



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Plant Biological Sciences

E-ISSN: 3041-9603

Vol. 15, Issue, No. 2, Summer 2023

Document Type: Research Paper

Received: 17/03/2024

Accepted: 8/07/2024

The effect of different types and concentrations of plant growth regulators on the amount of callus tissue production by fennel (*Foeniculum vulgare*) explants *in vitro*

Bourang Shima¹, Jaahanbakhsh-Godekahriz Sodابه^{1*}, Asghari-Zakaria Rasool¹, Parsa-Khankandi Hamed², Noruzpour Mehran¹ 

¹ Department of Plant Genetics and Production Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ardabil, Iran.

Abstract

The fennel plant (*Foeniculum vulgare* L.) is a member of the Apiaceae umbrella family. In this research, the effect of different plant growth regulators on the production of callus tissue from fennel explants was investigated and then the effect of selected plant growth regulators on the biochemical compounds and secondary metabolites of the resulting callus tissue was evaluated. The desired explants after transfer to the laboratory and surface disinfection on the MS base culture medium containing Kin and BAP in concentrations (zero, 0.1, and 0.5 mg/L) and 2,4-D, NAA, and IBA (at concentrations of zero, 0.5, 1, 2 and 4 mg/L) were cultivated. According to the results, the use of Kin instead of BAP (in lower concentrations) and NAA (in higher concentrations) increased the percentage of callus production. According to the results, the highest percentage of callus production (100%) is related to the culture medium containing Kin (in concentrations of 0.1 or 0.5 mg/L) along with NAA (in concentrations of 1, 2, or 4 mg/L). In this research, it was found that the use of auxin and cytokinin (in combination with each other) increased the induction and production of callus tissue. Also, in terms of the activity level of peroxidase and catalase enzymes, and accumulation of amino acid proline, flavonoid, and anthocyanin, a significant difference was observed between different plant growth regulators. So the highest peroxidase and catalase enzyme activities and proline amino acid accumulation are related to MS+1_(mg/L)IBA +0.5_(mg/L)BAP culture medium. Also, the highest amount of flavonoid was related to MS+2_(mg/L)NAA+0.5_(mg/L)BAP culture medium. The highest amount of anthocyanin was related to MS+2_(mg/L)2,4-D+0.5_(mg/L)BAP culture medium.

Keywords: BAP, Callus production, Fennel, *Foeniculum vulgare*, Kin and NAA

Introduction

Fennel (*Foeniculum vulgare* L.) is a member of the Apiaceae family, which is known for having significant contents of phytochemicals, including flavonoids, coumarins, quinones, phenolic and alkaloid compounds. Plant tissue culture is the *in vitro* culture of cells, tissues, organs, or the whole plant under sterile conditions on a nutrient culture medium of known composition, which

*Corresponding author: jahanbakhsh@uma.ac.ir

3041-9603 © University of Isfahan

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



DOI: 10.22108/IJPB.2024.141006.1359

is often used to produce plant clones. The resulting clones are genetically uniform and very similar to the mother plant. Callus culture is the most common type of culture in plant tissue culture. Callus is a growing mass of undifferentiated and unorganized cells, which are formed because of a wound on the surface of the plant. Callus tissue can be obtained from all the organs of a whole plant such as meristem, stem tip, lateral buds, leaf, etc. Several factors including genetic structure, type of culture medium, environmental factors (light, pH, and temperature), and plant growth regulators are effective on tissue culture and micropropagation of plants. Plant growth regulators, which are used in very low concentrations, are effective in the distribution of substances inside the plant, cell division, and cell growth. Plant growth regulators, especially auxins and cytokinins, play a very important role in controlling the growth and development of cells both in the whole plant and in explants cultured *in vitro*.

Material and Methods

In this research, first, the optimal conditions to produce callus from explants obtained from fennel shoots were investigated, and then the biochemical compositions of the resulting callus were measured. To produce callus tissue, explants from *F. vulgare* shoots were prepared from the medicinal plant research center of Ardabil University of Medical Sciences. The samples were first examined phenotypically and after selecting fresh samples without obvious contamination, they were washed with a dishwashing solution for 30 minutes and then rinsed under running water for one hour. The explants were then immersed in H₂O₂ solution (5%) for 10 minutes and after rinsing twice with sterile water (autoclaved twice) for 10 minutes, they were disinfected in 2.5% sodium hypochlorite. At the end, sterilized explants on MS culture medium containing different plant growth regulators Kin or BAP (zero, 0.1 and 0.5 mg/L) alone or in combination with 2,4-D or NAA or IBA (each in concentrations of zero, 0.5, 1, 2 and 4 mg/L) were cultivated and the percentage of callus production, root and shoot and the biochemical composition of the resulting callus samples (peroxidase and catalase activity levels), the amount of amino acid accumulation of proline, total flavonoid and anthocyanin) were recorded after 3-4 weeks. This research was conducted as a completely randomized design experiment with three replications, and the data analysis was done using SPSS ver. 26.

