زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹٤

مطالعه مولکولی و اکوفیزیولوژیکی گیاه دارویی باریجه
(*Ferula gummosa* Boiss)

لیلا کرم زاده،[*1] وهب جعفریان، [2] الهه وطن خواه[3] و علی عمارلو[4]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۷

چکیده

شناسایی و معرفی گیاهان دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گیاه دارویی باریجه *(Ferula gummosa* Boiss) از خانواده چتریان (Apiaceae) در مناطقی از ایران و بخش هایی از پاکستان و ترکمنستان رشد می‌کند. هدف از این پژوهش بررسی گیاه از دیدگاه مولکولی از طریق استخراج DNA ژنومی، تعیین توالی و مطالعات بیوانفورماتیکی جهت شناسایی موقعیت مولکولی گیاه و نیز معرفی نیازهای رشدی گیاه و همچنین شناخت ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی از قبیل موقعیت جغرافیایی، pH، EC خاک رویشگاه می باشد. به این منظور توده هایی از گیاه باریجه و نمونه‌های خاک از زیستگاه-های طبیعی در منطقه تهم استان زنجان جمع آوری شد. بررسی‌ها نشان داد سطح خاک رویشگاه گیاه باریجه به صورت سنگریزه‌ای، سنگی و صخره‌ای بوده و این گیاه در ارتفاعات حدود ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر از سطح دریا در دامنه‌ی جنوبی با شیب حدود ۴۵ درجه تا ۸۰ درجه رشد می کند. بررسی pH خاک منطقه نشان داد که pH آن در محدوده ۶/۵ است و مقدار pH خاک با مقدار EC همبستگی منفی دارد. نتایج استخراج DNA ژنومی، خالص سازی و سپس استخراج توالی 18S rDNA آن توسط PCR انجام و آنالیز تعیین توالی آن منجر به ثبت توالی مربوطه در بانک ژن با کد KM983398 گردید.

واژگان کلیدی: اکوفیزیولوژی، باریجه، DNA ژنومی، PCR.

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. L.Karamzadeh@znu.ac.ir
[2] استادیار، دکتری، بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. V.jafarian@znu.ac.ir
[3] استادیار، دکتری، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. elahe-vatankhah@znu.ac.ir
[4] دکتری ژنتیک مولکولی و عضو هیات علمی پژوهشکده فناوریهای نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
ammarellou@yahoo.com

مقدمه

گیاه باریجه با نام علمی (*Ferula gummosa* Boiss) از خانواده چتریان (Apiaceae) بومی مناطق شرق و غرب ایران است و در استان هایی نظیر سمنان، خراسان، اصفهان، فارس و استان های مرکزی پراکنده شده است (دینی و همکاران، ۱۳۸۱). این گیاه یکی از مهم ترین گیاهان دارویی، صنعتی ایران است و از حیث صادرات رتبه اول را در بین گیاهان دارویی ایران داراست (زرگری، ۱۳۶۵). داروهای سنتی گیاهی حاصل از باریجه برای درمان اختلالات روده (Sadraei et al., 2001)، زخم، درد معده و تشنج (Gharaei et al., 2013) در ایران استفاده می شده است. صمغ (Galbanum) این گیاه، دارای خواص ضد میکروبی، ضد تشنج، ضد نفخ، خلط آور، ضد زکام، ضد روماتیسم، ضد درد، ضد هیستریک، ملین، ضد عفونی کننده و ضد دیابت است (Sayyah et al, 2001; Kouyakhi et al, 2008). اسانس روغنی و صمغ رزینی این گیاه نیز دارای خواص آرام بخشی، ضد اسپاسم و کاربرد های متعدد دیگری است (Ghasemi et al, 2005; Asili et al, 2009; Habibi, 2006). در یک مطالعه فعالیت ضد باکتریایی اسانس *F. gummosa* علیه باکتری های گرم مثبت و اشرشیا کولی، و فعالیت ضد باکتریایی کمی در مقابل سودوموناس اثبات شد (Eftekhar et al., 2004). در مطالعه دیگری نشان داده شد که عصاره باریجه دارای تأثیرات مثبت بر تکثیر و تمایز به استخوان در سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی می باشد (محمودی و همکاران، ۱۳۹۲). صمغ باریجه برای ساخت چسب، منسوجات و لوازم آرایشی، و با توجه به شفافیت آن و پیوند با قدرت بالا در ساخت نوعی چسب بی رنگ جهت چسباندن جواهرات و اشیای قیمتی (الماس) کاربرد دارد (Mortazaienezhad et al., 2006).

