فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۳۷۵-۳٦٤ (۱۳۸۸)

# تأثیر هورمونی و ریزنمونه بر کالزایی، باززایی و کشت سوسپانسیون سلولی در رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.)

**پانتهآ سرخیل[۱]، منصور امیدی[۲*]، سیدعلی پیغمبری[۳] و سعید دوازده امامی[٤]**

۱- کارشناس ارشد، گروه زراعت و علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زراعت و علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

پست الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زراعت و علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

٤-استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۷ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۸

## چکیده

به منظور بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر کالزایی و باززایی در گیاه رازیانه، پنج ریزنمونه (برگ، هیپوکوتیل، مریستم انتهایی، ریشه و طوقه) انتخاب شد. بذر گیاه رازیانه بعد از استریل به محیط آب در لوله آزمایش روی پل کاغذی کشت و در دمای۲٤°C با ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی قرار داده شد و بعد از گذشت ١٥ روز که گیاه به ارتفاع حدود ١٠ سانتی‌متر رسید ریزنمونه‌ها تهیه شدند. القای کالوس با کشت ریزنمونه‌ها روی محیط MS ½ با ۹ تیمار هورمونی شامل هورمون 2,4-D (۲، ٤ و ٨ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) تحت شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و دمای ۲٤oC انجام شد. اندازه کالوس، وزن کالوس و درصد کالزایی در هر یک از تیمارهای بکار رفته اندازه‌گیری شد. با درنظر گرفتن صفات فوق هورمونی ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین ترکیبهای هورمونی و نیز هیپوکوتیل و مریستم انتهایی بهترین ریزنمونه‌ها شناخته شدند. در مرحله باززایی کالوس محیط MS ½ با ۹ ترکیب هورمونی یاد شده به همراه 2,4-D (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۵، ۲، ٤، ١٥، ٢٠ و ٢٥ میلی‌گرم در لیتر) و TDZ (١٥ و ٢٠ میکرولیتر) و محیط MS ½ بدون هورمون در نظر گرفته شد که محیط MS ½ بدون هورمون بهترین محیط باززایی را نشان داد. به منظور مطالعه تولید اسانس در فاز کشت سوسپانسیون سلولی بهترین تیمار در فاز کالزایی انتخاب شد و کالوس به محیط سوسپانسیون سلولی به محیط کشت MS ½ شامل 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل و در شرایط تاریکی در دمای ۲٤oC روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بعد از ٤ هفته طیف‌نگاری جرمی انجام شد که تولید موادی همچون آلفا-پینن و لیمونن در محیط کشت بافت گزارش شد.

**واژه‌های کلیدی:** رازیانه، کشت بافت، کالزایی، کشت سوسپانسیون.

## مقدمه

گیاه رازیانه در صنایع مختلف دارویی، غذایی، بهداشتی و آرایشی کاربردهای فراوانی دارد. اسانس میوه رازیانه محتوی اترهای فنلی می‌باشد که عامل اصلی خاصیت دارویی آن محسوب می‌شود. از میوه گیاه به‌عنوان ضد اسپاسم، نیرودهنده، آرامش‌بخش و افزایش‌دهنده شیر استفاده می‌شود. اسانس میوه‌های رازیانه حاوی آلفا-پینن، کامفن، آلفا-فلاندرن، ترانس-آنتول، فنکون، استراگول، انیس‌آلدئید و در نهایت مقادیر اندکی از برخی ترکیبهای قلیایی است (Stahl *et al.*, 1975). میوه رازیانه دارای نوعی اثر استروژنیک بوده و سبب افزایش وزن و چاقی می‌شود (lawless, 1992).

Theiler و همکاران (۱۹۹۱) با مطالعه روی ۲ جمعیت از گیاه رازیانه در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و۰/۳ میلی‌گرم در لیتر کاینتین موفق به کالزایی گیاه رازیانه شدند. جنین‌زایی سوماتیکی در محیط MS ½ بدون هورمون گسترش پیدا کرد. همچنین برای جنین‌زایی سوماتیکی از۲۰ نوع پروتکل استفاده شد که براساس مطالعات قبلی بود (Hanault & Manoir, 1992؛ Theiler *et al.*, 1991). تنها جمعیت *Francia pernod* توانایی جنین‌زایی سوماتیکی را نشان داد که دلیل این عدم پاسخ اختلاف ژنوتیپی گزارش شد. در این پروتکل کالوس‌های غیرجنینی ۱۲ ماه در محیط حاوی 2,4-D قرار داشتند که کالوس‌های ثانویه با خاصیت جنین‌زایی تولید و به محیط MS جامد و مایع فاقد 2,4-D منتقل شدند و باززایی انجام شد. دومین پروتکل بر مبنای این روش بود که کالوس‌های جنینی ثانویه در محیط دارای ۰/۸۸ میکرومول 2,4-D و ۲/۳ میکرومول کاینتین قرار گرفتند. بعد به محیطی حاوی ۳/۳ میکرومول $GA_3$ منتقل شد و رشد جنین سوماتیکی به فراوانی گسترش پیدا کرد (Hunault & Mattar, 1995).

اثر جیبرلیک اسید $GA_3$ برای افزایش میزان جنین‌زایی سوماتیکی در رازیانه بررسی شده که در این آزمایش ریزنمونه‌ها به مدت ٤ هفته (محیط MS حاوی 2,4-D و کاینتین) نگهداری شده و بعد به محیط عاری از هورمون منتقل شدند تا جنین رشد کند. با اضافه نمودن $GA_3$ (اتوکلاو شده یا با فیلتر) به این محیط میزان نمونه‌های جنینی افزایش یافت (Hunault *et al.*, 1995).