Results and Discussion

According to the results obtained in this research, it was found that the percentage of callus production from explants obtained from fennel plant shoots, roots, and aerial parts obtained from callus, as well as the weight of the collected callus, had a significant difference between most of the plant growth regulators treatments and the control treatment. According to the results obtained in this research, it was found that the highest percentage of callus production (100%) was related to the culture medium containing Kin (concentrations of 0.1 or 0.5 mg/L) along with NAA (concentrations of 1, 2, or 4 mg/L). According to the results of the study, the use of auxin and cytokinin (in combination with each other) increased the induction and production of callus. In terms of the percentage of root production from callus samples, the best (100%) was related to MS+ 2,4-D (2 mg/L) + BAP (0.1 mg/L) culture medium. Also, MS culture medium containing 1mg/L of 2,4-D along with 0.5 mg/liter of BAP had the highest percentage of shoot production from callus samples of the fennel plant (55.53%). On the other hand, a significant difference was observed in the activities of peroxidase and catalase enzymes, amino acid proline, flavonoid, and anthocyanin accumulation between different plant growth regulators. The highest level of peroxidase, catalase, and amino acid proline was related to MS + IBA (1mg/L) + BAP (0.5mg/L) culture medium.

Conclusion

According to the results, the use of plant growth regulators had a positive and significant effect on the amount of callus production, root, and shoot production, as well as the biochemical characteristics of the fennel plant. In this research, it was found that the use of Kin and NAA causes the maximum increase in callus production from fennel explants. To increase the antioxidant and anticancer properties of callus samples, it is very important to increase the amount of flavonoids and anthocyanins in the callus, and in the current study, the highest amount of biochemical compounds, especially the amount of flavonoids and anthocyanins in the *in vitro* culture of the fennel plant, was associated with an increase in the concentration of auxin and cytokinin.

تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان تولید کالوس گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون- شیشه‌ای

شیمیا بورنگ^۱، سدابه جهانبخش گده کهریز*^۲، رسول اصغری ذکریا^۳، حامد پارسا خانکندی^۴ و مهران نوروزپور^۱
^{۱،۲،۳} گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
^۴ گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران.

چکیده

گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) عضوی از خانواده *Apiaceae* است که به علت داشتن ترکیبات شیمیایی و دارویی شناخته می‌شود. در این پژوهش ابتدا شرایط بهینه جهت تولید کالوس از ریزنمونه‌های حاصل از شاخساره گیاه رازیانه مورد بررسی قرار گرفته و سپس ترکیبات بیوشیمیایی کالوس‌های حاصل اندازه‌گیری شد. جهت تولید کالوس ریزنمونه‌های حاصل از شاخساره گیاه رازیانه روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف Kin یا BAP (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) به تنهایی و یا در ترکیب با 2,4-D یا NAA یا IBA (هر یک در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) کشت شدند و درصد تولید کالوس، ریشه و اندام هوایی و ترکیبات بیوشیمیایی نمونه کالوس‌های حاصل (میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، میزان تجمع اسید آمینه پرولین، فلاونوئید کل و آنتوسیانین) پس از ۳ الی ۴ هفته ثبت شدند. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش مشخص شد که بیشترین درصد تولید کالوس (۱۰۰ درصد) مربوط به محیط کشت حاوی Kin (غلظت‌های ۰/۱ یا ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) در کنار NAA (غلظت‌های ۱ یا ۲ یا ۴ میلی گرم بر لیتر) بود. از نظر درصد تولید ریشه از کالوس نیز بهترین (۱۰۰ درصد) مربوط به محیط کشت MS+ 2,4-D (2mg/L)+ BAP (0.1mg/L) بود. از سوی دیگر مشخص شد بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز و اسید آمینه پرولین مربوط به محیط کشت BAP (0.5mg/L)+ IBA (1mg/L)+ MS است. همچنین بیشترین مقدار فلاونوئید در محیط کشت BAP (0.5mg/L)+ NAA (2mg/L)+ MS مشاهده شد. طبق نتایج حاصل، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تأثیر مثبت و معنی‌داری بر مقدار تولید کالوس، تولید ریشه و اندام هوایی و نیز ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه رازیانه داشت. در پژوهش حاضر، بیشترین میزان ترکیبات بیوشیمیایی به ویژه میزان فلاونوئید کل و محتوای آنتوسیانینی در کشت درون شیشه‌ای گیاه رازیانه با افزایش غلظت اکسین و سیتوکنین همراه بود.

