مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال ششم، شماره دوم، پاییز و زمستان، ۱۳۹۹

بهینه‌سازی القاء کالوس در گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* M.)

علی صارمی‌راد[۱*]، رویا آذرکیش[۲]، سمیرا عباسی[۳]

چکیده

اثرات جانبی کم‌تر گیاهان دارویی در مقایسه با داروهای شیمیایی سبب شده است تا مورد توجه روزافزون واقع شوند. رازیانه به دلیل دارا بودن خواص درمانی متعدد و برخورداری از چندین ماده مؤثره ارزشمند دارویی در زمره گیاهان دارویی مهم و با ارزش قرار می‌گیرد. با توجه به اهمیت این گیاه از نظر دارویی و امکان تولید متابولیت‌های آن در شرایط درون شیشه‌ای، مطالعه عوامل مؤثر بر تولید این متابولیت‌ها ضروری است؛ ضمن این که می‌توان پروتکل کارآمدی برای باززایی غیرمستقیم و انتقال ژن نیز ارائه کرد. بدین منظور، پژوهشی به‌صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۷ انجام شد. عوامل مورد بررسی شامل ژنوتیپ (فرانسه و اصفهان)، محیط کشت MS غنی‌شده با تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (0، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نیز بافت ریزنمونه (ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون) بودند. صفات وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، اندازه کالوس و درصد القای کالوس اندازه‌گیری شدند. طبق نتایج حاصله، ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ اصفهان در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D از بیش‌ترین وزن تر کالوس برخوردار بود. ژنوتیپ فرانسه در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP وزن تر بالایی داشت. بیش‌ترین وزن خشک کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ فرانسه با محیط کشت غنی با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد. در خصوص ویژگی اندازه کالوس، ریزنمونه کوتیلدون قرار گرفته در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهترین واکنش را داشت. ریزنمونه کوتیلدون در تمامی ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد محیط کشت بهترین القاء کالوس را داشت.

کلمات کلیدی: رازیانه، تنظیم‌کننده رشد، کوتیلدون، هیپوکوتیل

[۱] دکتری تخصصی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، کرج، ایران. * نویسنده مسئول. آدرس ایمیل: asaremirad@gmail.com

[۲] دانش موخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۳] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

مقدمه

گیاهان خانواده چتریان از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه حائز اهمیت ویژه‌ای هستند. رازیانه گیاهی، علفی، دیپلوئید (۲n=۲x=۲۲)، معطر و چندساله با نام علمی Foeniculum vulgare تعلق به خانواده چتریان دارد که از دوران باستان توسط انسان شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته است. در ابتدا این گیاه به دلیل عطر و طعم آن در کشورهای پیرامون دریای مدیترانه مورد کشت قرار می‌گرفت (Gross et al., 2009)، اما امروزه رازیانه یکی از اقتصادی‌ترین گیاهان دارویی در منطقه مدیترانه به حساب می‌آید و به لحاظ اهمیت دارویی فراوانی که این گیاه دارد، کشت آن در اکثر نقاط جهان صورت می‌پذیرد و تنها محدود به منطقه مدیترانه نمی‌گردد.

تمام پیکره رازیانه اعم از ریشه، برگ و دانه از مواد مؤثره مختلف برخوردار است که نوع و میزان ترکیب‌های شیمیایی حاصل از قسمت‌های مختلف، متفاوت بوده، اما به‌طور کلی دانه دارای بیش‌ترین مقدار این مواد می‌باشد. تانن، روغن ثابت پالماز، فنچون، فلاندرن، لیمونن، دیپنتن، استراگول، متیل اورانژ، کامفن، ویتامین آ، مواد پروتئینی، قندی و روغنی از ترکیبات شیمیایی دانه هستند؛ روغن استحصالی از دانه حاوی ۴ درصد اسید پالمتیک، ۲۲ درصد اسید اولئیک، ۱۴ درصد اسید لینولئیک و ۶۰ درصد اسید پتروسلینیک است (Emad et al., 2012). تاکنون از برگ این گیاه فینکولارین، کوئرستین آرابینوزید و نلومبوزید فلاونوئید و از ریشه آن کومارین‌ها و آپیول استخراج شده است (Emad et al., 2012; Milena Nikolova and Evstatieva, 2011). اسانس حاصل از رازیانه دارای بیش از ۳۰ نوع ترکیب‌های ترپنی یا ترپنوئیدی می‌باشد (Omidbeygi, 2009). مقدار اسانس در میوه و برگ‌ها ۱/۵ -۱ درصد و در ریشه ۰/۷ -۰/۶ درصد است (Ghasemi-Dehkordi, 2002). موادی که در تشکیل اسانس دخالت دارند عبارت از قند، لعاب، تانن، روغن ثابت لیماز، فنچون، فلاندرن، لیمونن، دیپنتن، کامفن پینن، متیل چاویکول، انیسیک اسید، تیموها، یدروکینون انیستون و ویتامین آ هستند (Emad et al., 2012). این گیاه به دلیل دارا بودن این ترکیبات مفید و سایر مواد موثره موجود در اندام‌های مختلف، از خواص دارویی متعددی اعم از خاصیت آنتی باکتریایی (Gulfraz et al., 2008)، ضد اسپاسم (Alexandrovich et al., 2003; Liu et al., 2010; Sajomsang et al., 2009)، تسکین‌دهنده درد (Guang-shou et al., 2011)، ضد التهاب (Özbek, 2005)، ضد تب (Tanira et al., 1996)، ضد اضطراب (Kishore et al., 2012)، آنتی اکسیدانت (Singh and Kale, 2008)، کاهنده فشار خون (Haze et al., 2002)، ادرار آور (Tanira et al., 1996)، خلط آور (Riva, 2000) و حفاظت‌کنندگی کبد (Mansour et al., 2011) می‌باشد؛ موارد ذکر شده مؤید نقش دارویی بسیار قوی رازیانه است که می‌تواند نسبت به داروهای شیمیایی در اولویت قرار گیرد و با بکارگیری در صنعت

