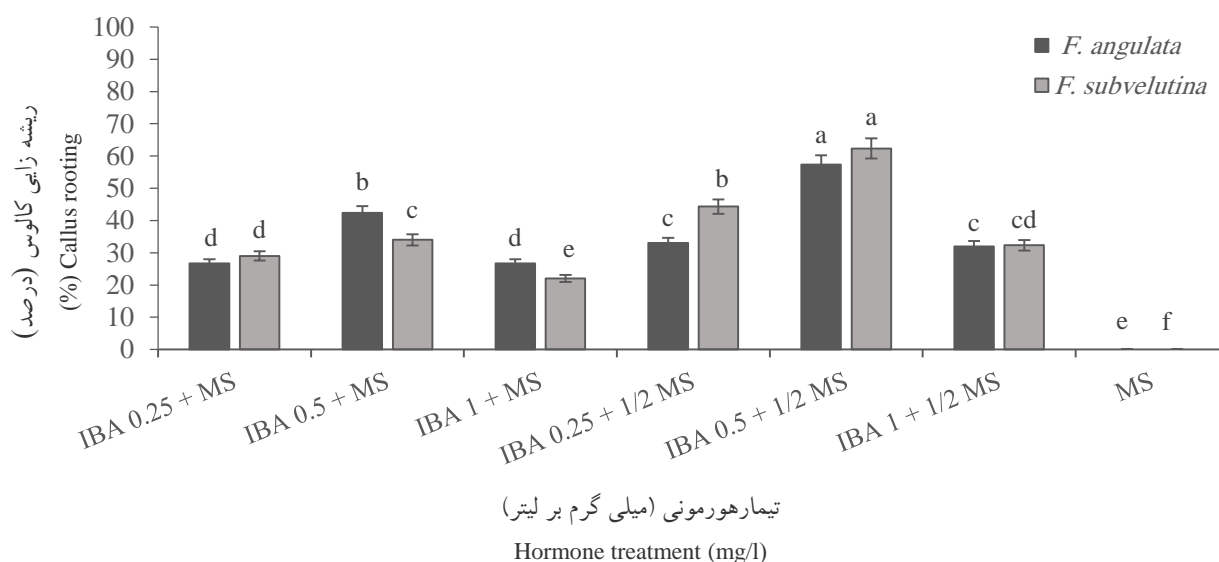
تیمارهای هورمونی مختلف

Table 9. Analysis of variance for studied traits in rooting experiment of *F. angulata* and *F. subvelutina* under different hormone treatments

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square			
		<i>F. angulata</i>		<i>F. subvelutina</i>	
		ریشه‌زایی Rooting	طول ریشه Root Length	ریشه‌زایی Rooting	طول ریشه Root Length
تیمار هورمونی Hormone treatment	6	912.651**	9.339**	1104.67**	7.340**
خطا Error	14	4.048	0.0257	7.00	0.0257

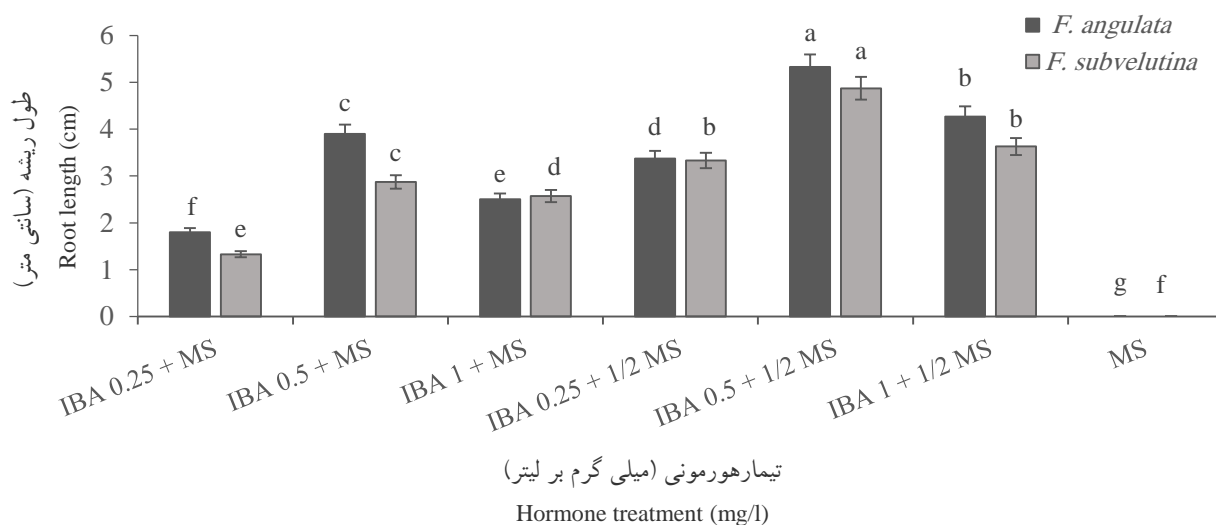
** = معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