واژه‌های کلیدی: تولید کالوس، رازیانه، BAP، *Foeniculum vulgare*، NAA و Kin

*Corresponding author: jahanbakhsh@uma.ac.ir



مقدمه

گیاه رازیانه با نام علمی (*Foeniculum L.*) *vulgare*) متعلق به خانواده چتریان *Apiaceae* است. این گیاه با خواص دارویی و درمانی با ارزش در حالت وحشی، به صورت گیاهی چند ساله بوده ولی نوع اهلی آن، گیاهی دو ساله است (Noshad & Falah, 2020). از نظر پلوییدی این گیاه دیپلوئید ($2n=2x=22$) و علفی است و از دیرباز در طب سنتی ایرانی و بین‌الملل جهت درمان بیماری‌های گوارشی، بیماری‌های مربوط به زنان، بیماری‌های تنفسی، آب مروارید، برونشیت، استفراغ، دفع سنگ کلیه، اسهال و سرفه‌های مزمن و نیز جلوگیری از اختلالات سوء هاضمه در نوزادان شیرخوار مورد توجه بوده است (Khan et al., 2022). خاستگاه اصلی این گیاه مدیترانه و اروپای مرکزی است. امروزه کشت این گیاه در تمامی نقاط مورد توجه قرار گرفته است، اما بیشترین سطح زیر کشت مربوط به کشورهای حاشیه دریای مدیترانه است که جهت کشت تجاری از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (Mehra et al., 2021). مواد معدنی و ویتامین‌های موجود در اندام‌های مختلف رازیانه شامل کلسیم، پتاسیم، سدیم، آهن، فسفر، تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و ویتامین C هستند (Khan et al., 2022). ریشه، برگ، ساقه و دانه گیاه رازیانه دارای ترکیبات موثره مفید و دارویی هستند که متناسب با نیاز و درمان هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما به طور کلی دانه و ساقه این گیاه از ارزش دارویی بالایی برخوردار است (Saremirad et al., 2021). (Mehra, et al (2021) در پژوهشی، با بررسی‌های خود بر روی دانه گیاه رازیانه بیان کردند دانه این گیاه دارای ترکیبات

بیوشیمیایی نظیر تانن، فنچون، فلائدرن، لیمونن، دپنتن، استراگول، متیل اوراتر، کامفن، مواد پروتئینی- قندی و روغنی هستند. همچنین بیان کردند روغن‌های استخراج شده از دانه این گیاه از اسیدهای چربی مانند اسید پالمیتیک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید پتروسلینیک تشکیل شده است. فنل کل موجود در این گیاه جزء ترکیبات متابولیتی با ارزش آن محسوب می‌شود. از جمله ترکیبات فنلی استخراج شده از دانه این گیاه می‌توان به اسید نوکلروزنیک، اسید کلروزنیک، اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید کوماریک، اسید فلوریک، اسید سینامیک، کوئرستین، هسپریدین، اسید رزماریک، آنتول و آپیزین اشاره نمود (Mehra et al., 2021). همچنین برگ‌ها و ساقه‌های این گیاه حاوی ترکیباتی ضد میکروبی و ضد سرطانی نظیر روتین، کمپفرول، کوئرستین، فلاونوئید فینکولارین، آرابینوزید و نلومبوزید است (Nikolova et al., 2011). از سوی دیگر، طبق بررسی‌های انجام شده ریشه، این گیاه حاوی خانواده بزرگی از کومارین‌ها و آپپول است (Rasheed et al., 2021). کشت بافت گیاهی، کشت در شرایط *in vitro* سلول‌ها، بافت‌ها، اندام‌ها یا کل گیاه تحت شرایط کنترل‌شده تغذیه‌ای و محیطی است که اغلب برای تولید کلون‌های گیاهی استفاده می‌شود. کلون‌های حاصل از نظر ژنتیکی کاملاً یکنواخت بوده و بسیار شبیه به پایه مادری است. امروزه از روش کشت بافت و اندام گیاهی جهت تکثیر، افزایش تولید ترکیبات موثره گیاهی، حفاظت از ژرم پلاسما گیاهی، انتقال سریع گونه‌ای و غیره استفاده می‌شود (Noruzpuor et al., 2022). تکنیک کشت بافت گیاهی بر اساس مفهوم

Totipotency سلول‌ها (قابلیت و ظرفیت تبدیل شدن هر سلول به یک موجود کامل) شکل گرفته است (Magyar-Tábori et al., 2010). کشت کالوس معمول‌ترین نوع کشت در کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود. کالوس بافتی متشکل از سلول‌های تمایز نیافته و غیرسازمان‌یافته است که در اثر بروز زخم در سطح گیاه حاصل می‌شود. بافت کالوس را می‌توان در محیط کشت از تمام اندام-های یک گیاه کامل مانند مریستم، نوک ساقه، جوانه‌های جانبی، برگ، دم برگ، بساک، تخمدان، تخمک، جنین و غیره به دست آورد (Han et al., 2011). از تکنیک تولید کالوس برای ایجاد تنوع ژنتیکی در بین جمعیت، افزایش تولید متابولیت‌های گیاه پایه، تولید متابولیت‌های جدید، باززایی و تولید گیاهان عاری از بیماری و غیره استفاده می‌شود (Noruzpour et al., 2019). در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های کشت سلول و بافت گیاهی به روشی مؤثر جهت تکثیر گونه‌های گیاهی در خطر انقراض تبدیل شده است. کشت بافت و سلول گیاهی روشی آسان و به نسبت ارزان قیمت محسوب می‌شود.