داروسازی جایگزین داروهای شیمیایی گردد تا اثرات سوء ناشی از آن‌ها را در حد ممکن به حداقل برساند. بیوتکنولوژی گیاهی به یک ابزار مفید و قدرتمند در دستان به‌نژادگران گیاهی مبدل شده است که نهایتاً سبب توسعه و افزایش سرعت برنامه‌های اصلاحی گیاهان گردیده است. تحولات اخیر در علوم گیاهی به‌ویژه گیاهان دارویی مختلف از قبیل پروانش (Malabadi et al., 2012)، ازمک (Ivarson et al., 2013)، زیره سبز (Bagheri et al., 2013)، درمنه کوهی (Gharehmatrossian et al., 2014)، خار مریم (AbouZid, 2014)، بابونه (Masoumiasl et al., 2015)، کرچک (Abd Elaleem et al., 2015)، شنبلیله (Ciura et al., 2015)، شاهی (Golkar et al., 2019)،گل محمدی (Saremirad and Mohammadi, 2020) و تعدادی دیگر از گیاهان دارویی به روشنی مؤید نتایج مطلوب و قابل توجه رویکرد کشت بافت در پیشرفت بهبود گیاهان می‌باشد. القا کالوس در اندام‌های مختلف گیاهی و باززایی آن یکی از روش‌های کارآمد کشت بافت در تکثیر گیاهان تحت شرایط درون شیشه‌ای محسوب می‌شود. بافت کالوس تنها به تکثیر گیاهان محدود نمی‌شود و در مواردی دیگری نظیر برنامه‌های انتقال ژن و تولید متابولیت‌هایی ثانویه کاربرد دارد (Kayser and Quax, 2006). ژنوتیپ گیاه، نوع بافت و سن ریزنمونه، ترکیبات تشکیل‌دهنده محیط کشت و حتی نحوه قرار گرفتن ریزنمونه در محیط کشت از مؤلفه‌های مهمی به‌شمار می‌روند که القاء کالوس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Khawar et al., 2005; Neibaur et al., 2008; Farsi and Zolala, 2003)؛ لذا دست‌یابی به دستورالعمل‌های مؤثر و تکرارپذیر با در نظر داشتن مؤلفه‌های تأثیرگذار، به‌منظور تولید کالوس می‌تواند بسیار مفید و کارا باشد. در خصوص کالوس‌زایی رازیانه گزارش‌های محدودی ارائه شده است که اطلاعات مفیدی در مورد ترکیب هورمونی محیط کشت القاء کالوس و نوع ریزنمونه مورد استفاده جهت کالوس‌زایی در دسترس قرار نمی‌دهد؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی و شناسایی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی توفوردی (2,4-D) و بنزیل آمینو پورین (BAP) در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف رازیانه پایه‌ریزی شد و به مرحله اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

دو ژنوتیپ مختلف رازیانه به‌عنوان مواد گیاهی در مطالعه حاضر در نظر گرفته شدند. ژنوتیپ اول با منشا کشور فرانسه و ژنوتیپ دوم اکوتیپ بومی اصفهان بود که از بانک ژن موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه گردیدند.

جهت تأمین ریز نمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون مورد نیاز به‌منظور القاء کالوس، ابتدا بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در زیر آب جاری آبشویی شدند، سپس به مدت پنج دقیقه با مایع ظرف‌شویی شستشو و بعد از آن با آب مقطر آبکشی گردیدند و به زیر هود لامینار انتقال یافتند. در زیر هود لامینار به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم دو درصد (حجمی/حجمی) ضدعفونی

شدند و سپس سه مرتبه با آب مقطر آبکشی شدند. در مرحله آخر بذرها در الکل ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت یک دقیقه قرار داده شدند و در نهایت برای از بین بردن اثر اتانول سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در پیش تیمار نیترات پتاسیم (KNO3) با غلظت دو پی‌پی‌ام قرار گرفتند. نیترات پتاسیم یکی از مؤثرترین و نیز پر مصرف‌ترین مواد شیمیایی در القاء و افزایش جوانه‌زنی بذور می‌باشد. پس از اعمال پیش تیمار، بذور در ظروف شیشه‌ای بر روی محیط کشت پایه MS و ۱/۲ MS بدون تنظیم‌کننده رشد (Murashige and Skoog, 1962) با هدف یافتن بهترین محیط جوانه‌زنی، کشت و به اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

با جوانه‌زنی بذور و رشد و نمو گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، منبع ریزنمونه ریشه، هیپوکوتیل و کوتیلدون جهت انجام مراحل بعدی آزمایش فراهم گردید. جهت القاء کالوس با توجه به عوامل تحت بررسی (ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد) از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بهره برده شد. ریزنمونه‌های مختلف مربوط به هر یک از ژنوتیپ‌ها بر روی محیط کشت MS حاوی ۹ ترکیب تنظیم‌کننده رشد حاصل از اختلاط 2,4-D (یک، دو و پنج میلی‌گرم در لیتر) و BAP (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. در طول مدت زمان انجام آزمایش عکس‌العمل ریزنمونه‌های مختلف از نظر کالوس‌زایی پایش و در نهایت پس از گذشت حدود چهار هفته وزن تر کالوس، وزن خشک کالوس، اندازه کالوس و القاء کالوس ارزیابی شدند.

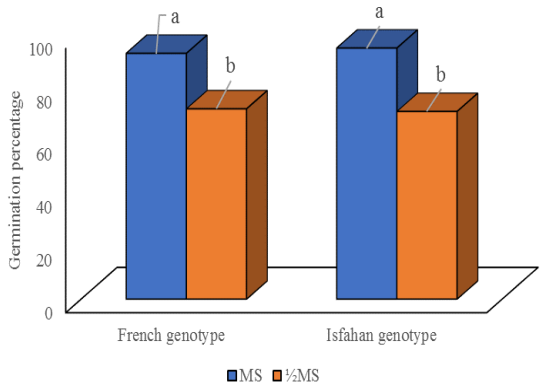
بررسی نرمال بودن داده‌های به‌دست‌آمده به‌وسیله نرم‌افزار Minitab 17 انجام شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین اثرات اصلی و برهمکنش‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mstat-C به روش چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح احتمال پنج درصد صورت پذیرفت. همچنین برای رسم نمودارها از محیط Microsoft Excel 2013 استفاده شد.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی بذور

تأثیر محیط‌های کشت MS و ½MS بر ویژگی درصد جوانه‌زنی بذور ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در شکل ۱ ارائه شده است. ژنوتیپ فرانسه در محیط کشت MS دارای ۹۳ درصد و در محیط کشت ½MS دارای ۷۱ درصد جوانه‌زنی بود. ژنوتیپ اصفهان نیز در محیط کشت MS با ۹۵ درصد جوانه‌زنی بذر، از بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی برخوردار بود؛ در محیط ½MS درصد بذور جوانه‌زده ژنوتیپ اصفهان برابر با ۷۱ درصد برآورد گردید. یکی از مواد شیمیایی که در پیش‌تیمار بذور به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد و نتایج مطلوبی در افزایش جوانه‌زنی بذور گیاهان مختلف در پی داشته است، نیترات پتاسیم می‌باشد. محلول حاصل از نیترات

