

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

پانته آ سرخیل<sup>۱</sup>، منصور امید<sup>۲\*</sup>، سیدعلی پیغمبری<sup>۳</sup> و سعید دوازده امامی<sup>۴</sup>

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

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

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۸

تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۸۷

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۷

### 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 دمای ۲۴°C با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد و بعد از گذشت ۱۵ روز که گیاه به ارتفاع حدود ۱۰ سانتی متر رسید ریزنمونه‌ها تهیه شدند. القای کالوس با کشت ریزنمونه‌ها روی محیط MS 1/2 با ۹ تیمار هورمونی شامل هورمون 2,4-D (۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴°C انجام شد. اندازه کالوس، وزن کالوس و درصد کالزایی در هر یک از تیمارهای بکار رفته اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن صفات فوق هورمونی ۲ و ۴ 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 1/2 با ۹ ترکیب هورمونی یاد شده به همراه 2,4-D (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۵، ۲، ۴، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر) و TDZ (۱۵ و ۲۰ میکرولیتر) و محیط MS 1/2 بدون هورمون در نظر گرفته شد که محیط MS 1/2 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 1/2 شامل 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل و در شرایط تاریکی در دمای ۲۴°C روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بعد از ۴ 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 اثرهای 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 و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر کایتین موفق به کالزایی گیاه رازیانه شدند. جنین‌زایی سوماتیکی در محیط MS ۱/۲ بدون هورمون گسترش پیدا کرد. همچنین برای جنین‌زایی سوماتیکی از ۲۰ نوع پروتکل استفاده شد که براساس مطالعات قبلی بود (Hanault & Manoïr, 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 کایتین قرار گرفتند. بعد به محیطی حاوی ۳/۳ میکرومول GA<sub>3</sub> منتقل شد و رشد

جنین سوماتیکی به فراوانی گسترش پیدا کرد (Hunault & Mattar, 1995).

اثر جیبرلیک اسید GA<sub>3</sub> برای افزایش میزان جنین‌زایی سوماتیکی در رازیانه بررسی شده که در این آزمایش ریزنمونه‌ها به مدت ۴ هفته (محیط MS حاوی 2,4-D و کایتین) نگهداری شده و بعد به محیط عاری از هورمون منتقل شدند تا جنین رشد کند. با اضافه نمودن GA<sub>3</sub> (اتوکلاو شده یا با فیلتر) به این محیط میزان نمونه‌های جنینی افزایش یافت (Hunault et al., 1995).

Anzidei و همکاران (۱۹۹۶) با مطالعه روی چندین جمعیت رازیانه از جمله 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 کایتین به کالوس دست یافتند. در این مطالعه ریزنمونه هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه موفق در کالزایی معرفی شده است (Anzidei 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 کایتین 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: ۲/۶ و ۵/۲ میلی‌گرم در لیتر و Kin: ۲/۳، ۴/۶، ۹/۲ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر). همچنین در این تحقیقات اعلام شد که افزایش زمان در کشت، میزان باززایی را افزایش خواهد داد.

جوانه‌زنی و تولید گیاهچه به منظور دستیابی به ریزنمونه، بذرها در محیط MS و MS ½ مایع بدون هورمون بر روی پل کاغذی تحت شرایط استریل کشت شدند. در هر لوله ۵ عدد بذر روی پل قرار داده شد و ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع قرار داده شد و در دمای °C ۲۵ در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از ۴ روز بذرها جوانه زده و بعد از گذشت ۲ هفته از زمان کشت بذر گیاهچه‌های تازه جوانه زده آماده برای تهیه ریزنمونه بودند.