عوامل متعددی از جمله ساختار ژنتیکی، نوع محیط کشت، عوامل محیطی (نور، pH، دما و غیره) و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کشت بافت و ریز ازدیادی گیاهان مؤثر است (Noruzpour et al., 2022). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی که در غلظت-های بسیار کم به کار گرفته می‌شوند، روی توزیع مواد داخل گیاه، تقسیم سلولی، رشد سلولی و غیره موثرند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، به ویژه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها، در کنترل رشد و نمو

سلول‌ها هم در گیاه کامل و هم در ریزنمونه‌های کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای نقش بسیار مهمی دارند. از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی متداول جهت تولید کالوس در شرایط درون‌شیشه-ای می‌توان به NAA، 2,4-D، IAA، IBA (به عنوان اکسین) و BAP، زآتین، Kin، TDZ و BA (به عنوان سیتوکینین) اشاره نمود. نوع و مقدار اکسین یا سیتوکینین و یا نسبت اکسین به سیتوکینین و بالعکس در شرایط درون شیشه‌ای بر تشکیل اندام‌های گیاهی، بافت کالوس، تولید متابولیت‌های ثانویه و غیره مؤثر است. به طور کلی افزودن اکسین‌ها به درون محیط کشت به عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاهی برخلاف سیتوکینین‌ها امکان تشکیل ریشه و بافت کالوس را افزایش داده و از ایجاد ساقه ممانعت به عمل می‌آورد (Zare et al., 2021). Mandal & Sharma (2020) با بررسی انواع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بیان کردند استفاده از محیط کشت MS به همراه ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر BA و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر NAA بهترین شرایط را برای تولید بافت کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) را فراهم می‌کند (Sharma & Mandal, 2020). استفاده از NAA در غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر به همراه ۰/۵ میلی گرم بر لیتر BA در محیط کشت پایه MS درصد تولید کالوس نمونه‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) را تا ۱۰۰ درصد افزایش می‌دهد (Asree & Khirallah, 2020). همچنین (Asree & Khirallah, 2020) گزارش کردند محیط کشت پایه MS به همراه ۲ میلی گرم بر لیتر NAA و یک میلی گرم بر لیتر Kin سبب تولید ۱۰۰ درصدی

کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (L. *Foeniculum vulgare*) می‌شود (Asree & Yang, et al, 2020). در پژوهش (Khirallah, 2020) بر روی کشت بافت گیاه رازیانه و تولید متابولیت‌های ثانویه توسط محرک‌های رشد گیاهی بیان کردند نمونه کالوس‌های تیمار شده درون محیط کشت MS حاوی NAA و Kin به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و سالیسیلیک‌اسید و متیل جاسمونات در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان محرک‌های رشد گیاهی بیشترین میزان تولید آنتول را داشته‌اند (Yang et al., 2015). با توجه به اهمیت دارویی گیاه رازیانه و محدود بودن یافته‌های ارائه شده در مورد تولید کالوس از ریزنمونه‌های حاصل از شاخساره این گیاه با ارزش، در پژوهش حاضر، میزان تولید کالوس، تولید اندام ریشه و اندام هوایی از کالوس حاصل به کمک انواع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف (اکسین و سیتوکینین) ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت ریزنمونه

اندام هوایی (ساقه‌های جدید و تازه رشد کرده) گیاه رازیانه به عنوان ریزنمونه گیاهی جهت تولید کالوس در شرایط درون شیشه‌ای، از مرکز (مزرعه) تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تهیه شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در جعبه‌های مخصوص و استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در ابتدا از نظر فئوتیپی بررسی شدند و پس از انتخاب نمونه‌های تازه و فاقد آلودگی و پژمردگی واضح به مدت ۳۰ دقیقه توسط محلول ظرف‌شویی شستشو داده و سپس به مدت یک

ساعت زیر آب جاری آب‌کشی شدند. سپس نمونه‌ها جهت حذف آلودگی قارچی در مرحله استقرار ریزنمونه درون بنومیل ۳ درصد بنومیل (۳ گرم بنومیل در یک لیتر آب) به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند (Noruzpuor et al., 2022). ریز نمونه‌ها سپس درون محلول H_2O_2 (۵ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از دو بار آب‌کشی با آب استریل (دو بار اتوکلاو شده) به مدت ۱۰ دقیقه درون هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند. در انتها و قبل از استقرار بر روی محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (جدول ۱)، ریز نمونه‌ها سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه توسط آب استریل (دو بار اتوکلاو شده) آب‌کشی شدند.