پتاسیم به‌طور معمول در آزمایش‌های جوانه‌زنی بذر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرفی کاربرد آن جهت جوانه‌زنی بذور بسیاری از گونه‌های گیاهی از سوی انجمن متخصصان رسمی بذر و انجمن بین‌المللی آزمون‌های بذر (Copland and McDonald, 1995) توصیه گردیده است. در مطالعه حاضر نیز برای افزایش در جوانه‌زنی بذور رازیانه، از نیترات پتاسیم بهره برده شد و مشاهده گردید که بذور پیش تیمارشده با این محلول از نتایج مثبتی در جوانه‌زنی برخوردار هستند. در بررسی‌های انجام‌شده به‌منظور تعیین بهترین شرایط جوانه‌زنی بذور، مشخص شد، محیط کشت پایه MS سبب افزایش جوانه‌زنی هر دو ژنوتیپ فرانسه و اصفهان نسبت به محیط ½MS گردیده است، به‌طوری‌که ژنوتیپ فرانسه در محیط MS با افزایش ۲۱ درصدی جوانه‌زنی در مقایسه با محیط کشت ½MS، به ۹۳ درصد جوانه‌زنی رسید. ژنوتیپ اصفهان نیز از روند مشابهی پیروی نمود و بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی را در محیط کشت MS با ۹۵ درصد بذور جوانه‌زده داشت. تفاوت میان محیط کشت MS و محیط کشت ½MS در میزان عناصر پرمصرف آن‌ها است. در محیط ½MS، مقادیر عناصر پرمصرف کلسیم کلرید ($CaCl_2$)، مونو پتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، پتاسیم نیترات (KNO_3)، منیزیم سولفات ($MgSO_4$) و آمونیوم نیترات (NH_4NO_3) به نصف تقلیل یافته است. بنابر نتایج به‌دست‌آمده محیط کشت پایه MS بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی بذور هر دو ژنوتیپ مورد مطالعه بود، لذا می‌توان اذعان نمود که عناصر پر مصرف نامبرده نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی جوانه‌زنی بذور مورد مطالعه داشته است. عناصر پر مصرف فوق‌الذکر بخش اعظمی از محلول‌های غذایی هوگلند و اشنایدر (Hoagland and Snyder, 1933)، فرران و مینگو-کاستل (Farran and Mingo-Castel, 2006) و نوولا و همکاران (Novella et al., 2008) را با غلظت‌های متفاوت تشکیل می‌دهد و نتایج مثبت آن در فرآیندهای رشد و نمو گیاهان مختلف گزارش شده است (Kheirizadeh Arough et al., 2016). البته لازم به ذکر است که تاریکی نیز نقش مهمی در جوانه‌زنی بذور رازیانه دارد، به دلیل اینکه مشاهده شد، در نمونه‌هایی که به مدت سه تا پنج روز در شرایط تاریکی مطلق قرار گرفتند، به لحاظ زمانی زودتر از نمونه‌هایی که در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داشتند، جوانه‌زنی را آغاز کردند.



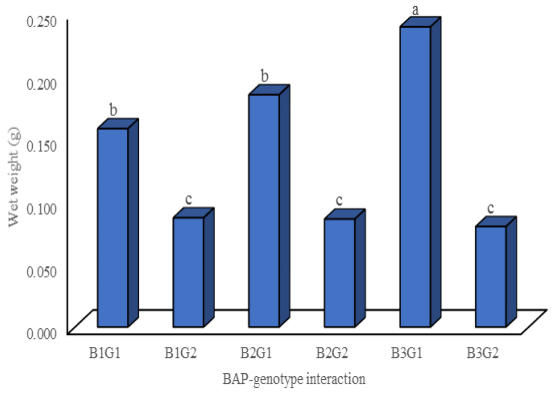
شکل ۱- تأثیر محیط کشت MS و ½MS بر درصد جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های فرانسه و اصفهان

آزمایش کالوس‌زایی

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، غلظت‌های مختلف 2,4-D، نوع ریزنمونه و برهمکنش‌های میان ژنوتیپ- 2,4-D، ژنوتیپ- BAP، ژنوتیپ- ریزنمونه، 2,4-D- ریزنمونه و ژنوتیپ- 2,4-D- ریزنمونه سبب ایجاد تغییرات قابل ملاحظه‌ای در سطح احتمال یک درصد در مقدار وزن تر کالوس شد (جدول ۱). غلظت‌های مختلف BAP تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد به دنبال داشت (جدول ۱). شکل ۲ تأثیر برهمکنش BAP- ژنوتیپ را برای ویژگی وزن تر کالوس نمایش می‌دهد. نتایج مبین اثر بالای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بر کالوس‌زایی ژنوتیپ فرانسه بود، به‌طوری که حداکثر وزن تر کالوس حاصل شد. پایین‌ترین میزان وزن تر به ترتیب مربوط به ژنوتیپ اصفهان در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۱ و صفر میلی‌گرم در لیتر BAP بود. شکل ۳ به بررسی تأثیر برهمکنش سه جانبه ژنوتیپ- 2,4-D- ریزنمونه اختصاص یافت. بر این اساس، ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ اصفهان، در محیط کشت غنی‌شده با یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیش‌ترین وزن تر کالوس را داشت؛ پس از آن نیز، مجدداً بالاترین میزان وزن تر کالوس به ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ اصفهان، اما در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تعلق داشت. ریزنمونه تهیه‌شده از بافت ریشه ژنوتیپ فرانسه در محیط کشت حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر 2,4-D دارای کم‌ترین میزان وزن تر کالوس بود.

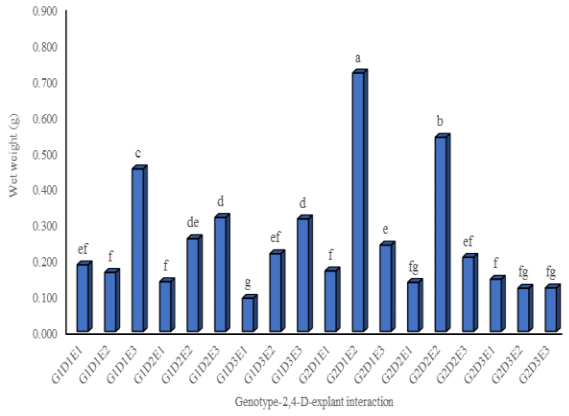
اثرات اصلی ژنوتیپ، 2,4-D، BAP و ریزنمونه و اثرات متقابل دوگانه، سه گانه و چهارگانه عوامل مورد مطالعه، برای ویژگی وزن خشک کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ- 2,4-D- BAP- ریزنمونه نشان داد که ترکیبات تیماری مختلف عوامل تحت مطالعه، اثرات متفاوتی بر میزان وزن خشک کالوس به دنبال داشته‌اند (شکل ۴). بافت ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ اصفهان در

محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بالاترین مقدار وزن خشک کالوس و ریزنمونه ریشه ژنوتیپ فرانسه در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP پایین‌ترین مقدار وزن خشک کالوس را در پی داشت.