این گیاه علفی، چند ساله و مونوکارپیک است که در سال آخر رویش (سال پنجم تا هشتم) به ساقه می رود و تشکیل گل و میوه می دهد (قهرمان، ۱۳۷۲). خانواده چتریان یکی از خانواده های گیاهی بزرگ ایران است. تعدادی از گونه های این خانواده به مصرف تغذیه انسان می رسند و غالبا در گروه های سبزیجات ریشه ای و سبزیجات معطره طبقه بندی می شوند (هویج، جعفری، گشنیز و شوید). میوه ها و دانه های گروه دیگری برای معطر کردن مواد غذایی به کار می روند (زیره، گلپر و انیسون). صمغ حاصل از آنغوزه و باریجه دارای مصارف صنعتی است (بخشی خانیکی، ۱۳۸۶).

رشد گیاهان نیز تحت تأثیر ویژگی‌های خاک قرار می‌گیرد. یکی از ویژگی‌های شیمیایی خاک pH است که تأثیر بسزایی بر فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک، قابل جذب بودن عناصر و هدایت الکتریکی خاک دارد (Brady et al., 2002). Aciego pietri و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که بین pH خاک و زیست‌توده میکروبی همبستگی وجود داشته و در pH های بالای ۷ مقدار زیست‌توده میکروبی و همچنین فعالیت برخی آنزیم‌ها حداکثر بود.

با این همه، هر گونه گیاهی نسبت به شرایط اکولوژیکی ویژه‌ای در رویشگاه طبیعی خود سازگار شده است که شناسایی کامل ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی برای اهلی‌سازی و گسترش کشت و کار آن در مناطق دیگر ضروری است. همچنین گیاهان بومی نسبت به برخی از تنش‌های محیطی مقاوم شده-اند که شناسایی این گیاهان در مرحله نخست به منظور پی‌بردن به مکانیسم‌های ایجاد مقاوت به این نوع تنش‌ها می‌تواند برای محققین علوم مختلف زیست‌شناسی بسیار مفید باشد. از آنجا که باریجه یک گونه‌ی بومی ایران است و با توجه به اهمیت این گیاه دارویی در طب سنتی و همچنین از آنجا که متأسفانه تاکنون گزارشی مبنی بر ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی و

مولکولی این گونه نادر دارویی وجود ندارد، پژوهش حاضر با هدف بررسی خواص اکولوژیکی از قبیل ارتفاع، pH، EC، و بررسی مولکولی گیاه با استفاده از روش های استخراج DNA ژنومی، مطالعه با پرایمرهای ITS و تعیین توالی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

جمع آوری گیاه باریجه و نمونه های خاک رویشگاه از کوه های اطراف زنجان (تهم) با مختصات جغرافیایی به طول ۳۶ درجه و ۵۰/۰۲ دقیقه، عرض ۴۸ درجه و ۳۷/۵۰ دقیقه در ارتفاع حدود ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر با شیب بیشتر از ۴۵ درجه صورت گرفت. نمونه‌های گیاهی و خاک رویشگاه بعد از آماده سازی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای انجام آزمایشات مورد نظر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری pH و هدایت الکتریکی (EC)

به ۲۰ گرم نمونه خاک مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و اندازه‌گیری pH سوسپانسیون با دستگاه‌های pH متر و EC آن با دستگاه هدایت سنج الکتریکی انجام شد (Imperato et al., 2003).