مرحله استقرار و نگهداری ریزنمونه

پس از انتقال ریز نمونه‌های حاصل از شاخساره بر روی محیط کشت، جهت تولید کالوس محیط کشت‌های حاوی ریزنمونه به اتاقک رشد فاقد روشنایی و با دمای $25^{\circ}C$ منتقل شدند. درصد تولید کالوس از ریزنمونه‌های کشت شده، درصد تولید ریشه و اندام هوایی از کالوس حاصل و وزن تر کالوس، رنگ و نوع کالوس پس از گذشت ۳ الی ۴ هفته ثبت شد.

اندازه‌گیری ویژگی‌های بیوشیمیایی

ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه کالوس حاصل از محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتخب درون هاون چینی و ازت مایع سائیده شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ($pH=7$) حاوی ۱ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) و ۱ میلی‌مولار EDTA

اضافه شد. سپس نمونه ها در دمای 4°C و 13000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فاز رویی به عنوان عصاره پروتئینی برای اندازه گیری میزان پروتئین و فعالیت های آنزیمی جمع آوری شد. برای اندازه گیری مقدار پروتئین کل نمونه ها از روش Bradford استفاده شد (Bradford, 1976). جهت پژوهش از 50 میکرولیتر عصاره پروتئینی و 50 میکرولیتر معرف برادفورد و 900 میکرولیتر بافر فسفات به عنوان محلول واکنش استفاده شد. میزان جذب نوری عصاره پروتئینی در طول موج 595 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (BIORAD, SmartspecTM plus، آمریکا) استفاده شد. کمی سازی غلظت پروتئین با آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت های مختلف انجام شد.

جدول ۱- تنظیم کننده های رشد مختلف مورد استفاده جهت تولید کالوس از ریزنمونه های گیاه رازیانه (*F. vulgare*)

Table 1- Different growth regulators used to produce callus from explants of *F. vulgare*

محیط کشت Culture media	نوع اکسین Auxin type	غلظت اکسین (میلی گرم/لیتر) Auxin concentration (mg/L)	نوع سیتوکینین Cytokinin type	غلظت سیتوکینین (میلی گرم/لیتر) Cytokinin concentration (mg/L)
MS	-	-	-	-
MS	-	-	BAP	0.1
MS	-	-	BAP	0.5
MS	-	-	Kin	0.1
MS	-	-	Kin	0.5
MS	2,4-D	0.5	-	-
MS	2,4-D	1	-	-
MS	2,4-D	2	-	-
MS	2,4-D	4	-	-
MS	2,4-D	0.5	BAP	0.1
MS	2,4-D	1	BAP	0.1
MS	2,4-D	2	BAP	0.1
MS	2,4-D	4	BAP	0.1
MS	2,4-D	0.5	BAP	0.5
MS	2,4-D	1	BAP	0.5
MS	2,4-D	2	BAP	0.5
MS	2,4-D	4	BAP	0.5
MS	2,4-D	0.5	Kin	0.1
MS	2,4-D	1	Kin	0.1
MS	2,4-D	2	Kin	0.1
MS	2,4-D	4	Kin	0.1
MS	2,4-D	0.5	Kin	0.5
MS	2,4-D	1	Kin	0.5
MS	2,4-D	2	Kin	0.5
MS	2,4-D	4	Kin	0.5
MS	NAA	0.5	-	-
MS	NAA	1	-	-
MS	NAA	2	-	-
MS	NAA	4	-	-
MS	NAA	0.5	BAP	0.1
MS	NAA	1	BAP	0.1
MS	NAA	2	BAP	0.1
MS	NAA	4	BAP	0.1
MS	NAA	0.5	BAP	0.5
MS	NAA	1	BAP	0.5
MS	NAA	2	BAP	0.5
MS	NAA	4	BAP	0.5
MS	NAA	0.5	Kin	0.1

MS	NAA	1	Kin	0.1
MS	NAA	2	Kin	0.1
MS	NAA	4	Kin	0.1
MS	NAA	0.5	Kin	0.5
MS	NAA	1	Kin	0.5
MS	NAA	2	Kin	0.5
MS	NAA	4	Kin	0.5
MS	IBA	0.5	-	-
MS	IBA	1	-	-
MS	IBA	2	-	-
MS	IBA	4	-	-
MS	IBA	0.5	BAP	0.1
MS	IBA	1	BAP	0.1
MS	IBA	2	BAP	0.1
MS	IBA	4	BAP	0.1
MS	IBA	0.5	BAP	0.5
MS	IBA	1	BAP	0.5
MS	IBA	2	BAP	0.5
MS	IBA	4	BAP	0.5
MS	IBA	0.5	Kin	0.1
MS	IBA	1	Kin	0.1
MS	IBA	2	Kin	0.1
MS	IBA	4	Kin	0.1
MS	IBA	0.5	Kin	0.5
MS	IBA	1	Kin	0.5
MS	IBA	2	Kin	0.5
MS	IBA	4	Kin	0.5