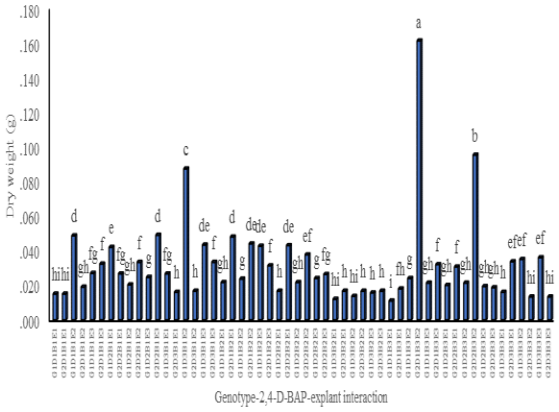
شکل ۲- تأثیر برهمکنش BAP- ژنوتیپ بر میزان وزن تر کالوس

B1: 0 mg.l-1 BAP, B2: 0.1 mg.l-1 BAP, B3: 0.5 mg.l-1 BAP, G1: French genotype, G2: Isfahan genotype



شکل ۳- تأثیر برهمکنش ژنوتیپ- 2,4-D- ریزنمونه بر میزان وزن تر کالوس

G1: French genotype, G2: Isfahan genotype, D1: 1 mg.l-1 2,4-D, D2: 2 mg.l-1 2,4-D, D3: 5 mg.l-1 2,4-D, E1: root explant, E2: hypocotyl explant, E3: cotyledon explant



شکل ۴- تأثیر برهمکنش ژنوتیپ- 2,4-D- BAP- ریزنمونه بر میزان وزن خشک کالوس

G1: French genotype, G2: Isfahan genotype, D1: 1 mg.l^{-1} 2,4-D, D2: 2 mg.l^{-1} 2,4-D, D3: 5 mg.l^{-1} 2,4-D, B1: 0 mg.l^{-1} BAP, B2: 0.1 mg.l^{-1} BAP, B3: 0.5 mg.l^{-1} BAP, E1: root explant, E2: hypocotyl explant, E3: cotyledon explant

تجزیه و تحلیل آماری (جدول ۱)، حاکی از آن بود که تنوع ژنوتیپ، غلظت 2,4-D، نوع بافت ریزنمونه، برهمکنش ژنوتیپ- ریزنمونه، برهمکنش ژنوتیپ- 2,4-D، برهمکنش 2,4-D- ریزنمونه و نیز برهمکنش سه جانبه ژنوتیپ- 2,4-D- ریزنمونه تفاوت معنی‌داری را از دیدگاه اندازه کالوس ایجاد می‌کند. با مقایسه میانگین تیمارهای مختلف ژنوتیپ- 2,4-D- ریزنمونه مشاهده شد که بافت ریزنمونه کوتیلدن حاصل از ژنوتیپ فرانسه، در محیط کشت دارای یک میلی‌گرم 2,4-D، بیش‌ترین میزان اندازه کالوس را سبب شده است و رتبه نخست در بین سایر تیمارها را به خود اختصاص داده است. همچنین تیمار بعدی که از بالاترین اندازه کالوس برخوردار بود و در رتبه دوم قرار داشت نیز مربوط به ریزنمونه بافت کوتیلدون ژنوتیپ فرانسه، اما در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. بافت کوتیلدون ژنوتیپ اصفهان کشت‌شده بر روی محیط کشت دارای پنج میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، رشد کالوس مطلوبی نداشت، لذا کم‌ترین اندازه کالوس را در میان بقیه ترکیبات عوامل تحت مطالعه در پی داشت (شکل ۵).

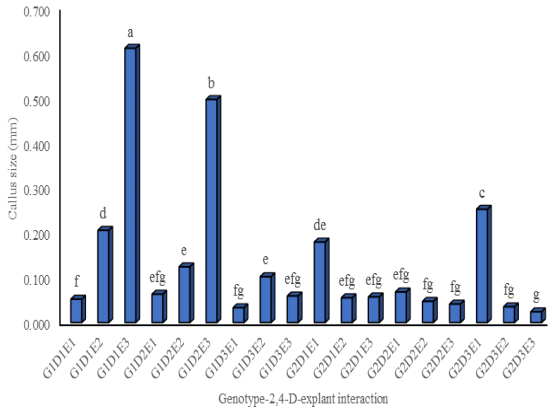
تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد، نوع بافت ریزنمونه و برهمکنش ژنوتیپ- BAP در سطح احتمال یک درصد باعث ایجاد تفاوت‌های قابل توجهی در ویژگی القاء کالوس شدند (جدول ۱). همانطور که در شکل ۶ قابل مشاهده می‌باشد، در بین سه نوع بافت مختلف ریزنمونه، ریزنمونه حاصل از بافت کوتیلدون دارای بالاترین ارزش از نظر ویژگی القاء کالوس بود و ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه به ترتیب در رتبه‌های پس از آن قرار داشتند. نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ژنوتیپ- BAP در شکل ۷ ارائه

شده است. بر اساس این نتایج ژنوتیپ اصفهان در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد BAP از بالاترین مقدار القاء کالوس‌زایی برخوردار بود. کم‌ترین میزان این ویژگی در ژنوتیپ فرانسه قرارگرفته بر روی محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد BAP مشاهده شد.

تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان از روش‌های سریع جهت تولید گیاهان با حداقل مدت‌زمان و صرف نظر از فصل رشد است (Nasib et al., 2008). مزایای دیگر این روش که به توسعه و گسترش استفاده از آن کمک فراوانی نموده است، عبارت از تولید گیاهان سالم و عاری از بیماری، یکنواختی ژنتیکی در گیاهان و صرفه‌جویی در هزینه‌ها می‌باشند (Mahdavian et al., 2010). بافت کالوس در باززایی، تولید متابولیت‌های ثانویه و انتقال ژن به خصوص در گیاهان دارویی حائز اهمیت فراوانی است (Kayser and Quax, 2006; Tripathi and Tripathi, 2003). برای داشتن یک دستورالعمل موفق در ایجاد بافت کالوس، علاوه بر نوع محیط کشت و ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده رشدی موجود در آن، ژنوتیپ گیاه، بافت ریزنمونه، سن ریزنمونه و شرایط محیطی نقش اساسی ایفا می‌نمایند. در این بین تعاملات میان عوامل ذکرشده نیز مؤثر هستند و کالوس‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این موضوع به وضوح در نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشاهده می‌شود؛ به‌خصوص در ویژگی وزن تر کالوس که اثر اصلی ژنوتیپ غیر معنی‌دار بود، اما ژنوتیپ در برهمکنش با BAP و نیز برهمکنش با 2,4-D- ریزنمونه، تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای را بروز داد. ژنوتیپ فرانسه در برهمکنش با تنظیم‌کننده رشد BAP، نسبت به ژنوتیپ اصفهان بازده بهتری داشت و با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده رشد از صفر به ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر روند صعودی در افزایش وزن تر در پیش گرفت. اما ژنوتیپ اصفهان نه تنها از روند افزایشی برخوردار نبود حتی تا حدودی روند نزولی نیز داشت (شکل ۲). برهمکنش ژنوتیپ- BAP در ویژگی القاء کالوس نیز تا حدودی از وضعیت مشابهی پیروی نمود؛ با این تفاوت که در القاء کالوس ژنوتیپ اصفهان حائز ارزش بالاتری بود، لذا می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه ژنوتیپ اصفهان در برهمکنش با BAP از ارزش القاء کالوس بالایی برخوردار بوده است، اما رشد و نمو کالوس‌های ایجادشده نسبت به ژنوتیپ فرانسه کم‌تر بوده و به همین دلیل وزن تر در ژنوتیپ فرانسه بیشتر شد. به‌طور کلی در بافت کوتیلدون حاصل از بذور جوانه‌زده رازیانه، نسبت به بافت‌های ریشه و هیپوکوتیل، کالوس‌زایی مطلوبی القاء گردید (شکل ۸). تأثیر نوع بافت ریزنمونه بر رشد و نمو بافت کالوس با توجه به گونه گیاهی به اثبات رسیده است اما دلیل آن هنوز به درستی مشخص نگردیده است (Magyar-Tábori et al., 2010) و بررسی علت آن از اهداف مطالعه حاضر به دور بوده، اما مشاهده شد در ریزنمونه‌هایی که در هنگام آماده‌سازی، ناحیه زخم بیشتری ایجاد شده است، تولید کالوس بالاتری حادث شده است که این موضوع در مطالعات مختلفی نیز اشاره گردیده است (Magyar-Tábori et al., 2010; NeibaurGallo and Altpeter, 2008). در آمازیشی، از ریزنمونه‌های مختلفی برای کالوس‌زایی استفاده شد و

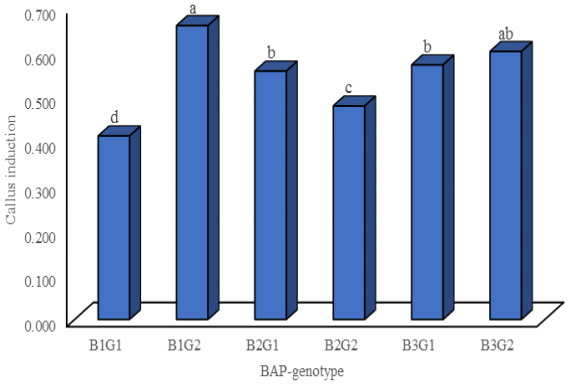
مشاهده گردید که در گونه *Salsola pestifer*، از ریزنمونه ساقه و در گونه *Salsola lanata*، از ریزنمونه برگ، کالوس بهتری تشکیل می‌شود (Stefaniak et al., 2003). نرم یا سخت بودن بافت کالوس، رنگ کالوس و نیز میزان ماده خشک حاصل از آن برای هر ژنوتیپ با توجه به غلظت تنظیم‌کننده رشد به‌کار رفته و نوع ریزنمونه متفاوت بود؛ بافت ریزنمونه هیپوکوتیلی که از ژنوتیپ اصفهان تهیه شده بود، بر روی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین پاسخ از نظر وزن خشک را نشان داد. پس از آن نیز مجدداً ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ اصفهان در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، دارای بالاترین مقدار وزن خشک بود. برهمکنش دو تنظیم‌کننده رشد اکسینی و سیتوکنینی در تولید کالوس نقش مهمی دارد (Ahmed et al., 2002; Karami et al., 2013). البته لازم به ذکر است که مطالعات مختلف نشان داده است، اگر در محیط کشتی اکسین وجود نداشته باشد کالوس تولید نمی‌شود (Hohtola, 1988). این موضوع در خصوص اندازه کالوس صدق نمود و مشاهده شد که ریزنمونه بافت کوتیلدون ژنوتیپ فرانسه به ترتیب در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، دارای بالاترین اندازه کالوس بودند. از طرفی مشاهده شد که در برهمکنش ژنوتیپ با BAP برای ویژگی‌های وزن تر کالوس (شکل ۲) و القاء کالوس (شکل ۷) علی‌رغم عدم وجود تنظیم‌کننده رشد اکسینی، بافت کالوس تولید شد. علت تولید بافت کالوس را می‌توان به تعاملی که اکسین‌های درون‌زای بافت ریزنمونه ژنوتیپ با BAP داشته، نسبت داد که این مؤید تأثیر بسزای هورمون‌های داخلی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیقات تعیین محیط مناسب کالوس‌زایی می‌باشد و باید مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به مشاهدات و نتایج حاصل می‌توان اذعان نمود که برای دست‌یابی به بهترین نتیجه کالوس‌زایی لازم است شرایط محیطی، ترکیبات محیط کشت و نوع بافت ریزنمونه مورد استفاده برای هر ژنوتیپ بهینه‌سازی شود؛ زیرا ژنوتیپ یک عامل بسیار مهم و تأثیرگذار در موفقیت کشت بافت محسوب می‌شود، به‌طوری که پاسخ ریزنمونه‌های مختلف در شرایط کشت بافت بسته به ژنوتیپ گیاه می‌تواند متفاوت باشد.



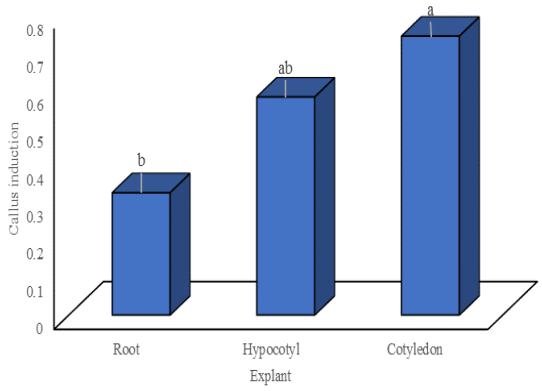
شکل ۵- تأثیر برهمکنش ژنوتیپ- 2,4-D- ریزنمونه بر اندازه کالوس

G1: French genotype, G2: Isfahan genotype, D1: 1 mg.l-1 2,4-D, D2: 2 mg.l-1 2,4-D, D3: 5 mg.l-1 2,4-D, E1: root explant, E2: hypocotyl explant, E3: cotyledon explant



شکل ۷- تأثیر برهمکنش بنزیل BAP- ژنوتیپ بر القاء کالوس

B1: 0 mg.l-1 BAP, B2: 0.1 mg.l-1 BAP, B3: 0.5 mg.l-1 BAP, G1: French genotype, G2: Isfahan genotype