### ب- کالزایی

در مرحله اول محیط‌های MS پایه و MS رقیق شده برای کالزایی مورد ارزیابی قرار گرفت. از MS ½ حاوی هورمونهای 2,4-D و BAP به میزان تعیین شده در جدول استفاده شد. پس از تنظیم PH به میزان ۵/۸-۵/۶ مقدار ۸ گرم آگار در لیتر به محیط کشت اضافه شد و استریل گردید. بعد محیط کشت در پتری‌دیش‌های استریل شده به میزان مشخص (۲۵-۲۰ میلی‌لیتر)، توزیع شد. از هیپوکوتیل، مریستم انتهایی، طوقه، ریشه و برگ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. بررسی کالزایی با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار انجام شد. در هر پتری‌دیش ۵ ریزنمونه قرار داده و هر پتری به منزله یک تکرار قلمداد شد. در نهایت [ ۴ (ریزنمونه) × ۹ (سطح هورمونی) × ۶ (تکرار) ] تهیه شد و ۲۱۶ پتری‌دیش مورد مطالعه قرار گرفت. صفات اندازه‌گیری شده در فاز کالزایی عبارت از: ۱- درصد کالزایی ۲- وزن کالوس و ۳- اندازه کالوس بودند.

Bennici و همکاران (۲۰۰۴) پایداری ژنتیکی و یکنواختی گیاه رازیانه را در جمعیت *Francia pernod* بررسی نموده و براساس این مطالعه کروموزومهای دیپلوئیدی نرمالی را برای کالوس‌های با مورفولوژی متفاوت و باززایی گیاهان را از مسیر embryogenic و organogenesis گزارش کرده‌اند و با استفاده از مارکر RAPD گیاهان باززایی شده هیچ‌گونه DNA پلی‌مورفیسم را نشان ندادند. این مطالعات براساس مقایسه ناحیه میکروستلایت cpDNA گیاه وحشی رازیانه صورت گرفت. به‌طور کلی هیچ‌گونه گزارشی از ترکیب اکسین 2,4-D با سیتوکینین BAP در خانواده چتریان تا به امروز منتشر نشده است. در مطالعات قبلی روی گیاه رازیانه تنها هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه موفق معرفی شده است. هدف از این مطالعه، دستیابی به گیاهچه کامل از سایر ریزنمونه‌ها در کوتاهترین زمان و انتخاب بهترین محیط کشت از نظر اقتصادی بود.

### مواد و روشها

#### الف- جوانه‌زنی بذر

بذره‌های گیاه رازیانه از دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شد که این بذرها از نقاط مختلف کشور از جمله ورامین، اصفهان و همدان جمع‌آوری شده بود. برای استریل کردن بذرها در زیر هود، ابتدا بذرها با آب جاری شستشو داده شدند، بعد در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شدند و بعد به‌وسیله آب مقطر استریل شستشو و در محلول هیپوکلریت سدیم با ۲/۵٪ ماده مؤثره به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن قرار داده و بعد ۳ تا ۵ بار با آب مقطر ۲ بار استریل شده کاملاً شستشو شدند. برای

جدول ۱- ترکیبات هورمونی استفاده شده برای کالزایی

| نام محیط | 2,4-D<br>میلی گرم در لیتر | BAP<br>میلی گرم 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

گرفته شد و از تیمارهای 'A', 'B', 'C', 'D', 'E', 'F', 'G', 'H' و 'I' به شرح جدول ۲ استفاده شد. بعد پتری دیش‌ها در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جهت باززایی غیرمستقیم، کالوس‌های حاصل از هر ۴ ریزنمونه به محیط منتقل شد. از محیط ۱/۲MS جامد (۸ گرم آگار برای هر لیتر محیط کشت) به عنوان محیط کشت با دو سطح هورمونی و همچنین بدون هورمون در نظر

جدول ۲- ترکیبات هورمونی استفاده شده برای باززایی

| نام محیط | 2,4-D<br>میلی گرم در لیتر | BAP<br>میلی گرم در لیتر |
|----------|---------------------------|-------------------------|
| A'       | ۰/۲                       | ۰/۵                     |
| B'       | ۰/۲                       | ۲                       |
| C'       | ۰/۲                       | ۴                       |
| D'       | ۰/۲                       | ۱۵                      |
| E'       | ۰/۲                       | ۲۰                      |
| F'       | ۰/۲                       | ۲۵                      |
|          | 2,4-D میلی گرم در لیتر    | TDZ میکرو لیتر          |
| G'       | ۰/۲                       | ۵                       |
| H'       | ۰/۲                       | ۲۰                      |
| I'       | محیط ۱/۲ MS بدون هورمون   |                         |