استخراج DNA

برای استخراج DNA گیاه باریجه از روش دلاپورتا استفاده شد برای این منظور نمونه برگی برداشت شده از گیاه باریجه را در داخل ازت مایع با کمک هاون پودر کرده و ۵۰ میلی‌گرم از آن را وزن کرده و سپس در میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته می شود. ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل: تریس ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۵۰ میلی مولار، NaCl ۵۰۰ میلی مولار) از قبل گرم شده به همراه ۱۰۰ میکرولیتر از SDS (۱۰٪) به تیوپ اضافه شده و تا حدی که خوب مخلوط شود، سر و ته شود (اینورت شود، ورتکس نشود).

بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در بن ماری انکوبه شده و در این مدت هر ۵ دقیقه یکبار سروته می شود. سپس ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم (KAS) ۵ مولار اضافه شده و نمونه ها خیلی کم ورتکس می شود. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بمدت ۲۵ دقیقه با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می شود. فاز بالایی با دقت جدا شده و به دو تیوپ جدید ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل می شود، بطوری که فاز رسوب کرده‌ی پایینی که حاوی پلی ساکارید ها و پروتئین های غیر قابل حل در SDS پتاسیم استات است با فاز بالایی مخلوط نشود. ایزوپروپانول سرد شده در ۲۰- درجه را به صورت هم حجم به تیوپ ها اضافه کرده و پس از چند بار سر و ته کردن بمدت نیم تا یک ساعت در دمای ۲۰- درجه انکوبه می‌شود. بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده، مایع رویی حذف و رسوب حاصل باقی می ماند. DNA موجود در رسوب حاصل با ۷۰۰-۵۰۰ میکرولیتر از اتانول ۷۰٪ شستشو داده می شود. بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می شود. مایع رویی حذف شده و رسوب حاصل در مجاورت هوا خشک می شود. به میزان ۲۰ میکرولیتر آب استریل اضافه شده و بمدت یک شب در دمای ۴ درجه نگهداری می شود.

نکته: برای نگهداری کوتاه مدت در دمای ۴ درجه و برای بلند مدت در دمای ۲۰- درجه نگهداری شود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر توالی ریبوزومی

به منظور انجام PCR از پرایمر های ITS1 (پرایمر F) و ITS4 (پرایمر R) استفاده شد. مخلوط واکنش PCR طبق جدول (۱) تهیه شده و طبق شرایط استاندارد، واکنش PCR انجام شد (Doyle et al.,1987).

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای تهیه ۲۰ (میکرولیتر) محلول واکنش PCR

Primer F (50 pmol)	۱µl
Primer R (50 pmol)	۱µl
DNA	۱µl
Master mix (2x)	۲µl
ddH_2O	۱۵µl
Total volume	۲۰µl

دمای اتصال جهت تکثیر قطعه مورد نظر بر اساس T_mپرایمرها انتخاب و برنامه اجرایی دستگاه ترموسایکلر بر اساس جدول (۲) تنظیم شد.

جدول ۲- سیکل های دمایی مراحل مختلف PCR

زمان	دما	واکنش	مرحله
۵ دقیقه	۹۴ °C	واسرشت اولیه	۱
۱ دقیقه	۹۴°C	واسرشت	۲(۳۵ چرخه)
۱ دقیقه	۵۵ ^{0}C	اتصال آغازگر	-
۹۰ ثانیه	۷۲ °C	بسط	-
۱۰ دقیقه	۷۲ °C	بسط نهایی	۳

خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت

این خالص سازی در صورت عدم وجود نوارهای اضافی و تنها به منظور حذف آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش PCR است بنابراین احتیاج به الکتروفورز ژل آگارز نداشته و محصول PCR به طور مستقیم طبق دستورالعمل شرکت Bioneer کره جنوبی خالص شد:

۱- به اندازه ۵ برابر کل حجم محصول PCR ، از بافر یک (بافر اتصال) کیت تخلیص به محصول PCR اضافه و پس از مخلوط شدن، به یک ستون خالص سازی منتقل شد.