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش (MacAdam, et al (1992) با کمی تغییر انجام شد (MacAdam et al., 1992). مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH= ۷)، ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۹۰ میکرولیتر گایاکول (۱۰ میلی‌مولار)، ۹۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (۵ میلی‌مولار) بود. تغییرات جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۲۵ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه و در دمای °C ۲۵ با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد و میزان فعالیت آن از رابطه $(\Delta A_{425} \times (V/V_t) / (0.1 \times T) / C_p)$ محاسبه شد، که در این فرمول ΔA_{425} : تغییرات جذب نوری؛ V: حجم کل؛ V_t : حجم عصاره مورد

استفاده در واکنش؛ T: زمان واکنش (دقیقه)؛ C_p : غلظت پروتئین بود.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش (Chanes & Mahely (1996) با کمی تغییر استفاده شد (Chanes & Mahely, 1996). بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۵ میلی‌مولار به عنوان پذیرنده الکترون استفاده شد و سپس ۶۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی در حمام یخ به آن اضافه و تغییرات جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. برای نمونه بلانک به جای عصاره پروتئینی از بافر فسفات (pH=۷) استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین در دقیقه از فرمول $(\Delta A_{240} \times (V/V_t) / (0.1 \times T) / C_p) \times (V/V_t)$ محاسبه شد. در این فرمول: ΔA_{240} : تغییرات جذب نوری؛ V: حجم کل؛ V_t : حجم عصاره مورد

استفاده در واکنش؛ T: زمان واکنش (برحسب دقیقه) و Cp: غلظت پروتئین بود.

اندازه‌گیری اسیدآمین پرولین

پرولین آزاد نمونه‌های مورد نظر طبق روش Bates اندازه‌گیری شد (Bates et al., 1973). برای این کار ۰/۱ گرم نمونه کالوس در اسید سولفوسالسیلیک ۳/۳ درصد و در یک هاون چینی کوچک به مدت ۳ دقیقه سائیده شد. همگنای حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی به یک میکروتیوب جداگانه منتقل شد. سپس یک میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر استیک‌اسید خالص به آن اضافه شد. سپس، مخلوط حاصل به حمام آب با دمای ۹۰°C منتقل شده و به مدت یک ساعت در این شرایط نگهداری شد. پس از سرد شدن نمونه دو میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه و سپس به مدت دو دقیقه همزده شد. سپس، جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پرولین آزاد نمونه با یک منحنی استاندارد پرولین خالص تعیین شد.

استخراج متابولیت‌های ثانویه

برای استخراج متابولیت‌های ثانویه نمونه‌های کالوس از روش (Chang, et al (2022) استفاده شد (Chang et al., 2002). بدین منظور ابتدا ۰/۱ گرم نمونه کالوس یا سلول درون هاون چینی و با ۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک به نسبت حجمی ۹۹:۱) کاملاً سائیده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵°C و در تاریکی نگهداری شد. سپس

نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی حاصل برای اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین استفاده شد. برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش et al (2002) Chang, با کمی تغییر استفاده شد (Chang, et al., 2002). ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد (جرمی-حجمی)، ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات یک مولار به یک میلی‌لیتر عصاره حاصل اضافه شد و مقادیر جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد کوئرستین با غلظت‌های مختلف کوئرستین (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر متانول) تهیه و برای کمی‌سازی میزان فلاونوئید کل در نمونه‌ها استفاده شد. سپس از فرمول $T=(C \times V)/M$ مقدار فلاونوئید بر حسب میلی گرم در یک گرم کالوس محاسبه شد. در این فرمول T، میزان فلاونوئید بر حسب میلی گرم در گرم کالوس؛ C، غلظت فلاونوئید بر حسب میلی گرم کوئرستین در میلی لیتر؛ V، حجم نهایی عصاره و M، وزن نمونه (کالوس برحسب گرم) است. برای اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین نمونه‌های کالوس از روش Wagner استفاده شد (Wagner, 1979). همچنین جذب نوری عصاره حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان آنتوسیانین با فرمول $A=\epsilon bc$ و ضریب خاموشی $M^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ محاسبه شد. در فرمول فوق A برابر مقدار عدد جذبی، b برابر عرض کووت، ϵ برابر ضریب خاموشی و c برابر غلظت آنتوسیانین است.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

این پژوهش به صورت آزمایش طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. قبل از انجام تجزیه و تحلیل داده‌ها، تست نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون تک نمونه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ver. 26 و رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