** = significant at 1% probability level

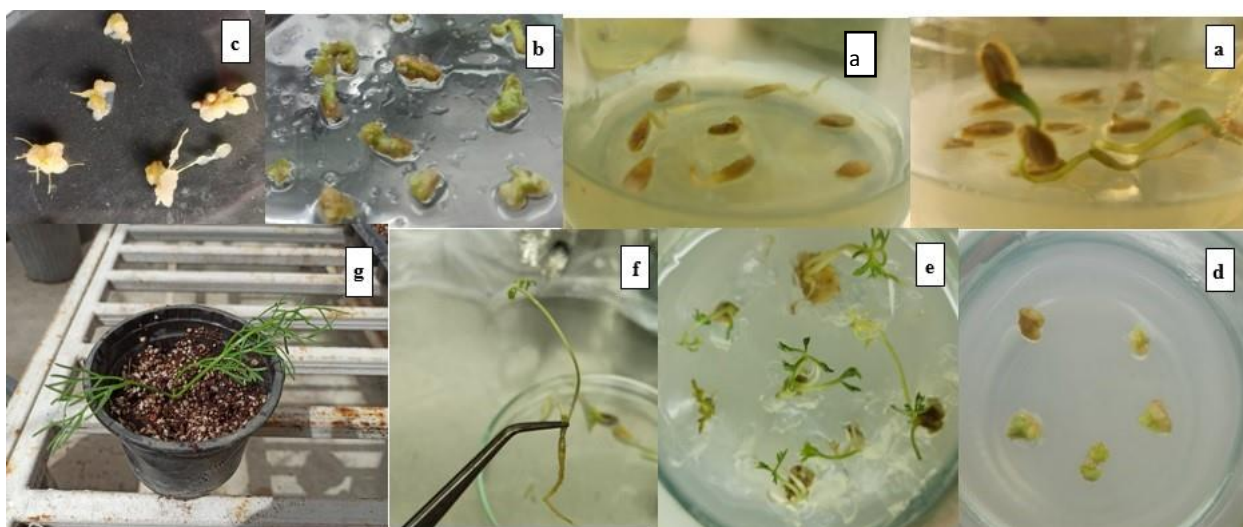


شکل ۲- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی دو گونه *F. subvelutina* و *F. angulata* تحت تیمارهای هورمونی مختلف

Figure 2. Mean comparison of rooting percentage of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments



شکل ۳- مقایسه میانگین طول ریشه دو گونه *F. subvelutina* و *F. angulata* تحت تیمارهای هورمونی مختلف
 Figure 3. Mean comparison of root length of *F. angulata* and *F. subvelutina* species under different hormone treatments



شکل ۴- مراحل ریزازدیادی چویل (a: جوانه زنی، b: پینه برگ حقیقی، c: پینه ریشه، d: پینه برگ لپه‌ای، e: باززایی، f: ریشه‌زایی، g: سازگاری)

Figure 4 – Stages of *Ferulago* micropropagation (a: germination b: true leaf callus c: root callus d: cotyledon callus e: regeneration f: rooting g: adaptation)

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در هر دو گونه مورد مطالعه بیشترین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در تیمار $0.5 \text{ mg/L IBA} + \frac{1}{2} \text{MS}$ حاصل شد، به طوری که درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در تیمار مذکور برای گونه

نتایج بررسی مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که درصد ریشه‌زایی و طول ریشه در ریزنمونه‌های چویل با کاهش غلظت نمک‌ها به نصف، افزایش قابل توجهی می‌یابد؛ همچنین بهترین غلظت IBA مورد استفاده میزان

کاهش آلودگی قارچی بذر و استفاده از اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلیت سدیم ۱/۷ درصد به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه برای استریلیزاسیون بذرهای کرفس با نتایج این آزمایش تا حدودی مطابقت دارد (Baker et al., 2005; Ernst, 1989; Leatherwood, 2005).