Anzidei و همکاران (۱۹۹٦) با مطالعه روی چندین جمعیت رازیانه ازجمله Borntraeger (آلمان)، Aboca erba (ترکیه)، Sedaherb (فرانسه)، Francia pernod (فرانسه)، Scafati و Antella (ایتالیا) اعلام کردند که تنها جمعیتهای Aboca erba و Francia pernod تحت شرایط محیط MS حاوی ۰/۸۸ میکرومول 2,4-D و ۲/۳ میکرومول کاینتین به کالوس دست یافتند. در این مطالعه ریزنمونه هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه موفق در کالزایی معرفی شده است (Anzidie *et al.*, 1996).

براساس گزارش Anzidei و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل به بررسی اندام‌زایی این گیاه پرداختند و سطوح مختلفی از هورمون NAA به همراه کاینتین یا BA را روی جمعیت *Francia pernod* بررسی نمودند. آنها اندام‌زایی را در محیط دارای KIN+NAA گزارش نموده و بیشترین باززایی در محیطی که به نسبت ۱:۱ اکسین و سیتوکینین داشت را بعد از گذشت ۹ ماه اعلام کردند (NAA: ۲/٦ و ۵/۲ میلی‌گرم در لیتر و Kin: ۲/۳، ٤/٦، ۹/۲ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر). همچنین در این تحقیقات اعلام شد که افزایش زمان در کشت، میزان باززایی را افزایش خواهد داد.

Bennici و همکـــاران (٢٠٠٤) پایـــداری ژنتیکـــی و یکنواختی گیـاه رازیانـه را در جمعیـت *Francia pernod* بررسـی نمـوده و براسـاس ایـن مطالعـه کروموزومهـای دیپلوئیدی نرمـالی را بـرای کـالوس‌هـای بـا مورفولـوژی متفـاوت و بـاززایی گیاهـان را از مـسیر embryogenic و organogenesis گزارش کرده‌انـد و بـا اسـتفاده از مـارکر RAPD گیاهان باززایی شده هیچ‌گونه DNA پلی‌مورفیسم را نـشان ندادنـد. ایـن مطالعـات براسـاس مقایـسه ناحیـه میکروسـتلایت cpDNA گیـاه وحـشی رازیانـه صـورت گرفت. به‌طور کلی هیچ‌گونه گزارشـی از ترکیـب اکـسین 2,4-D با سیتوکینین BAP در خانواده چتریان تا به امـروز منتشر نشده است. در مطالعات قبلی روی گیاه رازیانه تنها هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونـه موفـق معرفـی شـده اسـت. هدف از این مطالعه، دستیابی بـه گیاهچـه کامـل از سـایر ریزنمونه‌ها در کوتاهترین زمان و انتخـاب بهتـرین محـیط کشت از نظر اقتصادی بود.

## مواد و روشها

### الف- جوانه‌زنی بذر

بذرهای گیاه رازیانه از دانشگاه صـنعتی اصـفهان تهیـه شد که این بذرها از نقاط مختلف کشور ازجمله ورامـین، اصفهان و همدان جمع‌آوری شده بود. برای استریل کـردن بذرها در زیر هود، ابتدا بذرها با آب جـاری شستـشو داده شدند، بعد در الکـل ٧٠٪ بـه مـدت ٣٠ ثانیـه تکـان داده شدند و بعد بـه‌وسـیله آب مقطـر اسـتریل شستـشو و در محلول هیپوکلریت سدیم با ٢/٥٪ ماده مؤثره به مـدت ١٠ دقیقه همراه با تکان دادن قرار داده و بعد ٣ تا ٥ بار با آب مقطـر٢ بـار اسـتریل شـده کـاملاً شستـشو شـدند. بـرای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه به‌منظور دستیابی بـه ریزنمونـه، بذرها در محـیط MS و MS ½ مـایع بـدون هورمـون بـر روی پل کاغذی تحت شرایط استریل کشت شدند. در هر لوله ٥ عدد بذر روی پل قرار داده شد و ٢٥-٢٠ میلی‌لیتـر محیط کشت مایع قرار داده شد و در دمـای $^{o}C$ ٢٥ در ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعـد از ٤ روز بـذرها جوانـه زده و بعـد از گذشـت ٢ هفتـه از زمان کشت بذر گیاهچه‌های تازه جوانـه زده آمـاده بـرای تهیه ریزنمونه بودند.

### ب- کالزایی

در مرحله اول محیط‌های MS پایه و MS رقیـق شـده برای کالزایی مورد ارزیابی قرار گرفـت. از MS ½ حـاوی هورمونهای 2,4-D و BAP به میزان تعیین شده در جدول استفاده شد. پس از تنظیم PH به میزان ٥/٨-٥/٦ مقـدار ٨ گرم آگار در لیتر به محـیط کـشت اضـافه شـد و اسـتریل گردید. بعد محیط کشت در پتری‌دیش‌های اسـتریل شـده بـه میـزان مـشخص (٢٥-٢٠ میلـی‌لیتـر)، توزیـع شـد. از هیپوکوتیل، مریستم انتهایی، طوقه، ریشه و برگ بـه‌عنـوان ریزنمونه استفاده شد. بررسی کالزایی با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٦ تکرار انجام شد. در هـر پتری‌دیش ٥ ریزنمونه قرار داده و هر پتری به منزلـه یـک تکرار قلمداد شـد. در نهایـت [ ٤ (ریزنمونـه)×٩ (سـطح هورمونی)×٦ (تکرار)] تهیه شد و ٢١٦ پتـری‌دیـش مـورد مطالعه قرار گرفت. صفات اندازه‌گیری شده در فاز کالزایی عبارت از: ١- درصد کالزایی ٢- وزن کالوس و ٣- اندازه کالوس بودند.