## د- کشت سوسپانسیون

به منظور بررسی کشت سوسپانسیون سلولی از محیط  $1/2$  MS استفاده شد. همچنین بهترین سطح هورمونی که به منظور کالزایی استفاده شد این بار به صورت محلول مورد استفاده قرار گرفت. محیط  $1/2$  MS با سطح هورمونی 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵ میلی گرم در لیتر) استریل شد و ۱۰ میلی گرم از محیط کشت را در ارلن های ۱۵۰ میلی لیتر توزیع نموده و کالوس های هیپوکوتیل، مریستم انتهایی و ریشه که شرایط ظاهری مناسبی از حیث رنگ و اندازه داشتند به ارلن های حاوی محیط کشت به طور مساوی (از لحاظ اندازه کالها) اضافه شد. در نهایت ارلن ها بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. طی گذشت یک هفته به منظور بدست آوردن ۵۰ میلی گرم محیط سوسپانسیون سلولی و مشاهده تغییر رنگ محیط (که نشان از جداسازی سلولهای تولیدی و از هم پاشیدگی توده های کالوس بود) هر هفته ۱۰ میلی گرم 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 میلی گرم پنتان به آن اضافه کرده و به آرامی قیف جداکننده تکان داده شد، به طوری 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 میلی گرم کاهش یافت درون شیشه های مخصوص ریخته شد تا برای تزریق به دستگاه آماده شود.

## نتایج

در میان ۵ ریزنمونه ذکر شده به علت عدم پاسخ، ریزنمونه برگ در مرحله کالزایی حذف شد. ریزنمونه برگ در محیط کشت MS  $1/2$  تنها به رشد خود ادامه می داد و هیچ گونه تحریک پذیری نسبت به کالزایی نشان نداد. یک هفته پس از قرار گرفتن ریزنمونه ها در محیط کالزایی A, B, C, D, E, F, G, H و I به طور محسوسی ریزنمونه های هیپوکوتیل و مریستم انتهایی متورم شده بودند اما در مورد محیط کالزایی حاوی 2,4-D (۸ میلی گرم در لیتر) کالزایی از واکنش اول به بعد آغاز شد. براساس مصرف مواد مغذی محیط توسط ریزنمونه ها هر ۳ هفته یکبار عمل واکنش 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 ریزنمونه ها و اثر متقابل آنها و محیط کشت در سطح ۱٪ معنی دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین سطوح 2,4-D و BAP و ریزنمونه ها 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 می توان براساس مقایسه میانگینها نتیجه گرفت که بهترین محیط در بدست آوردن حجم بیشتر

ارزیابی قرار گرفت و اثر واکشت بر وزن کالوس بررسی نشد. همچنین بین نوع ریزنمونه تفاوت معنی داری 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 ۴).

در ارتباط با این آزمون اثر سطوح هورمونی بر وزن کالها، با کاربرد کمترین غلظت هورمون 2,4-D (۲ میلی‌گرم 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 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) هیپوکوتیل بیشترین وزن کالوس و به ترتیب مریستم انتهایی، طوقه و ریشه در جایگاه بعدی قرار دارند (جدول ۴).

تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر غلظت BAP و 2,4-D بر روی القاء کالوس در مورد هر ۴ ریزنمونه مورد مطالعه معنی دار است (جدول ۵).

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 ۴ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شده در این آزمایش از نظر درصد کالزایی اختلاف معنی داری وجود ندارد (جدول ۶). به طوری 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 ۴ 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

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 ۶).

قابل ذکر است که برای آنالیز داده‌ها ۲ تاریخ واکشت دوم و سوم به عنوان 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 ۶ (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 به ترتیب در جایگاه بعدی قرار گرفته‌اند.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس که اثر محیط بر روی وزن کالوس را نشان می‌دهد، دو منبع تغییر سطوح هورمونی بر وزن کالوس‌های ایجاد شده به طور معنی داری 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 معنی داری بوجود آورده است. به طوری 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 معنی داری 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

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 1/2 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 ۴ 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.