۲- ستون به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق و در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۳- پس از دور ریختن محلول جمع شده در محفظه ستون ۵۰۰ میکرولیتر از بافر ۲ کیت (بافر شستشو) به ستون اضافه و سپس به مدت 1 دقیقه در دمای اتاق و در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

۴- تکرار مرحله۳

فیلتر ستون به یک ویال استریل منتقل و ۵۰ میکرولیتر بافر محلول سازی به فیلتر اضافه و به مدت ۱دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد.

الکتروفورز

برای بررسی کیفی و کمی محصول PCR از ژل آگاروز 1% در حضور بافر TAE استفاده شد.

الکتروفورز محصول PCR

همانطور که می‌دانیم با توجه به طول قطعه، غلظت ژل مورد استفاده متفاوت است، از این رو با توجه به طول قطعه DNA از ژل آگاروز ۱ % استفاده شد.

برای این منظور ۱ گرم پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TAE حل و به مدت ۳ دقیقه در دمای جوش انکوبه شد. روش تهیه استوک TAE در جدول (۳) آمده است.

جدول ۳- مواد مورد نیاز یرای تهیه استوک ۵۰x بافر TAE

تریس باز	۲۴۲گرم
اسید استیک گلایسیال	۵۷۱ میلی لیتر
EDTA (0.5 M)	۱۰۰میلی لیتر
	pH= 8

برای وارد کردن نمونه های DNA به درون چاهک های ژل، با توجه به نوع آزمایش، مقدار خاصی از نمونه با حجم مساوی از بافر بارگذاری ۱x به آرامی مخلوط شده با استفاده از سمپلر به داخل چاهک های ژل منتقل شد. رنگ موجود در بافر بارگذاری که غالبا رنگ برومو فنل بلو برای مشخص کردن میزان حرکت نمونه های DNA بر روی ژل استفاده می‌شود. برای مشخص کردن طول باند قطعه اسید نوکلئیک، از مارکر ۱ Kb ladder DNA استفاده می‌شود.

رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید

برای رنگ آمیزی ژل و رویت نوارها از اتیدیوم بروماید استفاده شد، جهت رویت ژل از دستگاه ترانس لومینومتر(دستگاه مولد UV با طول موج ۲۴۵-۳۶۵ نانومتر) استفاده شد.

تعیین توالی

بعد از حصول اطمینان از حضور توالی نوکلئوتیدی با استفاده از ژل آگاروز، توالی مورد نظر با پرایمرهای ITS4 و ITS5 به شرکت تکاپو زیست نماینده Bioneer کره ارسال شد.

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان داد سطح خاک رویشی گیاه باریجه به صورت سنگریزه‌ای، سنگی و صخره‌ای بوده و در ارتفاعات حدود ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر از سطح دریا در دامنه‌ی جنوبی یعنی به سمت آفتاب با شیب حدود ۴۵ درجه تا ۸۰ درجه رشد می کند. دوره رشد و نمو گیاه فصول بهار و تابستان می‌باشد یعنی گیاه رویش خود را از اردیبهشت ماه شروع می‌کند و در اوایل تیر تا اواسط مرداد به انتهای فصل رویشی خود رسیده و پژمرده می‌شود.

pH و EC خاک

دو ویژگی pH و هدایت الکتریکی خاک در ۱۰ نمونه خاک منطقه مورد مطالعه بررسی شد. داده های جدول ۴ نشان می‌دهد که pH خاک در محدوده نمونه‌برداری بین ۶/۴۹۳ – ۶/۸۵۸ متغیر است که بیانگر اسیدی بودن خاک منطقه است. انحراف استاندارد بین داده‌ها نشان می‌دهد که پراکندگی نوع خاک از نظر pH بسیار کم است. نتایج حاصل از اندازه گیری EC خاک (جدول ۴) مشخص کرد که EC نمونه‌های خاک بین ۱۰۸/۸- ۳۷۲ میکرو زیمنس بر سانتی‌متر قرار دارد و پراکندگی داده‌ها کم است.