جدول ۱- ترکیبات هورمونی استفاده شده برای کالزایی

| نام محیط | 2,4-D میلی‌گرم در لیتر | BAP میلی‌گرم در لیتر |
|---|---|---|
| A | ۲ | ۰/۲۵ |
| B | ۲ | ۰/۵ |
| C | ۲ | ۱ |
| D | ۴ | ۰/۲۵ |
| E | ۴ | ۰/۵ |
| F | ۴ | ۱ |
| G | ۸ | ۰/۲۵ |
| H | ۸ | ۰/۵ |
| I | ۸ | ۱ |

**ج- باززایی**

جهت باززایی غیرمستقیم، کالوس‌های حاصل از هر ٤ ریزنمونه به محیط منتقل شد. از محیط ½MS جامد (۸ گرم آگار برای هر لیتر محیط کشت) به‌عنوان محیط کشت با دو سطح هورمونی و همچنین بدون هورمون در نظر گرفته شد و از تیمارهای A′، B′، C′، D′، E′، F′، G′، H′ و I′ به شرح جدول ۲ استفاده شد. بعد پتری‌دیش‌ها در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ١٦ ساعت روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جدول ۲- ترکیبات هورمونی استفاده شده برای باززایی

| نام محیط | 2,4-D میلی‌گرم در لیتر | BAP میلی‌گرم در لیتر |
|---|---|---|
| A′ | ۰/۲ | ۰/۵ |
| B′ | ۰/۲ | ۲ |
| C′ | ۰/۲ | ٤ |
| D′ | ۰/۲ | ۱۵ |
| E′ | ۰/۲ | ۲۰ |
| F′ | ۰/۲ | ۲۵ |
| | 2,4-D میلی گرم در لیتر | TDZ میکرولیتر |
| G′ | ۰/۲ | ۵ |
| H′ | ۰/۲ | ۲۰ |
| I′ | محیط MS ½ بدون هورمون | |

**د- کشت سوسپانسیون**

به‌منظور بررسی کشت سوسپانسیون سلولی از محیط ½ MS استفاده شد. همچنین بهترین سطح هورمونی که به منظور کالزایی استفاده شد این بار به صورت محلول مورد استفاده قرار گرفت. محیط MS ½ با سطح هورمونی 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) استریل شد و ۱۰ میلی‌گرم از محیط کشت را در ارلن‌های ۱۵۰ میلی‌لیتر توزیع نموده و کالوس‌های هیپوکوتیل، مریستم انتهایی و ریشه که شرایط ظاهری مناسبی از حیث رنگ و اندازه داشتند به ارلن‌های حاوی محیط کشت به‌طور مساوی (از لحاظ اندازه کال‌ها) اضافه شد. در نهایت ارلن‌ها بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. طی گذشت یک هفته به منظور بدست آوردن ۵۰ میلی‌گرم محیط سوسپانسیون سلولی و مشاهده تغییر رنگ محیط (که نشان از جداسازی سلولهای تولیدی و از هم پاشیدگی توده‌های کالوس بود) هر هفته ۱۰ میلی‌گرم محیط کشت مورد نظر که به تازگی تهیه و استریل شده بود به ارلن اضافه شد. جداسازی سلولهای تولیدی، بی نیاز از کاربرد آنزیم پکتیناز به خوبی انجام شد. مطالعه اسانس در گیاه رازیانه بدین صورت انجام شد که ابتدا هر ۳ محیط سوسپانسیون را از صافی عبور داده و بعد محلولهای صاف شده را جداگانه درون قیف جداکننده ریخته، ۱۵ میلی‌گرم پنتان به آن اضافه کرده و به آرامی قیف جداکننده تکان داده شد، به‌طوری که محلول کف نکند. بعد از هر بار تکان شیر قیف جداکننده را باز نموده تا گاز تشکیل شده از پنتان خارج شود. ابتدا محلول زیرین را جدا نموده و محلول رویی که حاوی پنتان و مواد حل شده در چربی است را درون بشر دیگری جدا نموده و بعد بشری که حاوی محلول زیرین بود درون قیف جداکننده برگردانده و عمل اضافه نمودن پنتان و جدا نمودن دو محلول ۲ بار دیگر تکرار شد. بعد از جدا نمودن محلول رویی به علت وجود حبابهای آب سولفات سدیم به آن اضافه کرده تا آب را جذب کند. بشر حاوی محلول پنتان را زیر هود قرار داده تا حلال پنتان بپرد و زمانی که محلول به ۰/۵ میلی‌گرم کاهش یافت درون شیشه‌های مخصوص ریخته شد تا برای تزریق به دستگاه آماده شود.

## نتایج

در میان ۵ ریزنمونه ذکر شده به‌علت عدم پاسخ، ریزنمونه برگ در مرحله کالزایی حذف شد. ریزنمونه برگ در محیط کشت MS ½ تنها به رشد خود ادامه می‌داد و هیچ‌گونه تحریک‌پذیری نسبت به کالزایی نشان نداد. یک هفته پس از قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کالزایی A، B، C، D، E، F، G، H و I به‌طور محسوسی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و مریستم انتهایی متورم شده بودند اما در مورد محیط کالزایی حاوی 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) کالزایی از واکشت اول به بعد آغاز شد. براساس مصرف مواد مغذی محیط توسط ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یک‌بار عمل واکشت انجام شد. این عمل ۳ بار انجام شد و ارزیابی صفات اندازه کال‌ها و درصد کالزایی و وزن کال‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند.