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 (۴ 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, 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 ۴۲ و ۶۳ 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 به ترتیب بهترین ریزنمونه و تیمار هورمونی هستند (جدول ۶). 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 محسوس در تراکم هستند و طیف

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

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

| F        | MS     | SS      | DF  | S.O.V                |
|----------|--------|---------|-----|----------------------|
| ۷۰/۴۶**  | ۲۲۸/۵۱ | ۴۵۷/۰۲  | ۲   | 2,4-D                |
| ۴۳/۲۸**  | ۱۴۰/۳۵ | ۲۸۰/۶۹  | ۲   | BAP                  |
| ۱۶۱/۴۷** | ۵۲۳/۶۷ | ۱۵۷۰/۹۹ | ۳   | Explants             |
| ۱۴/۹۲**  | ۴۸/۳۹  | ۱۹۳/۵۶  | ۴   | 2,4-D× BAP           |
| ۸/۶۷**   | ۲۸/۱۲  | ۱۶۸/۷۴  | ۶   | 2,4-D×Explants       |
| ۳/۶۲**   | ۱۱/۷۵  | ۷۰/۵۱   | ۶   | BAP× Explants        |
| ۶/۸۳**   | ۲۲/۱۷  | ۲۶۵/۹۸  | ۱۲  | 2,4-D× BAP× Explants |
|          | ۳/۲۴   | ۵۸۳/۷۶  | ۱۸۰ | Error                |
|          | ۲/۴۶   | ۵۳۱/۷۳  | ۲۱۶ | Error                |
|          | -      | ۴۱۲۲/۹۸ | ۴۳۱ | Total                |

جدول ۴- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در خصوص وزن کالها

| F        | MS    | SS    | DF  | S.O.V                |
|----------|-------|-------|-----|----------------------|
| ۳۴۷/۵۰** | ۰/۲۰۶ | ۰/۴۱۲ | ۲   | 2,4-D                |
| ۵۲/۱۷**  | ۰/۰۳۱ | ۰/۶۲  | ۲   | BAP                  |
| ۸۵/۹۴**  | ۰/۰۵۱ | ۰/۱۵۳ | ۳   | Explants             |
| ۱۴/۸۴**  | ۰/۰۰۹ | ۰/۰۳۵ | ۴   | 2,4-D× BAP           |
| ۱۰/۷۹**  | ۰/۰۰۶ | ۰/۰۳۸ | ۶   | 2,4-D×Explants       |
| ۴/۴۹**   | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۱۶ | ۶   | BAP× Explants        |
| ۵/۶۷**   | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۴۰ | ۱۲  | 2,4-D× BAP× Explants |
| -        | ۰/۰۰۱ | ۰/۱۰۷ | ۱۸۰ | Error                |
| -        | -     | ۰/۸۶۳ | ۲۱۵ | Total                |

جدول ۵- تجزیه واریانس برای صفات مورد مطالعه در خصوص درصد کالزایی

| F                  | MS   | SS    | DF  | S.O.V                |
|--------------------|------|-------|-----|----------------------|
| ۱۳۲/۸۲**           | ۲/۴۵ | ۴/۸۹  | ۲   | 2,4-D                |
| ۲۳/۳۳**            | ۰/۴۳ | ۰/۸۶  | ۲   | BAP                  |
| ۴۵/۷۶**            | ۰/۸۴ | ۲/۵۳  | ۳   | Explants             |
| ۳/۶۳**             | ۰/۰۷ | ۰/۲۶  | ۴   | 2,4-D× BAP           |
| ۶/۰۷**             | ۰/۱۱ | ۰/۶۷  | ۶   | 2,4-D×Explants       |
| ۵/۸۱**             | ۰/۱۲ | ۰/۶۴  | ۶   | BAP× Explants        |
| ۱/۷۳ <sup>ns</sup> | ۰/۰۳ | ۰/۳۸  | ۱۲  | 2,4-D× BAP× Explants |
| -                  | ۰/۰۲ | ۳/۳۱  | ۱۸۰ | Error                |
| -                  | -    | ۱۳/۵۶ | ۲۱۵ | Total                |