جدول ۴- توصیف آماری pH و EC خاک رویشگاه طبیعی گیاه باریجه

	میانگین	انحراف استاندارد	کمینه	بیشینه	همبستگی pH &EC
pH	۶/۶۸۵۱۰	۰/۱۴۰۵۰۴	۶/۴۹۳	۶/۸۵۸	-۰/۲۸۶
EC	۲۰۲/۷۸۰۰۰	۷۵/۱۵۸۷۷۷	۱۰۸/۸۰۰	۳۷۲/۰۰۰	

بررسی آزمون همبستگی آماری بین مقدار pH و EC نمونه های خاک نشان می‌دهد که همبستگی منفی بین این دو متغیر وجود دارد یا به عبارت دیگر با افزایش مقدار pH خاک مقدار EC خاک کاهش می‌یابد. Brady و همکاران (۲۰۰۲) دریافتند که تجمع و انتقال عناصر به ویژه فلزهای سنگین در خاک به هدایت الکتریکی و pH وابسته است، به طوری که pH اسیدی باعث قابل جذب شدن گونه‌های فلزی به صورت کاتیونی می‌شود. در خاک‌های قلیایی عناصر فلزی موجود در خاک به صورت نامحلول و رسوب در می‌آید و تحرک کمتری داشته و انتقال آن‌ها به گیاه کمتر صورت می‌گیرد، بنابراین خاک‌های اسیدی خطرناک‌تر از خاک‌های قلیایی از لحاظ جذب برخی از فلزهای سنگین می‌باشند. EC بالای خاک نشان‌دهنده حالت کاتیونی و در نتیجه قابل جذب بودن یون‌های فلزی است، و همچنین بالا بودن مقدار کاتیون‌های قابل تبادل خاک بیانگر ظرفیت بارگیری بالای خاک نسبت به فلزها است (Waalewijn-Kool et al., 2014).

رده بندی گیاه *Ferula gummosa*

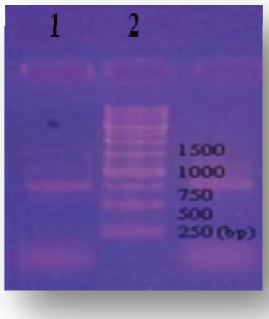
برای استفاده از گیاهان دارویی، شناخت گونه گیاهی از جایگاه ویژه ای برخوردار است. با استفاده از علم رده بندی، جایگاه هرگونه گیاهی مشخص و شناسایی آن ممکن می‌شود (مظفریان، ۱۳۹۰).

سلسله: گیاهان	Planatae
شاخه: ماگنولیافیتا	Magnoliophyta
رده: ماگنولیوپسیدا	Magnoliopsida
راسته: آپیالس	Apiales
تیره: آپیاسه(چتریان)	Apiaceae
جنس: فرولا	*Ferula*
گونه: گاموسا	*gummosa*