نوع و غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط-کشت نیز 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 محیط‌کشت، تولید پینه را بهبود می‌بخشد (Omidi & Farzin, 2009). نوع ریزنمونه‌ها تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف، درصد متفاوتی پینه تشکیل می‌دهند، بنابراین انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب به‌همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشمگیری بر میزان تولید پینه و رشد آن دارد (Khawar et al., 2005). در این پژوهش در محیط‌کشت‌های فاقد NAA پینه‌زایی انجام نشد که نشان‌دهنده اهمیت این تنظیم‌کننده رشد در فرایند تشکیل پینه می‌باشد و می‌توان بیان کرد که ریزنمونه هر گونه گیاهی در کشت درون شیشه‌ای برای تولید پینه، ترکیب هورمونی خاصی را نیاز دارد. بعضی گونه‌ها فقط با هورمون سایتوکینین یا اکسین تولید پینه می‌کنند و بعضی دیگر به ترکیب هر دو نوع هورمون نیاز دارند که در این آزمایش ترکیب دو هورمون بهترین نتیجه را در تشکیل پینه داشت (Sarabadani-tafreshi et al., 2008). در گیاه دارویی آنغوزه برای تولید پینه از ریزنمونه‌های ریشه، زیرلپه و لپه حاصل از گیاهچه به‌دست آمده از محیط درون شیشه‌ای و کشت بذر، آزمایشی انجام شد و نتایج نشان داد که فراوانی القاء پینه در ریزنمونه ریشه بیشتر از ریزنمونه‌های زیرلپه و لپه است. همچنین از بین تیمارهای به‌کاررفته، ترکیب هورمون NAA با BAP برای تشکیل پینه مؤثرتر واقع شد که کاملاً با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (Zare et al., 2010). با توجه به بررسی انجام شده و نتایج محققان دیگر برای پینه‌زایی در گیاه چویل، استفاده از اکسین NAA توصیه می‌شود، به این دلیل که اولاً تشکیل پینه در تمام

F. angulata ۵۷/۳۳ درصد و ۵/۳۳ سانتی‌متر و برای گونه *F. subvelutina* ۶۲/۳۳ و ۴/۸۷ سانتی‌متر بود (شکل ۲، ۳ و ۴).

۴- سازگاری

سازگار کردن، فرایندی الزامی است که توسط آن گیاه با تغییر محیط کشت سازگار می‌شود. در این مرحله گیاهچه‌هایی که دارای ریشه‌های قوی و سالم بودند انتخاب و به مرحله سازگاری انتقال داده شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به مدت چهار هفته در داخل محیط آزمایشگاه نگه‌داری و بعد به داخل خاک گلدان در مخلوطی از خاک، خاک پیت و ماسه با نسبت وزنی ۱:۱:۱ منتقل شدند. در مجموع ۸۰ درصد از گیاهان تولید شده از کشت بافت، در محیط بیرون با موفقیت سازگار گردیدند. بنابراین تکثیر گیاه دارویی چویل از طریق کشت بافت موفقیت‌آمیز بود (شکل ۴).

بحث

در گیاهان دارویی، بذر برداشت شده از طبیعت علاوه بر مشکل خواب عمیق‌تر، آلودگی‌های سطحی و نهفته بیشتری نیز دارد، بنابراین کاهش کمی و کیفی جوانه‌زنی را به دنبال خواهد داشت. هر جمعیت بذری بنابر شرایط قبل و پس از برداشت و نوع آلودگی‌ها، نیاز به یک تیمار ضدعفونی سطحی مؤثر دارد. از سویی، با توجه به اثر سوء مواد ضدعفونی‌کننده بر جوانه‌زنی، غلظت و زمان بهینه ضدعفونی سطحی باید مشخص گردد (Khatibzadeh et al., 2013). اتانول ۷۰ درصد با حذف لایه مومی در سطح بافت گیاهی و افزایش نفوذ و تأثیر محلول ضدعفونی‌کننده نقش بسزایی در فرایند گندزدایی دارد (Bajaj et al., 1988). روش استفاده شده با پژوهش‌های انجام شده در تیره چتریان (که گیاه چویل هم متعلق به همین تیره می‌باشد) مبنی بر کاربرد اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و ۱۵ دقیقه ضدعفونی با محلول ۲ درصد هیپوکلیت سدیم برای بذرهای آنیسون (*Pimpinella anisum*)، کاربرد هیپوکلیت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در جنس اکتینوتوس از چتریان برای