تجزیه واریانس در خصوص اندازه کال‌ها نشان داد که اثر غلظت 2,4-D و BAP و ریزنمونه‌ها و اثر متقابل آنها و محیط کشت در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین سطوح 2,4-D وBAP و ریزنمونه‌ها نشان داد که بهترین تیمار $A_1B_1C_4$ و $A_2B_2C_3$ است که تفاوتی با تیمارهای $A_1B_1C_3$ و $A_1B_2C_4$ و $A_3B_2C_3$ ندارند. در این مرحله نیز می‌توان براساس مقایسه میانگینها نتیجه گرفت که بهترین محیط در بدست آوردن حجم بیشتر

کالوس مربوط به محیط A (۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) است و محیط‌های B، C، D، E و F دارای پتانسیل بالایی برای رسیدن به حجم بالای کالوس‌ها را دارا می‌باشند (جدول ٦).

قابل ذکر است که برای آنالیز داده‌ها ۲ تاریخ واکشت دوم و سوم به‌عنوان دو مشاهده در تجزیه واریانس اندازه کالوس در نظر گرفته شد و در آنالیز این صفت از آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو مشاهده استفاده شد. با در نظر گرفتن جدول ٦ (مقایسه میانگینها) اینگونه می‌توان مطرح کرد که با توجه به کمترین سطح 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر)، ریزنمونه هیپوکوتیل و مریستم انتهایی بیشترین سطح را به خود اختصاص داده و ریزنمونه‌های ریشه و طوقه به‌ترتیب در جایگاه بعدی قرار گرفته‌اند.

براساس نتایج تجزیه واریانس که اثر محیط بر روی وزن کالوس را نشان می‌دهد، دو منبع تغییر سطوح هورمونی بر وزن کالوس‌های ایجاد شده به‌طور معنی‌داری در سطح ۱٪ مؤثر بودند ( جدول ۲).

تجزیه واریانس در خصوص صفت وزن کال‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که ۳ غلظت 2,4-D استفاده شده در این آزمایش اختلاف معنی‌داری بوجود آورده است. به‌طوری که در این آزمایش نیز کمترین سطح از هورمون 2,4-D وزن بالاتری از کالوس را ایجاد کرده است. همچنین تجزیه واریانس نیز وجود اختلاف معنی‌داری را در ۳ سطح هورمون BAP نشان می‌دهد و طبق نتایج قبلی کمترین میزان از BAP (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش وزن کالوس می‌شود. قابل توجه است که در تجزیه واریانس مربوط به وزن کالوس به علت احتمال آلودگی نمونه‌ها، وزن کالوس تنها در واکشت اول مورد ارزیابی قرار گرفت و اثر واکشت بر وزن کالوس بررسی نشد. همچنین بین نوع ریزنمونه تفاوت معنی‌داری مشاهده شده است (جدول ۲). در میان ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، مریستم انتهایی، طوقه و ریشه، $A_1B_1C_4$ سنگین‌ترین کال‌ها را ایجاد نموده است. در حالی که طوقه، ریشه و هیپوکوتیل در جایگاه بعدی قرار دارند (جدول ٤).

در ارتباط با این آزمون اثر سطوح هورمونی بر وزن کال‌ها، با کاربرد کمترین غلظت هورمون 2,4-D (۲میلی‌گرم در لیتر)، مریستم انتهایی بالاترین وزن کالوس و بعد هیپوکوتیل، ریشه و طوقه در جایگاه‌های بعدی هستند. همچنین کاربرد کمترین سطح هورمون BAP (۰/۲۵ و۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) هیپوکوتیل بیشترین وزن کالوس و به‌ترتیب مریستم انتهایی، طوقه و ریشه در جایگاه بعدی قرار دارند (جدول ٤).

تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت BAP و 2,4-D بر روی القاء کالوس در مورد هر ٤ ریزنمونه مورد مطالعه معنی‌دار است (جدول ٥).

مقایسه میانگین مربوط به بخش کالزایی که به مقایسه اثرهای اصلی غلظت BAP، 2,4-D و ریزنمونه می‌پردازد، نشان می‌دهد که بین ۲ غلظت 2,4-D (۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شده در این آزمایش از نظر درصد کالزایی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (جدول ٦). به‌طوری که بالاترین درصد کالزایی در کمترین مقدار 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمده است و با توجه به این جدول در مورد ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و مریستم انتهایی اختلافی بین میزان 2,4-D (۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده نشد و استفاده از مقادیر بیشتر 2,4-D درصد کالزایی را کاهش داده است. بالاترین میزان درصد کالزایی مربوط به کمترین مقدار BAP (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در

لیتر) بود و استفاده از مقادیر بالاتر BAP باعث کاهش کالزایی شد. در مجموع با در نظر گرفتن تمام موارد بالا می‌توان بیان کرد که محیط کشت A (۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) و D (٤ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) بهترین محیط‌های کشت از نظر تولید کالوس هستند و پس از آنها محیط‌های کشت B، C، E، F، G، H و I نیز از پتانسیل کالزایی خوبی برخوردار بودند.