نتایج استخراج DNA و آنالیز توالی نوکلئوتیدی

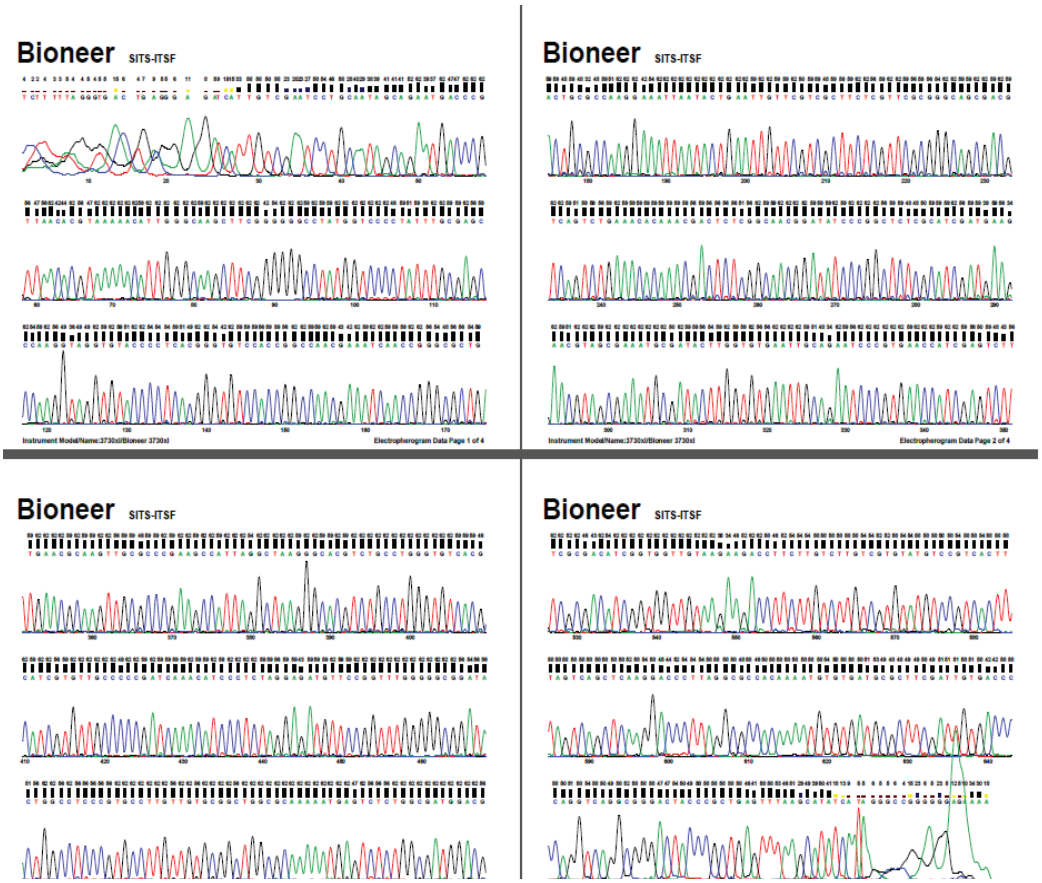
نتایج تخلیص DNA ژنومی بیانگر کیفیت مناسب DNA استخراج شده است و همچنین نتایج PCR بر روی DNA ژنومی با استفاده از پرایمر های ITS1 و ITS4 بیانگر ایجاد محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ در ناحیه ۸۰۰-۶۰۰ جفت باز است.

شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز DNA ژنومی گیاه باریجه
۱: DNA ژنومی، ۲: 18SrDNA