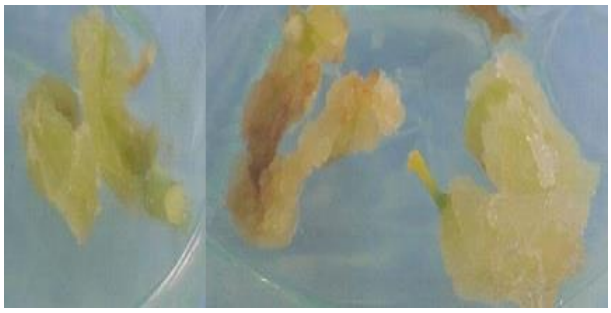


شکل ۶- تأثر نوع ریزنمونه بر القاء کالوس

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌ها رشد و ریزنمونه بر صفات مورد بررسی

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	اندازه کالوس	القاء کالوس
ژنوتیپ	۱	۰/۰۳۳^{ns}	۰/۰۰۲**	۰/۴۸۷**	۰/۲۳۰*
توفوردی	۲	۰/۳۲۶**	۰/۰۰۱**	۰/۱۶۰*	۰/۰۳۹^{ns}
بنزیل آمینو پورین	۲	۰/۰۴۷*	۰/۰۰۱**	۰/۰۱۹^{ns}	۰/۰۶۴^{ns}
ریز نمونه	۲	۰/۵۱۷**	۰/۰۰۴**	۰/۲۳۲**	۲/۳۸۴**
ژنوتیپ× توفوردی	۲	۰/۱۲۶**	۰/۰۰۴**	۰/۲۲۴**	۰/۰۷۰^{ns}
ژنوتیپ× بنزیل آمینو پورین	۲	۰/۰۶۷**	۰/۰۰۴**	۰/۰۲۶^{ns}	۰/۴۳۹**
ژنوتیپ×ریزنمونه	۲	۰/۵۹۵**	۰/۰۰۱**	۰/۷۲۸**	۰/۰۲۳^{ns}
توفوردی× بنزیل آمینو پورین	۴	۰/۰۲۱^{ns}	۰/۰۰۱**	۰/۰۱۰^{ns}	۰/۰۲۴^{ns}
توفوردی×ریزنمونه	۴	۰/۰۷۹**	۰/۰۰۱**	۰/۱۵۴**	۰/۰۴۵^{ns}
بنزیل آمینو پورین× ریزنمونه	۴	۰/۰۲۸^{ns}	۰/۰۰۲**	۰/۰۳۱^{ns}	۰/۰۳۲^{ns}
ژنوتیپ× توفوردی× بنزیل آمینو پورین	۴	۰/۰۲۲^{ns}	۰/۰۰۱**	۰/۰۱۶^{ns}	۰/۰۹۰^{ns}
ژنوتیپ× توفوردی× ریزنمونه	۴	۰/۱۸۸**	۰/۰۰۲**	۰/۰۸۸**	۰/۰۲۰^{ns}
ژنوتیپ× بنزیل آمینو پورین × ریزنمونه	۴	۰/۰۱۰^{ns}	۰/۰۰۳**	۰/۰۴۱^{ns}	۰/۰۶۷^{ns}
توفوردی× بنزیل آمینو پورین × ریزنمونه	۸	۰/۰۲۳^{ns}	۰/۰۰۱**	۰/۰۳۰^{ns}	۰/۰۴۲^{ns}
ژنوتیپ× توفوردی× بنزیل آمینو پورین× ریزنمونه	۸	۰/۰۲۰^{ns}	۰/۰۰۱**	۰/۰۳۰^{ns}	۰/۰۱۸^{ns}
خطا	۱۰۸	۰/۰۱۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۵	۰/۰۴۸
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۵۷	۳/۲۲	۸/۶۳	۳/۰۹

*، ** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار.



شکل ۸- بافت کالوس حاصل از ریزنمونه کوتیلدون

منابع

bd Elaleem, K.G., Ahmed, M.M. and Noor, M.K.M. (2015). 'Effect of Explants and plant growth regulators on callus induction in Ricinus communis L'. Research Journal of Pharmaceutical Sciences, 24, 1-17.

AbouZid, S. (2014). 'Yield improvement strategies for the production of secondary metabolites in plant tissue culture: silymarin from Silybum marianum tissue culture'. Natural product research, 28, 2102-2110.

Ahmed, E.E., Bisztray, G.D. and Velich, I. (2002). 'Plant regeneration from seedling explants of common bean: *Phaseolus vulgaris* L'. Acta Biologica Szegediensis, 46, 27-28.

Alexandrovich, I., Rakovitskaya, O., Kolmo, E., Sidorova, T. and Shushunov, S. (2003). 'The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized, placebo-controlled study'. Alternative therapies in health and medicine, 9, 58.-71.

Bagheri, A., Moshiri, F. and Khosravinia, S. (2013). 'Investigation on reaction of explants and plant growth regulators on callus induction, rooting and in vitro regeneration of Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch'. Crop Biotechnology, 3, 53-61.

Ciura, J., Szeliga, M. and Tyrka, M. (2015). 'Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek'. Journal of Medicinal Plants Studies, 3, 22-25.

Copland, L.O. and McDonald, M.B. (1995). Principles of Seed Science and Technoloy. Champan and Hall, New York, 189 pp.

Emad, M., Gheibi, F., Rasouli, S.M., Khanjanzadeh, R. and Mohammadi-Jozani, S. (2012). *Foeniculum vulgare*. Pouneh, Tehran, Iran, 143 pp.

Farran, I. and Mingo-Castel, A.M. (2006). 'Potato minituber production using aeroponics: effect of plant density and harvesting intervals'. American Journal of Potato Research, 83, 47-53.

Farsi, M. and Zolala, J. (2003). Introduction to Plant Biotechnology. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, 185 pp.

Gharehmatrossian, S., Popov, Y., Ghorbanli, M. and Safaeian, S. (2014). 'In vitro culture of Artemisia aucheri boiss on four different tissue culture media for comparative cytotoxic effect sand growth'. Asian J Pharm Clin Res, 7, 27-31.

Ghasemi-Dehkordi, N. (2002). Iranian herbal pharmacopoeia. Ministry of Health and Medical Education, Tehran, 145 pp.

regeneration and transformation method for the new potential oilseed crop Lepidium campestre'. BMC plant biology, 13, 1-15.

Karami, M., Bagherieh, N.M.B. and AghdasiI, M. (2013). 'Optimization of conditions suitable for bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regeneration', 5, 1-14.

Kayser, O.and Quax, W. (2006). Medicinal plant biotechnology. Wiley-VCH, 163 pp.

Khawar, K., Sarhin, E., Sevimay, C., Cocu, S., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Ipek, A., Kaya, M., Sancak, C. and Ozcan, S. (2005). 'Adventitious shoot regeneration and micropropagation of Plantago lanceolata L.'