کالوس‌های حاصل از محیط القاء کالوس در شرایط کاملاً استریل، پس از ۳ هفته در همان محیط‌های کشت خود واکشت شدند. کالوس‌های واکشت شده تقریباً پس از یک هفته مجدداً شروع به رشد چشمگیری کردند. در این آزمایش برای بررسی اثر غلظت BAP و 2,4-D بر روی رشد کالوس ۳ واکشت در نظر گرفته شد و طی ۲ مرحله آخر واکشت حجم کالوس با استفاده از روش استاندارد هوکرونی برز، اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب رشد کالوس براساس افزایش حجم آن طی ٤۲ و ٦۳ روزگی کال‌ها ارزیابی شد.

به‌طور کلی طبق مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح هورمونی و نوع ریزنمونه نشان می‌دهد که مریستم انتهایی و هیپوکوتیل در سطوح پایین هر دو نوع هورمون به‌ترتیب بهترین ریزنمونه و تیمار هورمونی هستند (جدول ٦). بدلیل تفاوت در نوع کال‌های ایجاد شده توسط ریزنمونه‌ها و در نتیجه تفاوت در تراکم کال‌ها، می‌توان یادآور شد که الزاماً در تمامی موارد یک کالوس بزرگتر، یک کالوس سنگین‌تر نیست که این اختلاف در میانگین اندازه ریزنمونه‌ها در بررسی اثر ۳ غلظت BAP قابل مشاهده است. به‌عنوان مثال کالوس‌های سبز رنگ ایجاد شده در هیپوکوتیل و مریستم انتهایی دارای تفاوت محسوسی در تراکم هستند و طیف متنوعی را از کالوس‌های پودری (کم تراکم) تا کالوس‌های مجتمع و سخت (با تراکم بالا) را در بر می‌گیرند و بنابراین جرم واحد حجمی متفاوتی نیز دارند.

نتایج آزمایشهای انجام شده براساس ۹ تیمار پیشنهادی به منظور باززایی گیاه رازیانه نشان دادند که در محیط‌های A′، B′ و C′ تنها مریستم انتهایی به سطحی از باززایی رسید که میزان آن بسیار کم بود. برخلاف این ۳ محیط، محیط MS ½ بدون هورمون بهترین محیط به منظور باززایی ریشه، مریستم انتهایی و هیپوکوتیل شناخته شد (شکل ۱ و ۲). به علت تعداد تیمار بالای بکار رفته در بخش باززایی، هدف تنها باززایی گیاه بود و هیچ‌گونه آنالیز آماری روی آن انجام نشد. ریزنمونه طوقه به هیچ یک از محیط‌های باززایی پاسخ نداد.

آزمایشها نشان داد که محیط‌های A′، B′ و C′ تنها باعث گسترش کال‌ها و افزایش حجم کال‌ها شد و هیچ‌گونه پاسخ به باززایی داده نشد. در محیط بدون هورمون بعد از ٤ بار واکشت نمودن ( با گذشت ۳ ماه از تاریخ انتقال کال‌ها به محیط باززایی) باززایی بسیار خوبی مشاهده شد. در محیط‌های باززایی E′، F′، G′، H′ و I′ باززایی صورت نگرفت و باززایی تنها از کشت مریستم انتهایی حاصل شد. قابل توجه است که میزان باززایی و تعداد ساقه‌های ایجاد شده روی هر یک از ریزنمونه‌های ساقه و مریستم انتهایی به میزان ۳۰ عدد بود و روی ریزنمونه ریشه نیز میزان ساقه به تعداد ۲۰ عدد رسید. ۳ نمونه تهیه شده در بخش سوسپانسیون جهت آنالیز توسط GC/Mass انتخاب شدند و با کمک حلال پنتان متابولیتهای احتمالی موجود در محیط کشت استخراج شدند و نهایتاً طبق پروتکل مربوطه به دستگاه تزریق شدند. کلیه موارد انجام شده در این بخش در پژوهشکده گیاهان دارویی وابسته به جهاد دانشگاهی انجام شد.

آنالیز توسط دستگاه GC/Mass وجود متابولیتهای ثانویه آلفا-پینن و لیمونن را نشان داد که این دو جزو متابولیتهای ارزشمند این گیاه شناخته شدند و به میزان مناسب تولید شده بودند.

**جدول ۳- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در خصوص اندازه کالها**

| S.O.V | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| 2,4-D | ۲ | ٤٥٧/٠٢ | ۲۲۸/٥۱ | ۷۰/٤٦** |
| BAP | ۲ | ۲۸۰/٦۹ | ۱٤۰/۳٥ | ٤۳/۲۸** |
| Explants | ۳ | ۱٥۷۰/۹۹ | ٥۲۳/٦۷ | ۱٦۱/٤۷** |
| 2,4-D× BAP | ٤ | ۱۹۳/٥٦ | ٤۸/۳۹ | ۱٤/۹۲** |
| 2,4-D×Explants | ٦ | ۱٦۸/۷٤ | ۲۸/۱۲ | ۸/٦۷** |
| BAP× Explants | ٦ | ۷۰/٥۱ | ۱۱/۷٥ | ۳/٦۲** |
| 2,4-D× BAP× Explants | ۱۲ | ۲٦٥/۹۸ | ۲۲/۱۷ | ٦/۸۳** |
| Error | ۱۸۰ | ٥۸۳/۷٦ | ۳/۲٤ | |
| Error | ۲۱٦ | ٥۳۱/۷۳ | ۲/٤٦ | |
| Total | ٤۳۱ | ٤۱۲۲/۹۸ | – | |