نتایج

طبق نتایج به دست آمده از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲)، درصد تولید کالوس، درصد تولید ریشه و اندام هوایی از کالوس حاصل و وزن تر کالوس جمع آوری شده از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای به طور معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) تحت تأثیر نوع و غلظت اکسین و سیتوکینین قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر درصد تولید کالوس، درصد تولید ریشه و اندام هوایی از کالوس حاصل و وزن تر کالوس ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون شیشه‌ای

Table 2- Variance analysis of the effect of different types and concentrations of plant growth regulators on the percentage of callus production, the percentage of root and shoot production from the resulting callus tissue and callus fresh weight of (*F. vulgare*) in vitro

منبع تغییرات Source of Variation	df	میانگین مربعات MS			
		تولید کالوس (%) Callus production (%)	تولید ریشه (%) Root production (%)	تولید اندام هوایی (%) Shoot production (%)	وزن تر کالوس (گرم) Fresh weight of callus (gr)
تیمار Treatment	64	1739.81 **	2546.05 **	2003.50 **	1.35 **
خطا Error	130	50.12	41.29	31.89	0.01
CV%	-	10.59	34.08	31.24	15.62

ns, ** and *: Non-significant and significant at 1 and 5 % level of probability, respectively.

طبق نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳)، اختلاف معنی‌داری بین انواع اکسین و غلظت‌های مختلف آن درون محیط کشت پایه MS از نظر درصد تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه و وزن تر آن و درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل مشاهده شد. با توجه به نتایج جدول ۳، از نظر درصد تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) و سایر تیمارهای هورمونی در غلظت‌های مختلف اختلاف

معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین درصد تولید کالوس (۹۳/۳۳ درصد) مربوط به محیط کشت MS حاوی NAA در غلظت ۲ میلی‌گرم برلیتر است که به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و سایر تیمارهای هورمونی است. طبق نتایج به دست آمده از نظر انواع اکسین مورد استفاده جهت تولید کالوس نیز بین 2,4-D و NAA (در اکثر موارد) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین استفاده از IBA نسبت به 2,4-D یا NAA به طور معنی‌داری درصد تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه را

کاهش داد. علاوه بر این بین غلظت‌های مختلف اکسین مورد استفاده نیز در همه موارد (2,4-D یا NAA یا IBA) استفاده از ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به سایر غلظت‌های استفاده شده بهترین عملکرد را از نظر درصد تولید کالوس داشته است (جدول ۳). از نظر درصد تولید ریشه از کالوس حاصل نیز بین تیمار شاهد و سایر تیمارهای مورد استفاده اختلاف معنی دار کاملاً مشخصی مشاهده شد (جدول ۳). به طوری که کمترین میزان تولید ریشه از بافت کالوس ریز نمونه گیاه رازیانه (صفر درصد) مربوط به تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی) است. این درحالی است که بیشترین میزان تولید ریشه (۳۱/۳۷ درصد) نیز مربوط به محیط کشت دارای ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D بود. طبق نتایج حاصل در بین انواع اکسین مورد استفاده، بیشترین درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل مربوط به 2,4-D بود. کمترین درصد تولید کالوس نیز مربوط به NAA در غلظت‌های مختلف است (جدول ۳). از نظر غلظت‌های مختلف اکسین مورد استفاده نیز بالاترین درصد تولید ریشه از کالوس حاصل درون محیط کشت‌های دارای 2,4-D یا NAA مربوط به غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر بود، این امر در مورد IBA مربوط به غلظت ۴ میلی گرم بر

لیتر مشاهده شد. همچنین از نظر درصد تولید اندام هوایی نیز بین نوع اکسین و انواع غلظت‌های آن اختلاف معنی داری بین تیمار شاهد و تیمارهای هورمونی مشاهده شد. بیشترین درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس حاصل (۲۵/۹۶ درصد) مربوط به محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D است. به طور کلی استفاده از 2,4-D غلظت‌های مختلف در مقایسه با NAA یا IBA از نظر درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس حاصل عملکرد معنی دار و بهتری داشته است (جدول ۳). همچنین از نظر میانگین وزن تر نمونه کالوس‌های جمع آوری شده بین محیط کشت‌های دارای اکسین در غلظت‌های مختلف و تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی) اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده شد. بیشترین میزان وزن تر کالوس ثبت شده (۱/۰۷ گرم) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر NAA بود. از سوی دیگر، بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۳)، استفاده از NAA در غلظت‌های مختلف در مقایسه با 2,4-D و IBA به طور معنی داری از نظر وزن تر بافت کالوس حاصل عملکرد بهتری داشته است.