Kheirizadeh Arough, Y., Barmaki, M. and Hashemimajd, K. (2016). Effect of three nutrient solutions on quantitative and qualitative traits of plants and minitubers of two potato cultivars in hydroponic system. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 7, 125-38.

Kishore, R.N., Anjaneyulu, N., Ganesh, M.N. and Sravya, N. (2012). Evaluation of anxiolytic activity of ethanolic extract of Foeniculum vulgare in mice model. Int J Pharm Pharm Sci, 4, 584-86.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z. and Zeng, X. (2010). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. Carbohydrate Polymers, 79, 206-13.

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, 251-67.

Mahdavian, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a

Golkar, P., Hadian, F. and Koohi Dehkordi, M. (2019). 'Production of a new mucilage compound in Lepidium sativum callus by optimizing in vitro growth conditions'. Natural product research, 33, 130-35.

Gross, M., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Bar, E., Dudai, N., Cohen, Y. and Friedman, J. (2009). 'The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. vulgare, Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant'. Biochemical Systematics and Ecology, 37, 308-16.

Guang-shou, T., Man-ling, L., Feng-feng, M., Yan, H., Peng, Y., SH., L. and Chang, M. (2011). 'Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Volatile Oil Extracted from *Foeniculum vulgare* Mill. Seeds [J]'. Progress in Modern Biomedicine, 2, 044.

Gulfraz, M., Mehmood, S., Minhas, N., Jabeen, N., Kausar, R., Jabeen, K. and Arshad, G. (2008). Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare'*. African Journal of Biotechnology, 7, 24-38.

Haze, S., Sakai, K. and Gozu, Y. (2002). Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults'. Japanese journal of pharmacology, 90, 247-53.

Hoagland, D. and Snyder, W. (1933). Nutrition of strawberry plant under controlled conditions:(a) effects of deficiencies of boron and certain other elements:(b) susceptibility to injury from sodium salts." In Proc. Amer Soc . hort. Sci, 288941.

Hohtola, A. (1988). 'Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine'. Plant cell, tissue and organ culture, 15, 211-22.

Ivarson, E., Ahlman, A., Li, X. and Zhu, L.-H. (2013). 'Development of an efficient

placebo-controlled study'. Alternative therapies in health and medicine, 9, 58.-71.

Bagheri, A., Moshiri, F. and Khosravinia, S. (2013). 'Investigation on reaction of explants and plant growth regulators on callus induction, rooting and in vitro regeneration of Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch'. Crop Biotechnology, 3, 53-61.

Ciura, J., Szeliga, M. and Tyrka, M. (2015). 'Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek'. Journal of Medicinal Plants Studies, 3, 22-25.

Copland, L.O. and McDonald, M.B. (1995). Principles of Seed Science and Technoloy. Champan and Hall, New York, 189 pp.

Emad, M., Gheibi, F., Rasouli, S.M., Khanjanzadeh, R. and Mohammadi-Jozani, S. (2012). *Foeniculum vulgare*. Pouneh, Tehran, Iran, 143 pp.

Farran, I. and Mingo-Castel, A.M. (2006). 'Potato minituber production using aeroponics: effect of plant density and harvesting intervals'. American Journal of Potato Research, 83, 47-53.

Farsi, M. and Zolala, J. (2003). Introduction to Plant Biotechnology. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, 185 pp.

Gharehmatrossian, S., Popov, Y., Ghorbanli, M. and Safaeian, S. (2014). 'In vitro culture of Artemisia aucheri boiss on four different tissue culture media for comparative cytotoxic effect sand growth'. Asian J Pharm Clin Res, 7, 27-31.

Ghasemi-Dehkordi, N. (2002). Iranian herbal pharmacopoeia. Ministry of Health and Medical Education, Tehran, 145 pp.

Golkar, P., Hadian, F. and Koohi Dehkordi, M. (2019). 'Production of a new mucilage compound in Lepidium sativum callus by optimizing in vitro growth conditions'. Natural product research, 33, 130-35.

vegetative Mahlab rootstock (SL-64). Seed and Plant Improvement Journal, 26, 15-26.

Malabadi, R.B., Chalannavar, R.K., Meti, N.T., Mulgund, G.S., Nataraja, K. and Kumar, S.V. (2012). Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus cultures and in vitro derived plants of Catharanthus roseus. Research in Pharmacy, 15, 14-29.

Mansour, S.A., Heikal, T.M., Refaie, A.A. and Mossa, A. (2011). Antihepatotoxic activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil against chlorpyrifos-induced liver injury in rats. Glob J Environ Sci Technol, 1, 47-59.

Masoumiasl, A., Aryiaeineghad, A. and Dehdeari, M. (2015). Assessment of Direct Regeneration in Germany (*Matricaria chamomilla* L.) and Shirazi Chamomiles (*Matricaria recutita* L.). Journal of horticulture science, 29, 601-09.

Milena Nikolova, M. and Evstatieva, L. (2011). Th uan Duy Nguyen TD. Screening of plant extracts for antioxidant properties. Botan Serb, 35, 43-48.

Abd Elaleem, K.G., Ahmed, M.M. and Noor, M.K.M. (2015). 'Effect of Explants and plant growth regulators on callus induction in Ricinus communis L'. Research Journal of Pharmaceutical Sciences, 24, 1-17.

AbouZid, S. (2014). 'Yield improvement strategies for the production of secondary metabolites in plant tissue culture: silymarin from Silybum marianum tissue culture'. Natural product research, 28, 2102-2110.

Ahmed, E.E., Bisztray, G.D. and Velich, I. (2002). 'Plant regeneration from seedling explants of common bean: *Phaseolus vulgaris* L'. Acta Biologica Szegediensis, 46, 27-28.

Alexandrovich, I., Rakovitskaya, O., Kolmo, E., Sidorova, T. and Shushunov, S. (2003). 'The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized,

for bean (*Phaseolus vulgaris* L.) regeneration', 5, 1-14.

Kayser, O.and Quax, W. (2006). Medicinal plant biotechnology. Wiley-VCH, 163 pp.

Khawar, K., Sarhin, E., Sevimay, C., Cocu, S., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Ipek, A., Kaya, M., Sancak, C. and Ozcan, S. (2005). 'Adventitious shoot regeneration and micropropagation of Plantago lanceolata L.'

Kheirizadeh Arough, Y., Barmaki, M. and Hashemimajd, K. (2016). Effect of three nutrient solutions on quantitative and qualitative traits of plants and minitubers of two potato cultivars in hydroponic system. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 7, 125-38.