**جدول ٤- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در خصوص وزن کالها**

| S.O.V | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| 2,4-D | ۲ | ۰/٤۱۲ | ۰/۲۰٦ | ۳٤۷/٥۰** |
| BAP | ۲ | ۰/٦۲ | ۰/۰۳۱ | ٥۲/۱۷** |
| Explants | ۳ | ۰/۱٥۳ | ۰/۰٥۱ | ۸٥/۹٤** |
| 2,4-D× BAP | ٤ | ۰/۰۳٥ | ۰/۰۰۹ | ۱٤/۸٤** |
| 2,4-D×Explants | ٦ | ۰/۰۳۸ | ۰/۰۰٦ | ۱۰/۷۹** |
| BAP× Explants | ٦ | ۰/۰۱٦ | ۰/۰۰۳ | ٤/٤۹** |
| 2,4-D× BAP× Explants | ۱۲ | ۰/۰٤۰ | ۰/۰۰۳ | ٥/٦۷** |
| Error | ۱۸۰ | ۰/۱۰۷ | ۰/۰۰۱ | – |
| Total | ۲۱٥ | ۰/۸٦۳ | – | – |

**جدول ٥- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در خصوص درصد کالزایی**

| S.O.V | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| 2,4-D | ۲ | ٤/۸۹ | ۲/٤٥ | ۱۳۲/۸۲** |
| BAP | ۲ | ۰/۸٦ | ۰/٤۳ | ۲۳/۳۳** |
| Explants | ۳ | ۲/٥۳ | ۰/۸٤ | ٤٥/۷٦** |
| 2,4-D× BAP | ٤ | ۰/۲٦ | ۰/۰۷ | ۳/٦۳** |
| 2,4-D×Explants | ٦ | ۰/٦۷ | ۰/۱۱ | ٦/۰۷** |
| BAP× Explants | ٦ | ۰/٦٤ | ۰/۱۲ | ٥/۸۱** |
| 2,4-D× BAP× Explants | ۱۲ | ۰/۳۸ | ۰/۰۳ | ۱/۷۳ns |
| Error | ۱۸۰ | ۳/۳۱ | ۰/۰۲ | – |
| Total | ۲۱٥ | ۱۳/٥٦ | – | – |

**جدول ٦- مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل 2,4-D×BAP×Explants بر روی اندازه کالوس، وزن کالوس و درصد کالزایی**

(مقایسه میانگین طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است.)

| فاکتور | سطح کالوس | وزن کالوس | درصد کالزایی |
|---|---|---|---|
| $A_1B_1C_1$ | ۱۳/۲۷ c/g | ۰/۱۰۸ cd | ۱/۰۰ a |
| $A_1B_1C_2$ | ۱۲/۵۵ d/i | ۰/۰۹٤ c/f | ۱/۰۰a |
| $A_1B_1C_3$ | ۱۵/٤۷ ab | ۰/۱۸۸ ab | ۱/۰۰a |
| $A_1B_1C_4$ | ۱٦/۳٦ a | ۰/۱۹۹ a | ۱/۰۰a |
| $A_1B_2C_1$ | ۱۰/٤۳ j/m | ۰/۱٦ ab | ۰/٦۷ d/g |
| $A_1B_2C_2$ | ۹/۲۵ mn | ۰/۰۸ c/g | ۰/۷۳ c/g |
| $A_1B_2C_3$ | ۱۲/۹۵ d/h | ۰/۱٦٤ ab | ۱/۰۰a |
| $A_1B_2C_4$ | ۱۵/۵۲ ab | ۰/۱۸۳ ab | ۱/۰۰a |
| $A_1B_3C_1$ | ۷/۵۵ op | ۰/۰۷٤ c/h | ۰/۵٦۷ gh |
| $A_1B_3C_2$ | ۸/۷ no | ۰/۰۵ g/j | ۰/۸۳ abcd |
| $A_1B_3C_3$ | ۱۳/٦۸ cde | ۰/۱۵۷ b | ۱/۰۰a |
| $A_1B_3C_4$ | ۱۳/٤۸ c/f | ۰/۱۵۸ ab | ۱/۰۰a |
| $A_2B_1C_1$ | ۱۱/۸۲ f/k | ۰/۰٦۷ d/h | ۰/۹۰ abc |
| $A_2B_1C_2$ | ۱۱/٤۵ h/k | ۰/۱۰۳ cde | ۰/۹٦ ab |
| $A_2B_1C_3$ | ۱۵/۳۵ ab | ۰/۱٦ ab | ۱/۰۰a |
| $A_2B_1C_4$ | ۱٤/۲۰ bcd | ۰/۱۱ c | ۱/۰۰a |
| $A_2B_2C_1$ | ۱۲/۲۲ e/i | ۰/۰۱٦ j | ۱/۰۰a |
| $A_2B_2C_2$ | ۱۱/٦۳ g/k | ۰/۰۱۲ j | ۰/۹۰abc |
| $A_2B_2C_3$ | ۱٤/۰۰ bcd | ۰/۱۰۸ cd | ۱/۰۰a |
| $A_2B_2C_4$ | ۱۲/٦۳ d/i | ۰/۰۹۹ c/f | ۱/۰۰a |
| $A_2B_3C_1$ | ۱۲/۸۷ d/h | ۰/۰٤۳ g/j | ۰/۸۳ abcd |
| $A_2B_3C_2$ | ۱۱/۰۲ i/l | ۰/۰۱۸ ij | ۰/۷۳ c/g |
| $A_2B_3C_3$ | ۱۵/۹۳ a | ۰/۰۳۲ hij | ۱/۰۰a |
| $A_2B_3C_4$ | ۱٤/۱۳ bcd | ۰/۰٤۲ g/j | ۱/۰۰a |
| $A_3B_1C_1$ | ۱۱/۵۷ g/k | ۰/۰۲۰ ij | ۰/٦۷ d/g |
| $A_3B_1C_2$ | ۱۰/۳۲ klm | ۰/۰۲۰ ij | ۰/٦۳ e/h |
| $A_3B_1C_3$ | ۱۳/٦۲ cde | ۰/۰٦٤٦ e/h | ۰/۹۰abc |
| $A_3B_1C_4$ | ۱۲/۱۲ e/j | ۰/۰۳۹ g/j | ۰/۷۳ c/g |
| $A_3B_2C_1$ | ۷/٤۰۰ op | ۰/۰۱٦ j | ۰/٤۳ hi |
| $A_3B_2C_2$ | ٦/٦۷ pq | ۰/۰۱٤ j | ۰/۳۳ ij |
| $A_3B_2C_3$ | ۱٤/۸۳ abd | ۰/۰۳۹٦ g/j | ۰/۷۷ c/f |
| $A_3B_2C_4$ | ۱۳/۵۰ c/f | ۰/۰۳۸0/038 g/j | ۰/۸۰ b/e |
| $A_3B_3C_1$ | ۹/٦۵۰ lmn | ۰/۰۰۹۸0/0098 j | ۰/۲۷ j |
| $A_3B_3C_2$ | ۵/۳۳ q | ۰/۰۱۲0/012 j | ۰/۳۰ ij |
| $A_3B_3C_3$ | ۱۱/۲۲ h/l | ۰/۰۲0/02 ij | ۰/۸۳ a/d |
| $A_3B_3C_4$ | ۱۱/۷۷ f/k | ۰/۰٦ f/i | ۰/٦۰ fg |