برای آزمایش باززایی انتخاب شدند. انواع مختلف سیتوکینین‌ها به‌ویژه هورمون BAP در مطالعات مختلف مهمترین فاکتور مؤثر در باززایی ساقه هستند و اثرهای چشمگیر آنها شاید با تغییرات بافت‌شناسی در بافت‌های القاشده مرتبط باشد (Neibaur et al., 2008). در گونه گیاهی *Taxus wallichiana* ترکیب هورمونی سیتوکینین به- همراه اکسین (افزایش سیتوکینین و کاهش اکسین) باززایی را افزایش می‌دهد که منطبق با نتیجه این آزمایش است (Datta & Jha, 2004). در پژوهشی دیگر که بر روی گیاه پونه‌سا بی‌کرک انجام شد، همانند این آزمایش بر روی چویل ترکیب هورمونی سیتوکینین و اکسین نتیجه بهتری داشت، به‌طوری‌که بیشترین درصد باززایی از پینه مربوط به دو تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌ترتیب با مقدار ۸۳/۲ و ۸۱/۶۶ درصد می‌باشد (Narimani et al., 2016).

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش، مشخص گردید که بهترین تیمار برای ضدعفونی بذرهای جمع‌آوری شده تیمار شستشو با آب جاری + ۱ دقیقه الکل اتیلیک + ۱۵ دقیقه وایتکس ۲ درصد + شستشو با آب مقطر + ۵۰۰ پی‌پی-ام سفوتاکسیم بوده و در بین ریزنمونه‌های انتخاب شده برای پینه‌زایی گیاه چویل، ریزنمونه‌های برگ حقیقی و ریشه نسبت به برگ لپه‌ای دارای پینه‌زایی بالایی بودند؛ اما بر بررسی وزن خشک پینه و با توجه به اینکه علاوه بر کمیت پینه، کیفیت پینه از اهمیت بالایی برخوردار است و در روند باززایی عامل مهمی محسوب می‌شود، بهترین پینه‌ها از نظر صفات کیفی، پینه‌های با رنگ سبز و سبز روشن، ترد و فشرده است. البته، در این آزمایش پینه‌های حاصل از برگ لپه‌ای برای ادامه آزمایش و مرحله باززایی انتخاب شدند. بنابراین می‌توان چنین بیان کرد که در بین ریزنمونه‌های مورد آزمایش، ریزنمونه برگ لپه‌ای با تیمار $0.5 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L BAP}$ دارای پینه‌هایی مناسب از لحاظ کمیت و کیفیت برای هر دو گونه مورد مطالعه می‌باشد. بهترین تیمار باززایی برای گونه *F. angulata*، تیمار $0.2 \text{ mg/L NAA} + 0.5 \text{ mg/L}$

غلظت‌های این اکسین مشاهده شد و ثانیاً اینکه برای تشکیل پینه، نیازی به حضور سیتوکینین نبود (هرچند کیفیت کمی داشت) و بدون حضور سیتوکینین نیز پینه تشکیل شد. براساس نتایج این تحقیق بافت ریشه ریزنمونه مناسب‌تری (از نظر کمی) در مقایسه با دو ریزنمونه دیگر (برگ حقیقی و برگ لپه‌ای) برای القای پینه داشت که مشابه با نتایج تحقیقات انجام شده سایر محققان در زمینه القای پینه در گیاه چویل است (Mortazavi et al., 2015). وزن تر و خشک پینه در فرایند کال‌زایی به‌عنوان معیاری از رشد پینه‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد (Koochi et al., 2014). رشد پینه و صفات مربوط به آن از قبیل وزن و شکل ظاهری نیز در یک گونه گیاهی براساس نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی متفاوت است (Magyar-Tábori et al., 2010). طبق نتایج Haghghat Hour و همکاران (۲۰۱۲)، رشد پینه‌های گیاه *Papaver pseudo-orientale* در محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد، متفاوت بود و محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kinetin به‌همراه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA مؤثرترین محیط کشت برای وزن تر پینه به- میزان ۸۲۲/۴ میلی‌گرم گزارش شد. در این پژوهش با توجه به نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی مورد استفاده، شکل ظاهری و بافت پینه متغیر بود و با توجه به اینکه پینه‌های با بافت ترد، سفت و متمایل به سبز پینه‌های مناسب برای فرایند باززایی هستند (Magyar-Tábori et al., 2010; Ahmadloo et al., 2017). در فرایند پینه‌زایی چویل، پینه-های حاصل از ریزنمونه ریشه به‌ویژه در تیمار هورمونی با اکسین تنها، سبب ایجاد پینه‌هایی آبکی با وزن بالا شد. از نظر ویژگی‌های کیفی پینه، پینه‌های شکننده که بافت آنها به سهولت قابل قطعه قطعه شدن است، پینه‌های نرم می‌نامند که برای باززایی معمولاً مناسب نیستند، در مقابل پینه‌های فشرده که بافت آنها براحتی از هم جدا نمی‌شوند را پینه‌های سفت می‌گویند که برای فرایند باززایی مناسب هستند (Ahmadloo et al., 2017; Junairiah et al., 2017). با توجه به مطالب گفته شده در این پژوهش، پینه‌های حاصل از ریزنمونه لپه که پینه‌هایی سفت، ترد و مایل به سبز بودند