Kishore, R.N., Anjaneyulu, N., Ganesh, M.N. and Sravya, N. (2012). Evaluation of anxiolytic activity of ethanolic extract of Foeniculum vulgare in mice model. Int J Pharm Pharm Sci, 4, 584-86.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z. and Zeng, X. (2010). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium Paenibacillus polymyxa EJS-3. Carbohydrate Polymers, 79, 206-13.

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, 251-67.

Mahdavian, M., Bouzari, N. and Abdollahi, H. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative Mahlab rootstock (SL-64). Seed and Plant Improvement Journal, 26, 15-26.

Malabadi, R.B., Chalannavar, R.K., Meti, N.T., Mulgund, G.S., Nataraja, K. and Kumar, S.V.

Gross, M., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Bar, E., Dudai, N., Cohen, Y. and Friedman, J. (2009). 'The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. vulgare, Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant'. Biochemical Systematics and Ecology, 37, 308-16.

Guang-shou, T., Man-ling, L., Feng-feng, M., Yan, H., Peng, Y., SH., L. and Chang, M. (2011). 'Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Volatile Oil Extracted from *Foeniculum vulgare* Mill. Seeds [J]'. Progress in Modern Biomedicine, 2, 044.

Gulfraz, M., Mehmood, S., Minhas, N., Jabeen, N., Kausar, R., Jabeen, K. and Arshad, G. (2008). Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare'*. African Journal of Biotechnology, 7, 24-38.

Haze, S., Sakai, K. and Gozu, Y. (2002). Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults'. Japanese journal of pharmacology, 90, 247-53.

Hoagland, D. and Snyder, W. (1933). Nutrition of strawberry plant under controlled conditions:(a) effects of deficiencies of boron and certain other elements:(b) susceptibility to injury from sodium salts." In Proc. Amer Soc . hort. Sci, 288941.

Hohtola, A. (1988). 'Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine'. Plant cell, tissue and organ culture, 15, 211-22.

Ivarson, E., Ahlman, A., Li, X. and Zhu, L.-H. (2013). 'Development of an efficient regeneration and transformation method for the new potential oilseed crop Lepidium campestre'. BMC plant biology, 13, 1-15.

Karami, M., Bagherieh, N.M.B. and AghdasiI, M. (2013). 'Optimization of conditions suitable

Omidbeygi, R. (2009). Product and processing of medicinal plants. Astane Ghodse Razavi Press, Tehran, 164 pp.

Özbek, H. (2005). The Anti-inflammatory Activity of the Foeniculum vulgare L. Essential Oil and Investigation. International Journal of Pharmacology, 50, 329-31.

Riva, A. (2000). Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine-S. Mills, K. Bone. Churchill Livingstone, 448 pp.

Sajomsang, W., Gonil, P. and Tantayanon, S. (2009). Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: Preparation and characterization. International journal of biological macromolecules, 44, 419-427.

Saremirad, A. and Mohammadi, A. (2020). Optimization of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) propagation in in vitro conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 36, 509-522.

Singh, B. and Kale, R. (2008). Chemomodulatory action of *Foeniculum vulgare* (Fennel) on skin and forestomach papillomagenesis, enzymes associated with xenobiotic metabolism and antioxidant status in murine model system. Food and chemical toxicology, 46, 3842-3450.

Stefaniak, B., Woźny, A. and Li ,V. (2003). Plant micropropagation and callus induction of some annual Salsola species. Biologia plantarum, 46, 305-308.

Tanira, M., Shah, A., Mohsin, A., Ageel, A. and Qureshi, S. (1996). Pharmacological and toxicological investigations on Foeniculum vulgare dried fruit extract in experimental animals. Phytotherapy Research, 10, 33-36.

Tripathi, L. and Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2, 243-253.

(2012). Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus cultures and in vitro derived plants of Catharanthus roseus. Research in Pharmacy, 15, 14-29.

Mansour, S.A., Heikal, T.M., Refaie, A.A. and Mossa, A. (2011). Antihepatotoxic activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) essential oil against chlorpyrifos-induced liver injury in rats. Glob J Environ Sci Technol, 1, 47-59.

Masoumiasl, A., Aryiaeineghad, A. and Dehdeari, M. (2015). Assessment of Direct Regeneration in Germany (*Matricaria chamomilla* L.) and Shirazi Chamomiles (*Matricaria recutita* L.). Journal of horticulture science, 29, 601-09.

Milena Nikolova, M. and Evstatieva, L. (2011). Th uan Duy Nguyen TD. Screening of plant extracts for antioxidant properties. Botan Serb, 35, 43-48.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15, 473-97.

Nasib, A., Ali, K. and Khan, S. (2008). An optimized and improved method for the in vitro propagation of kiwifruit) *Actinidia deliciosa*) using coconut water. Pak. J. Bot, 40, 2355-60.

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, 480-497.

Novella, M.B., Andriolo, J.L., Bisognin, D.A., Cogo, C.M. and Bandinelli, M.G. (2008). Concentration of nutrient solution in the hydroponic production of potato minitubers. Ciência Rural, 38, 1529-1533.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 6, No 2, Autumn & Winter 2021

Optimization callus induction in fennel (*Foeniculum vulgare* M.)

Ali Saremirad[1]*, Roya Azarkish[2] , Samira Abbasi[3]

Abstract

Fewer side effects of medicinal plants compared to chemical drugs have caused them to receive increasing attention. Fennel is one of the most important and valuable medicinal plants due to its numerous healing properties and the presence of several valuable medicinal active substances. Due to the medicinal importance of this plant and the possibility of producing its metabolites in vitro, it is necessary to study the factors affecting the production of these metabolites; In addition, an efficient protocol for indirect regeneration and gene transfer can be provided. For this purpose, a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications was conducted in 2018. Factors included genotype (French and Isfahan), MS medium enriched with 2,4-D (1, 2 and 5 $mg.l^{-1}$) and BAP (0, 0.1 and 0.5 $mg.l^{-1}$) plant growth regulators as well as tissue Explants (root, hypocotyl and cotyledon). According to the results, the hypocotyl explant of Isfahan genotype had the highest callus fresh weight in culture medium containing 1 $mg.l^{-1}$ 2,4-D. The French genotype had a higher fresh weight in culture medium containing 0.5 $mg.l^{-1}$ BAP. The highest callus dry weight was obtained in hypocotyl explants of French genotype with rich culture medium with 1 $mg.l^{-1}$ 2,4-D and 0.5 $mg.l^{-1}$ BAP. Regarding callus size characteristics, the cotyledon explant in culture medium enriched with 1 $mg.l^{-1}$ 2,4-D had the best reaction. The cotyledon explant had the best callus induction in all treatment's compounds.

Keywords: Fennel, Growth regulator, Cotyledon and Hypocotyl.

[1] Department of Agronomy and Plant Breeding, Young Researchers and Elite Club, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. * Correspond author. Email: asaremirad@gmail.com
[2] Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahed University, Tehran, Iran.