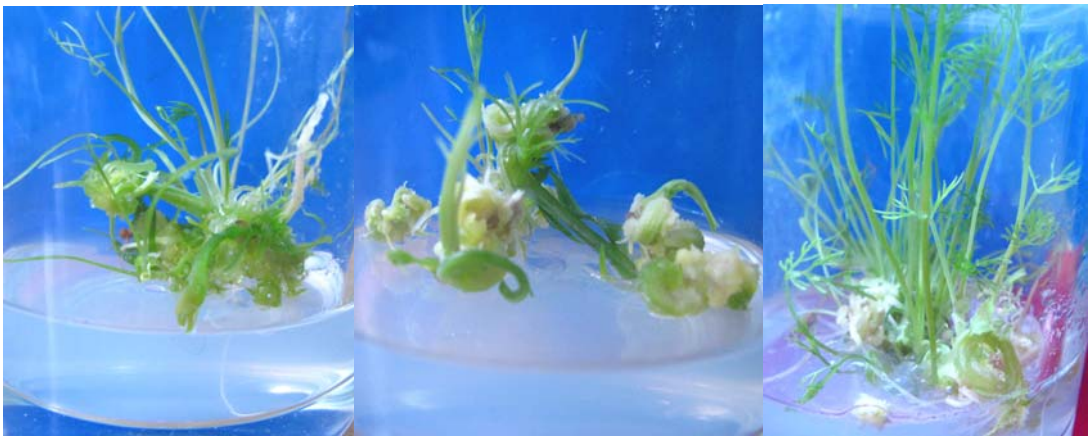
میانگینهای دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند.

$A_1$= 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) $B_1$= BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) $C_1$= ریشه

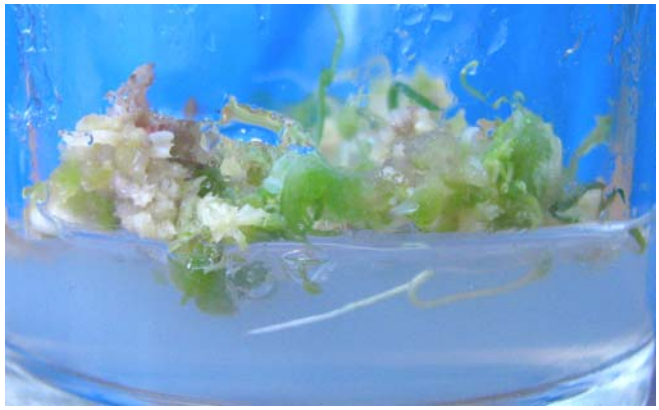
$A_2$= 2,4-D (٤ میلی‌گرم در لیتر) $B_2$= BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) $C_2$= طوقه

$A_3$= 2,4-D (۸ میلی‌گرم در لیتر) $B_3$= BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) $C_3$= مریستم انتهایی

$C_4$= ساقه



**شکل ۱- اندام‌زایی کالوس حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، مریستم انتهایی و ریشه در محیط فاقد هورمون (به‌ترتیب از راست به چپ)**



**شکل ۲- تولید ریشه در کالوس در محیط فاقد هورمون**

## بحث

براساس مطالعه Theiler Hedtrich و Kagi (۱۹۹۱) محیط MS ½ در این تحقیق به میزان بسیار بالایی در فاز کالزایی پاسخ داد و مطالعه تولید گیاه سالم در فاز باززایی در محیط فاقد هر گونه هورمونی تأییدی بر مطالعه آنها بود.