- 10(1): 9-13.
- Datta, M.M. and Jha, S., 2004. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). *Journal of Plant Biotechnology*, 6(4): 213-219.
 - Dhivya, P., Sobiya, M., Selvamani, P. and Latha, S., 2014. An approach to Alzheimer's disease treatment with cholinesterase inhibitory activity from various plant species. *International Journal of Pharm Tech Research*, 6(5): 1450-1467.
 - Ernst, D., 1989. *Pimpinella anisum* L. (Anise): Cell culture, somatic embryogenesis, and the production of anise oil. In: Bajaj Y.P.S. (eds) *Medicinal and Aromatic Plants II. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 7. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 381-397.
 - Eyog-Matig, O., Aoudji, A.K.N. and Linsoussi, C., 2007. *Garcinia kola* Heckel seeds dormancy-breaking. *Applied Ecology and Environmental Research*, 5(1): 63-71.
 - Ghasempour, H.R., Shirinpour, E. and Heidari, H., 2007. The constituents of essential oils of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss at two different habitats, Nevakoh and Shahoo, Zagross Mountain, western Iran. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, 31(3): 309-312.
 - Golfakhrabadi, F., Khanavi, M., Ostad, S.N., Saeidnia, S., Vatandoost, H., Abai, M.R., Hafizi, M., Yousefbeyk, F., Rad, Y.R., Baghenegadian, A. and Ardekani, M.R.S., 2015. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 9(1): 104.
 - Haghghat Hour, M., Asghari Zakaria, R. and Zare, N., 2012. Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver pseudo-orientale* under in vitro conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 3(10): 11-22. (In Persian).
 - Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Aghighi, A. and Hamzelo-Moghadam, M., 2014. Evaluating the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Ferulago angulata* and *Ferulago subvelutina*. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(2): 39-43.
 - Hosseini, N., Akbari, M., Ghafarzadegan, R., Changizi Ashtiyani, S. and Shahmohammadi, R., 2012. Total phenol, antioxidant and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Ferulago angulata* ssp. *angulata*. *Medical Plant Journal*, (43): 80-89.
 - Hritcu, L., Bagci, E., Aydin, E. and Mihasan, M., 2015. Antiamnesic and antioxidants effects of *Ferulago angulata* essential oil against scopolamine-induced memory impairment in laboratory rats. *Neurochemical Research*, 40(9): 1799-1809.
 - Jalili, A. and Jamzad, Z., 1999. A preliminary survey of *F. subvelutina* and *F. angulata* in the north of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 10(1): 9-13.
 - mg/L NAA و برای گونه *F. subvelutina* تیمار ۰/۵BAP + ۰/۴ mg/L BAP بود. بیشترین درصد و طول ریشه برای هر دو گونه، در تیمار ۱/۲ MS + ۰/۵mg/L IBA حاصل شد. با توجه به سازگاری حدود ۸۰ درصد گیاهچه‌ها، می‌توان بیان کرد که این پژوهش با هدف ریزازدیادی دو گونه دارویی - مرتعی مهم و بومی چویل کاملاً موفقیت‌آمیز بوده است.
- ### منابع مورد استفاده
- Abrazeh, M., 2003. Investigation of some characteristics of *Ferulago angulata* in Dena protected area. M.Sc. Thesis of Range Management, Department of Natural Resources, Tarbiat Modarres University, 72. (In Persian).
 - Ahmadloo, F., Goodarzi, G. and Salehi, A., 2017. Effect of growth regulators on callus induction and regeneration of *Crataegus pseudo-hetrophylla* from leaf segment. *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, 3(1): 14-22. (In Persian).
 - Alavi, M., Zare, N., Masumiasl, A., Sheikhzadeh Mosadegh, P. and Asghari Zakaria, R., 2020. Embryo culture to overcome seed dormancy and produce seedling in *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 28(1): 149-160. (In Persian).
 - Arikat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S. and Shibli, R.A., 2004. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100(1): 193-202.
 - Asgari, S. and Rafieian-Kopaei, M., 2015. Single or whole antioxidants in metal toxicities. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 4(3): 69-70.
 - Bajaj, Y.P.S., Furmanowa, M. and Olszowska, O., 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj Y.P.S. (eds) *Medicinal and Aromatic Plants I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp. 60-103.
 - Baker, K.S., Steadman, K.J., Plummer, J.A., Merritt, D.J. and Dixon, K.W., 2005. The changing window of conditions that promotes germination of two fire ephemerals, *Actinotus leucocephalus* (Apiaceae) and *Tersonia cyathiflora* (Gyrostemonaceae). *Annals of Botany*, 96(7): 1225-1236.
 - Caboni, E., Meneghini, M. and Tonelli, M., 2010. Improved micropropagation of azarole (*Crataegus azarolus* L.). *Propagation of Ornamental Plants*,