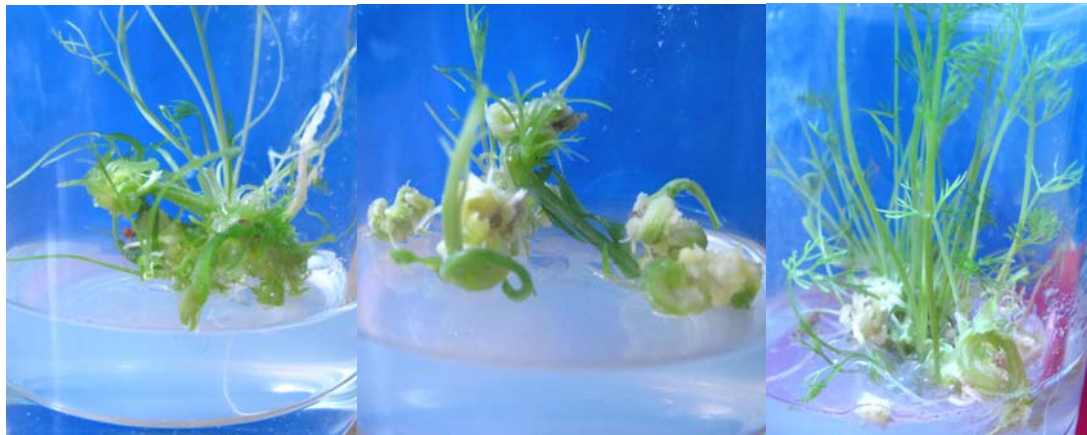
جدول ۶- مقایسه میانگین مربوط به اثر متقابل 2,4-D×BAP×Explants بر روی اندازه کالوس، وزن کالوس و درصد کالزایی

(مقایسه میانگین طبق روش دانکن در سطح ۰.۵٪ صورت گرفته است.)

| فاکتور                                       | سطح کالوس | وزن کالوس     | درصد کالزایی |
|--|-----------|---------------|--------------|
| A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> | ۱۳/۲۷ c/g | ۰/۱۰۸ cd      | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> | ۱۲/۵۵ d/i | ۰/۰۹۴ c/f     | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> | ۱۵/۴۷ ab  | ۰/۱۸۸ ab      | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>4</sub> | ۱۶/۳۶ a   | ۰/۱۹۹ a       | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> | ۱۰/۴۳ j/m | ۰/۱۶ ab       | ۰/۶۷ d/g     |
| A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> | ۹/۲۵ mn   | ۰/۰۸ c/g      | ۰/۷۳ c/g     |
| A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> | ۱۲/۹۵ d/h | ۰/۱۶۴ ab      | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> | ۱۵/۵۲ ab  | ۰/۱۸۳ ab      | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> | ۷/۵۵ op   | ۰/۰۷۴ c/h     | ۰/۵۶۷ gh     |
| A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> | ۸/۷ no    | ۰/۰۵ g/j      | ۰/۸۳ abcd    |
| A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> | ۱۳/۶۸ cde | ۰/۱۵۷ b       | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>4</sub> | ۱۳/۴۸ c/f | ۰/۱۵۸ ab      | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> | ۱۱/۸۲ f/k | ۰/۰۶۷ d/h     | ۰/۹۰ abc     |
| A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> | ۱۱/۴۵ h/k | ۰/۱۰۳ cde     | ۰/۹۶ ab      |
| A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> | ۱۵/۳۵ ab  | ۰/۱۶ ab       | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>4</sub> | ۱۴/۲۰ bcd | ۰/۱۱ c        | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> | ۱۲/۲۲ e/i | ۰/۰۱۶ j       | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> | ۱۱/۶۳ g/k | ۰/۰۱۲ j       | ۰/۹۰ abc     |
| A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> | ۱۴/۰۰ bcd | ۰/۱۰۸ cd      | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> | ۱۲/۶۳ d/i | ۰/۰۹۹ c/f     | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> | ۱۲/۸۷ d/h | ۰/۰۴۳ g/j     | ۰/۸۳ abcd    |
| A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> | ۱۱/۰۲ i/l | ۰/۰۱۸ ij      | ۰/۷۳ c/g     |
| A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> | ۱۵/۹۳ a   | ۰/۰۳۲ hij     | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>4</sub> | ۱۴/۱۳ bcd | ۰/۰۴۲ g/j     | ۱/۰۰ a       |
| A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> | ۱۱/۵۷ g/k | ۰/۰۲۰ ij      | ۰/۶۷ d/g     |
| A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> | ۱۰/۳۲ klm | ۰/۰۲۰ ij      | ۰/۶۳ e/h     |
| A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub> | ۱۳/۶۲ cde | ۰/۰۶۴۶ e/h    | ۰/۹۰ abc     |
| A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>4</sub> | ۱۲/۱۲ e/j | ۰/۰۳۹ g/j     | ۰/۷۳ c/g     |
| A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> | ۷/۴۰۰ op  | ۰/۰۱۶ j       | ۰/۴۳ hi      |
| A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> | ۶/۶۷ pq   | ۰/۰۱۴ j       | ۰/۳۳ ij      |
| A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub> | ۱۴/۸۳ abd | ۰/۰۳۹۶ g/j    | ۰/۷۷ c/f     |
| A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>4</sub> | ۱۳/۵۰ c/f | ۰/۰۳۸۰۰۳۸ g/j | ۰/۸۰ b/e     |
| A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>1</sub> | ۹/۶۵۰ lmn | ۰/۰۰۹۸۰۰۰۹۸ z | ۰/۲۷ j       |
| A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> | ۵/۳۳ q    | ۰/۰۱۲۰۰۱۲ j   | ۰/۳۰ ij      |
| A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> | ۱۱/۲۲ h/l | ۰/۰۲۰۰۲ ij    | ۰/۸۳ a/d     |
| A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>4</sub> | ۱۱/۷۷ f/k | ۰/۰۶ f/i      | ۰/۶۰ fg      |