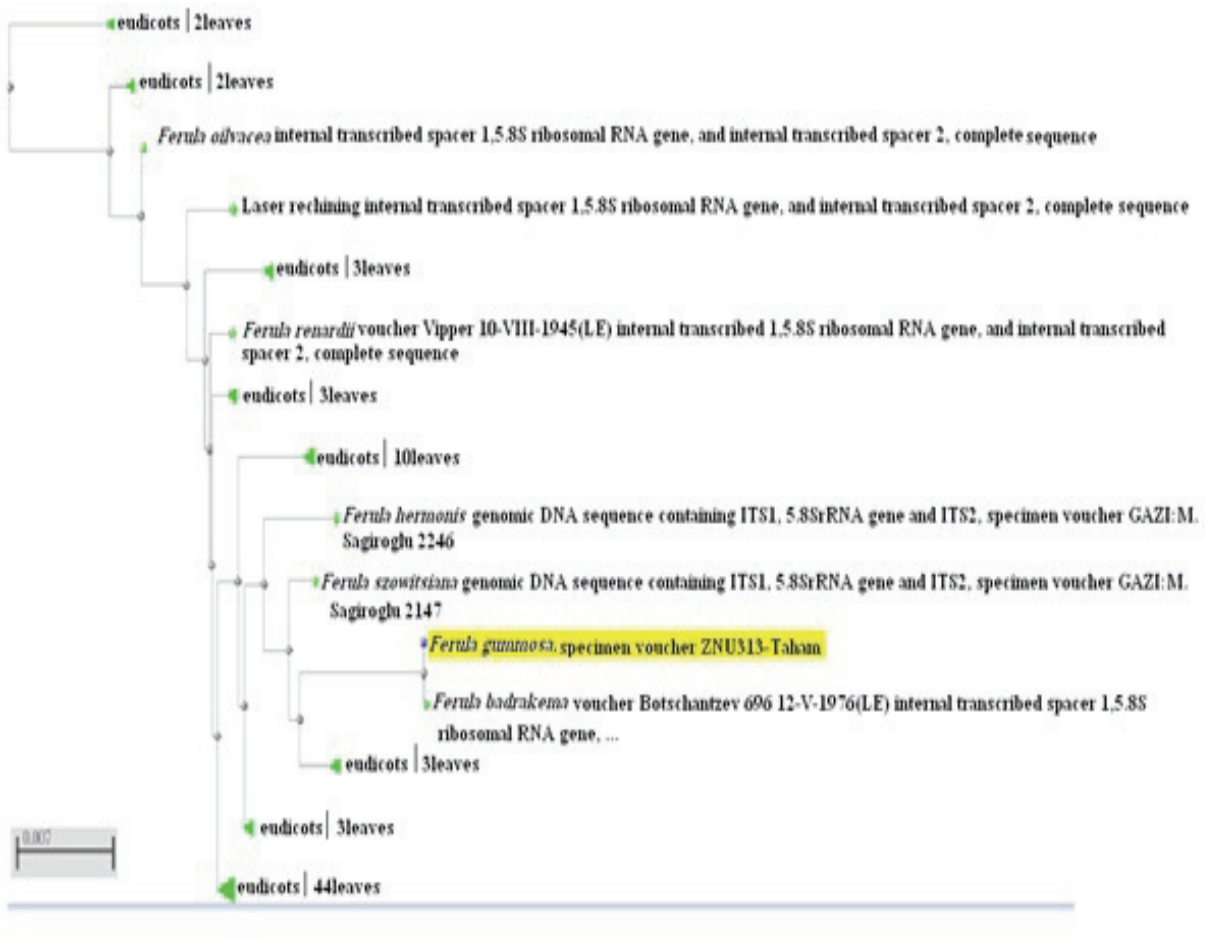


شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز 18SrDNA استخراج شده از نمونه های برگی گیاه باریجه.۱: محصول PCR ۲: مارکر با وزن مولکولی 100-10000 bp

نتایج حذف مواد زاید و تعیین توالی PCR توسط شرکت Bioneer کره جنوبی بیانگر توالی نوکلئوتیدی طبق اطلاعات زیر می‌باشد.



شکل ۳- نتیجه تعیین توالی PCR (توسط شرکت Bioneer کره جنوبی)



شکل۴- رسم درخت فیلوژنی گیاه باریجه

سیستم‌های طبقه بندی امروزی برخلاف سیستم های قدیمی‌تر، تنها بر پایه مشخصات موفولوژیک استوار نبوده بلکه سایر اختصاصات بیولوژیک گیاهان را در طبقه بندی به کار می‌گیرد و در این راستا، توجه به جنبه‌های تکاملی، وابستگی‌های ژنتیکی و ساختاری آن ها از تاکید بیشتری برخوردار است. با استخراج و تکثیر DNA ریبوزومی به مقایسه این توالی با توالی‌های موجود در بانک ژنومی NCBI پرداخته و در نهایت در این سایت این توالی ثبت شد.

بررسی‌های بیوسیستماتیکی منجر به شناسایی گونه گیاهی از روی کلیدهای شناسایی شد. در نهایت آنالیز نتایج توالی توسط نرم افزار Gene Runner و BLAST توالی در بانک ژنومی NCBI بیانگر یک توالی ۶۸۷ نوکلئوتیدی می‌باشد. نتیجه این تحقیق ثبت توالی 18SrDNA از ژنوم گیاه *F.gummosa* در سایت NCBI با کد KM983398 به نام دانشگاه زنجان است.

سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه زنجان به خاطر حمایت مالی قدردانی می نماید.

منابع

بخشی خانیکی، غ. (۱۳۸۶). درختان و درختچه های ایران، انتشارات دانشگاه پیام نور.

دینی م، پ. باباخانلو، م.، مسعود علی ها و گلی پور، م. (۱۳۸۱). شناسایی رویشگاه ها و پراکندگی گونه های مولد باریجه در استان تهران، مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، شماره ۱۳، صفحات ۵۰-۲۵.

زرگری، ع. (۱۳۶۵). گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، جلد دوم.

قهرمان، ا. (۱۳۷۲). کورموفیت های ایران، انتشارات دانشگاه تهران، جلد دوم.

محمودی، ز.، سلیمانی،م.، سعیدی، ع.، ایرانشاهی، م. و عزیز سلطانی، آ. (۱۳۹۲). مطالعه تاثیر عصاره اتانولی ریشه گیاه باریجه بر تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول های استخوانی (Osteoblast). فصلنامه گیاهان دارویی.

مظفریان، و. (۱۳۹۰). رده بندی گیاهی، کتاب دوم، دولپه ای ها، انتشارات امیرکبیر.

Aciego Pietri, J. C. and Brookes, P. C. (2008). Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. Soil Biology and Biochemistry, 40: 1856-1861.

Asili, J.and Sahebkar, A. and Fazly Bazzaz, B.S. and Sharifi, S. and Iranshahi, M. (2009). Identification of essential oil components of *Ferula badrakema* fruits by GC–MS and 13C-NMR methods and evaluation of its antimicrobial activity. Journal of Essential Oil Bearing Plants 12, 7–15.

Brady, N. C. and Weil, R. R. (2002). The nature and properties of soil. 13th ed, Springer Netherlands, 249 pp.

Doyle, J. J. and Dickson, E. E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis.Taxon 36:715-722.

Eftrkhar, F. and Yousefzadi, M. and Borhani, K. (2004). Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. 75, 758-759.

Gharaei, R. and Akrami, H. and Heidari, Sh. and Asadi, M.H. and Jalili, A. (2013). The suppression effect of *Ferula gummosa Boiss.* extracts on cell proliferation through apoptosis induction in gastric cancer cell line. European Journal of Integrative Medicine 5. 241-247.

Ghasemi, Y. and Faridi, P. and Mehregan, I. and Mohagheghzadeh, A. (2005). *Ferula gummosa* fruits: an aromatic antimicrobial agent. Chemistry of Natural Compounds. 41 (3), 311–314.

Habibi, Z. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ferula latisecta* and Mozaffariania insignis from Iran. Chemistry of Natural Compounds, 42 (6), 689–692.

Imperato, M. and Adamo, P. and Naimo, D. and Arienzo, M. and Stanzione, D. and Violante, P. (2003). Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). Journal of Environmental Pollution, 124: 247–256

Kouyakhi, E.T. and Naghavi, M.R. and Alayhs, M. (2008). Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. Chemistry of Natural Compounds, 44, 124–126.

Mortazaienezhad, F. and Sadeghian, M.M. (2006). Investigation of compounds from Galbanum (*Ferula gummosa*) Bioss. Asian Journal of Plant Scienc, 5, 905–906.

Sadraei, H. and Asghari, G.R. and Hajhashemi, V. and Kolagar, A. and Ebrahimi, M. (2001). Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. Phytomedicine, Vol. 8(5: 370-376.

Sayyah, M. and Kamalinejad, M. and Bahrami Hidage, R. and Rustaiyan, A. (2001). Antiepileptic potential and composition of the fruit essential oil of *Ferula gummosa* Boiss. Iranian Biomedical Journal, 5, 69–72.

Waalewijn-Kool, P. L. and Rupp, S. and Lofts, S. and Svendsen, C. (2014). effect of soil organic matter content and pH on the toxicity of ZnO nanoparticles to *Folsomia candida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 108: 9-15.