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).
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Naghdi Badi, H., Salek Hashemi, S., Nasrollahnezhad Qomi, A., Navabpour, S. and Qaderi, A., 2017. Phytochemical evaluation and plant regeneration through somatic embryogenesis of *Ferulago angulata* subsp. *Carduchorum* (Boiss. and Hausskn), an endangered medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants*, 16(63):92-107.
- Narimani, R., Moghaddam, M. and Mojarab, S., 2016. Evaluation of the micropropagation of hairless catmint (*Nepeta nuda* L.), an endangered medicinal plant. *Journal of Cell & Tissue*, 7(4): 387-397. (In Persian).
- Neibaur, I., Gallo, M. and Altpeter, F., 2008. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(6): 480-486.
- Okonkwo, T., 2015. Sustainable development and protection of endangered species fauna and flora in the wild in developing countries. *International Journal of Development and Sustainability*, 4(11): 1086-1115.
- Omid, M. and Farzin, N., 2009. Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. *Food and Biotechnology Congress*, Kermanshah Azad University, 1-14.
- Pirbalouti, A.G., Sedaghat, L., Hamed, B. and Tirgiri, F., 2013. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of three endemic medicinal plants of Iran. *Bangladesh Journal of Botany*, 42(2): 327-332.
- Rezazadeh, S., Yazdani, D. and Shahnazi, S., 2003. Chemical composition of essential oil of *Ferulago angulata* Boiss. Inflorescence From west of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 2(7): 49-52.
- Sarabadani-tafreshi, R., Omid, 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.
- Sharifi, F., Rafieirad, M. and Sazegar, H., 2015. Effects of *Ferulago angulata* extract against of endemic, rare and endangered plant Species in Iran. *Research Institute of Forests and Rangelands Pressm Tehran, Iran*, 759.
- Jallilian, Z. and Ziarati, P., 2016. High potential of *Ferulago angulate* (Schlecht) Boiss. In adsorption of heavy metals. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 9(1): 201-208.
- Junairiah, M., Zuraidassanaaz, N.I., Izdihar, F.N. and Manuhara, Y.S.W., 2017. September. Callus induction of leaf explant *Piper betle* L. var. Nigra with combination of plant growth regulators indole-3-acetic acid (IAA), benzyl amino purin (BAP) and kinetin. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1888, No. 1, p. 020028). AIP Publishing.
- Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H. and Farsi, M., 2013. Effect of explants types and levels of plant growth substances on callogenesis in *Levisticum officinale* Koch. on a modified MS medium. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 29(2): 387-398. (In Persian).
- Khawar, K.M., Sarhin, E.O., Sevimay, C.S., Cocu, S.A.T.I., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Ipek, A., Kaya, M.E.H.M.E.T., Sancak, C. and Ozcan, S., 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. *Periodicum Biologorum*, 107(1): 113-116.
- Koochi, L., Zare, N., Asghari-Zakaria, R. and SheikhZadeh-Mosaddegh, P., 2014. The effect of plant growth regulators and different explants on the response of tissue culture and cell suspension cultures of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Journal of Crop Ecophysiology*, 30(2): 203-214.
- Leatherwood, W.R., 2005. Influence of Salt Stress on Germination, Root Elongation and Carbohydrate Content of Five Salt Tolerant Taxa, 114-241
- Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., da Silva, J.A.T., Bulley, S.M. and Hudák, I., 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(3): 251-267.
- Mahmoudi, R., Rafieirad, M. and Goudarzi, S., 2018. Effect of hydro alcoholic extract of *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss on motor and memory disorders in animal model of parkinson disease. *Qom University Medical Science Journal*, 12(8): 36-47. (In Persian).
- Mirzapour, S., Rafieirad, M. and Rouhi, L., 2015. Hydroalcoholic extract of *Ferulago angulata* improves memory and pain in brain hypoperfusion ischemia in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(1): 1-5.
- Mortazavi, R., Dehdari, M. and Masoumiasl, A.,