مطالعات انجام شده روی گیاه رازیانه حکایت از آن داشت که تنها ریزنمونه هیپوکوتیل پاسخ مناسب به تیمارها داده است، اما در تحقیق کنونی ٤ ریزنمونه پاسخ مناسبی دادند که این مورد نسبت به بررسیهای Anzidei و همکاران (۱۹۹٦ و ۲۰۰۰) قابل پیشرفت بوده است و تولید اندام از کالوس که هدف اصلی بود بعد از گذشت ٤ ماه و نیم با استفاده از محیط بدون هورمون انجام شد که در مطالعه صورت گرفته توسط Anzidei و همکاران (۱۹۹٦) اندام‌زایی به مدت ۹ ماه و با استفاده از هورمون اعلام شده است. گذشت زمان در کشت، میزان باززایی را افزایش داد که این نتیجه با مطالعه Anzidie و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت داشت.

با توجه به سازگاری بالای این گیاه به انواع روش کشت بافت و پاسخ‌دهی به حداقل شرایط باززایی (محیط

فاقد هورمون) پیشنهادهایی براساس نتایج این تحقیق توصیه می‌شود: مطالعه و بررسی مسیرهای بیوشیمیایی مسئول تولید متابولیتهای ثانویه ارزشمند گیاه و نهایتاً بکارگیری تکنیکهای مهندسی متابولیت برای بهینه‌سازی کشت سوسپانسیون سلولی از لحاظ تولید بیشتر متابولیتهای ثانویه با ارزش. بررسی متابولیتهای ثانویه گیاه در مراحل مختلف از کشت بافت و نیز تهیه محیطهای سوسپانسیون در این مراحل توصیه می‌شود.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از خانم دکتر خلیلی سیگارودی که در بخش آنالیز اسانس راهنمایی‌های ارزنده‌ای نمودند و نیز از آقای دکتر رضازاده (رئیس پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی) قدردانی می‌شود.

## منابع مورد استفاده

- Anzidei, M., Vivona, L., Schiff, S. and Bennici, A., 1996. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: Callus characteristics in relation to morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 45: 263-268.
- Anzidie, M., Bennici, A., Schiff, S., Tan, C. and Mori, B., 2000. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observation of developing embryogenesis callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61: 69-79.
- Bennici, A., Anzidei, M. and Vendramin, G., 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. Regeneration of plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant Science, 166: 221-227.
- Hanault, G. and Mattar, A., 1995. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41: 171-176.
- Hanault, G. and Manoir, J., 1992. Micro propagation of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, 19: 199-217.
- Lawless, J., 1992. The Encyclopedia of Essential oils , Element Books Lt, Shaftesbur ,United Of Kigdom, 256 pages.
- Stahl, E., Dumont, E. and Jork, H., 1975. Analyze chromatograhique et Microscopique des drogues. Technique et Documentation, pp: 148-149.
- Theiler Hedtrich, R. and Kagi, A.C., 1991. Cloning *in vitro* & somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) of 'Zeta fino' and 'Zefa tard'. Acta Horticulture, 300: 287-291.

# The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill.

**P. Sarkheil[1], M. Omidi[2*], S.A. Peyghambari[2] and S. Davazdahemami[3]**

1- Agriculture and Natural Resources of Tehran University, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agriculture, Tehran University, Iran,
E-mail: momidi@ut.ac.ir
3- Agricultural and Natural Resources Research Center of Esfahan, Iran

Received: December 2008 Revised: March 2009 Accepted: May 2009

## Abstract

Seeds were cultured on Whatman paper by sterile water in cube, solid MS and solid MS $\frac{1}{2}$. Seeds were not germinated on medium but 80% of seeds were germinated on Whatman paper, so this method is used as a basic method. Seeds were germinated after four days and after two weeks of culture they had normal roots, shoots and leaves. Cultures were incubated at 25° ±2°C and exposed to 16 hours light per day. Explants were cultured on MS $\frac{1}{2}$ medium supplemented with 3% sucrose and solidified with 0.8% (w/v) agar. The pH of the medium was adjusted to 5.8 before autoclaving. Different types of explants were used for this experiment; root, crown, apical meristem, hypocotyls and leaf. Between different kinds of explants leaf didn't response to callogenesis. The effects of different combinations of 2,4-D (2,4-Diclorophenoxy acetic acid) and BAP (6-Benzylaminopurine) were studied. Subculture was done every 3 weeks. In order to determine regeneration ability, the initiated callus were transferred to a regeneration medium which was composed of macronutrient, micronutrient and organic components of MS $\frac{1}{2}$, 2,4-D (0.2 $mgL^{-1}$), BAP (0.5, 2, 4, 15, 20 and 25 $mgL^{-1}$) and MS $\frac{1}{2}$ without hormones, 0/3% sucrose, pH 5.8 for 4 weeks. In the presence of 2,4-D (2 and 4 $mgL^{-1}$) and BAP (0.25 and 0.5 $mgL^{-1}$) in the callus induction medium, high callus production percentage was reported. The hypocotyls, in contrast to the primary leaf explants, and apical meristem segments were more responsive to the tested combinations of 2,4-D and BAP. The callus from all explants was soft, watery and loose friable. During subculture period, hypocotyls and apical meristem were proliferated more on medium with the addition of (0.25 and 0.5 $mgL^{-1}$) BAP and (2 and 4 $mgL^{-1}$) 2,4-D than the medium contain BAP (1 $mgL^{-1}$) and 2,4-D (8 $mgL^{-1}$). The present study, in *F. vulgare* MS $\frac{1}{2}$ media without any hormone was sufficient to regenerate the plantlet from the hypocotyls, roots and apical meristems explants. In MS $\frac{1}{2}$ medium supplemented with BAP (0.5, 2 and 4 $mgL^{-1}$) and 2,4-D (0.2 $mgL^{-1}$) shoots were formed earlier when the number of subculture was increased 4 times.

**Key words:** fennel, plant regeneration, callogenesis, growth regulators.