میانگینهای دارای حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند.

2,4-D =A<sub>1</sub> (۲ میلی گرم در لیتر) BAP =B<sub>1</sub> (۰/۲۵ میلی گرم در لیتر) =C<sub>1</sub> ریشه  
 2,4-D =A<sub>2</sub> (۴ میلی گرم در لیتر) BAP =B<sub>2</sub> (۰/۵ میلی گرم در لیتر) =C<sub>2</sub> طوقه  
 2,4-D =A<sub>3</sub> (۸ میلی گرم در لیتر) BAP =B<sub>3</sub> (۱ میلی گرم در لیتر) =C<sub>3</sub> مریستم انتهایی  
 =C<sub>4</sub> ساقه



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



شکل ۲- تولید ریشه در کالوس در محیط فاقد هورمون

## بحث

براساس مطالعه Kagi و Theiler Hedtrich (۱۹۹۱) محیط MS ۱/۲ 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 ۴ ریزنمونه پاسخ مناسبی دادند که این مورد نسبت به بررسیهای Anzidei و

همکاران (۱۹۹۶ و ۲۰۰۰) قابل پیشرفت بوده است و تولید اندام از کالوس که هدف اصلی بود بعد از گذشت ۴ ماه و نیم با استفاده از محیط بدون هورمون انجام شد که در مطالعه صورت گرفته توسط Anzidei و همکاران (۱۹۹۶) 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 Anzidei و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت داشت.

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

- characteristics in relation to morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 263-268.
- Anzidei, 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. *Analyse chromatographique 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.

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

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

P. Sarkheil<sup>1</sup>, M. Omid<sup>2\*</sup>, S.A. Peyghambari<sup>2</sup> and S. Davazdahemami<sup>3</sup>

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-Dichlorophenoxy 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<sup>-1</sup>), BAP (0.5, 2, 4, 15, 20 and 25 mgL<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>) and BAP (0.25 and 0.5 mgL<sup>-1</sup>) 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<sup>-1</sup>) BAP and (2 and 4 mgL<sup>-1</sup>) 2,4-D than the medium contain BAP (1 mgL<sup>-1</sup>) and 2,4-D (8 mgL<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>) and 2,4-D (0.2 mgL<sup>-1</sup>) shoots were formed earlier when the number of subculture was increased 4 times.

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