- Ferulago angulata* subsp. *carduchorum*. Jundishapur Journal of Microbiology, 3(1): 10-14.
- Zare, A.R., Solouki, M., Omid, M., Irvani, N., Nejad, N.M. and Rezazadeh, S., 2010. Callus induction and plant regeneration in *Ferula assafoetida* L.(Asafetida), an endangered medicinal plant. Trakia Journal of Sciences, 8(1): 11-18.
 - Sharma, R.K., Wakhlu, A.K. and Boleria, M., 2004. Micropropagation of *Anethum graveolens* L through axillary shoot proliferation. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 13(2): 157-159.
 - Taran, M., Ghasempour, H.R. and Shirinpour, E., 2010. Antimicrobial activity of essential oils of oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. Journal of Medicinal Plants, 1(53): 34-44.

Micropropagation optimization of two endangered and endemic species of *Ferulago* (*Ferulago subvelutina* Rech.f. and *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss) in Iran

R. Narimani¹, L. Samiei², M. Moghaddam^{3*}

1- PhD. Graduated, Dept. Horticultural Science and Landscape Architecture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. Iran.

2- Assist. Prof., Dept. Ornamental Plants, Institute of Plant Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. Iran.

3* - Corresponding author, Assoc. Prof. Dept. Horticultural Science and Landscape Architecture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. Iran. E-mail: m.moghaddam@um.ac.ir

Received: 01.10.2021

Accepted: 05.02.2022

Abstract

Ferulago (*Ferulago* ssp.) genus as medicinal plant belongs to Apiaceae family. It is endemic in Iran. Excess harvesting and environmental stresses such as drought, lead to as endangered plant. By considering this plant as a valuable medicinal-rangeland plant, its production and reclamation is an essential task. This investigation was conducted to optimize micropropagation of two endemic species of *Ferulago*, included *F. angulate* and *F. subvelutina*. Higher percentage of callus induction in *F. angulata* specie was obtained as 100%, using rootlet explant (under treatments of 0 BAP +1 NAA, 0 BAP +1.5 NAA and 0 BAP +2 NAA mg/l) and also true leaf explants (under treatments of 0.5 BAP + 0.5 NAA and 1 BAP +2 NAA mg/l). For *F. subvelutina*, higher callus induction was obtained using true leaf explants (under treatments of 0.5 BAP + 0.5 NAA and 1 BAP + 2 NAA mg/l), as 72.33 and 71.66%, respectively. The combined application of the cytokinin and auxin phytohormones was effective in regenerating of both species; so that, the higher regeneration was obtained as 53.33 and 46.66% in *F. angulate* under treatments of 0.5 BAP + 0.2 NAA mg/l and 0.5 BAP + 0.4 NAA mg/l, respectively. Similarly, the higher regeneration as 53.33 and 60% was obtained in *F. subvelutina* under treatments of 1 BAP+0.2 NAA mg/l and 1 BAP+0.4 NAA mg/l, respectively. The best rooting treatment in both species was determined as the ½ MS cultural medium included 0.5 mg/l IBA. Their adaptation stage were done using mixture of soil, peat soil and sand with a weight ratio of 1: 1: 1, in which the total of 80% of regenerated plants from tissue culture, were successfully adapted to the outside environment.

Keywords: Endangered, Callus, Regeneration, *In vitro* culture, Explant, Growth regulator