جدول ۳- تأثیر نوع و غلظت اکسین بر درصد تولید کالوس، درصد تولید ریشه و اندام هوایی از کالوس و وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 3- Effect of type and concentration of auxin on the percentage of callus production, the percentage of root and shoot production from the resulting callus tissue and callus fresh weight of (*F. vulgare*) in *in vitro*

تیمار	تولید کالوس (%)	تولید ریشه (%)	تولید اندام هوایی (%)	وزن تر کالوس (گرم)
Treatment	Callus production (%)	Root production (%)	Shoot production (%)	Fresh weight of callus (gr)
MS (control)	7.33 ^{g*}	0 ^h	15.13 ^{bc}	0.08 ^f
MS+ 0/5 2,4-D	61.33 ^{ef}	19.16 ^{cde}	15.83 ^{bc}	0.51 ^{de}
MS+1 2,4-D	72 ^{cd}	24.71 ^{abc}	25.96 ^a	0.63 ^{cde}
MS+2 2,4-D	81.33 ^{bc}	31.37 ^a	19.16 ^b	0.73 ^{bc}
MS+4 2,4-D	80.66 ^{bc}	30.26 ^{ab}	11.80 ^{cd}	0.73 ^{bc}
MS + 0/5 NAA	72 ^{cd}	7.51 ^g	12.08 ^{cd}	0.68 ^{cd}
MS +1 NAA	84.4 ^b	8.75 ^g	6.25 ^{def}	0.90 ^{ab}
MS +2 NAA	93.33 ^a	12.91 ^{efg}	4.16 ^{ef}	1.07 ^a
MS + 4 NAA	83.33 ^b	11.66 ^{fg}	2.50 ^f	0.96 ^a
MS+ 0/5 IBA	51.33 ^f	15.97 ^{def}	11.25 ^{cde}	0.45 ^e
MS+ 1 IBA	56.66 ^{ef}	20.69 ^{cd}	9.58 ^{c-f}	0.49 ^{de}
MS+ 2 IBA	64.44 ^{de}	23.60 ^{bc}	5 ^{def}	0.60 ^{cde}
MS+ 4 IBA	58.66 ^{ef}	25.82 ^{abc}	2.5 ^f	0.51 ^{de}

*Different letters indicate a significant difference at the 5% probability level.

طبق نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۴)، از نظر اثر متقابل نوع اکسین - نوع سیتوکینین مورد استفاده درون محیط کشت گیاهی بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) و تیمارهای هورمونی مورد استفاده از نظر درصد تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه و وزن تر آن و نیز درصد تولید ریشه و اندام هوایی از کالوس حاصل اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین درصد تولید کالوس و وزن تر آن (به ترتیب ۹۵ درصد و ۱/۱۶ گرم) زمانی مشاهده شد که از ترکیب هورمونی NAA به همراه Kin استفاده شده بود. با توجه به جدول ۴، استفاده از Kin به عنوان سیتوکینین در ترکیب با 2,4-D یا NAA و یا IBA در مقایسه با BAP از نظر درصد تولید بافت کالوس و وزن تر آن عملکرد معنی‌دار و بهتری داشته است. از نظر درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل نیز بیشترین مقدار به ترتیب (۳۳/۱۴ و ۱۹/۳۲ درصد) مربوط به محیط کشت MS+ 2,4-D + BAP بود. برخلاف نتایج حاصل از درصد تولید بافت کالوس و وزن تر آن، استفاده از Kin به عنوان سیتوکینین درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل را در مقایسه با BAP به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

جدول ۴- اثر متقابل نوع اکسین-نوع سیتوکینین بر درصد تولید کالوس، درصد تولید ریشه و اندام هوایی از کالوس و وزن تر کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 4- The interaction effect of auxin type-cytokinin type on the percentage of callus production, the percentage of root and shoot production from the resulting callus tissue and callus fresh weight of (*F. vulgare*) in *in vitro*

تیمار	تولید کالوس (%)	تولید ریشه (%)	تولید اندام هوایی (%)	وزن تر کالوس (گرم)
Treatment	Callus production (%)	Root production (%)	Shoot production (%)	Fresh weight of callus (gr)
MS (control)	40.78 ^{c*}	7.10 ^d	7.51 ^{cd}	0.25 ^d
MS+ 2,4-D + BAP	72.91 ^c	33.14 ^a	29.32 ^a	0.59 ^c
MS+ 2,4-D + Kin	85.83 ^b	25.51 ^b	13.80 ^b	0.87 ^b
MS+ NAA + BAP	83.83 ^b	14.59 ^c	9.63 ^{bc}	0.92 ^b
MS+ NAA + Kin	95 ^a	7.29 ^d	4.16 ^d	1.16 ^a
MS+ IBA + BAP	57.91 ^d	22.91 ^b	9.89 ^{bc}	0.52 ^c
MS+ IBA + Kin	61.25 ^d	26.72 ^b	5.46 ^{cd}	0.61 ^c

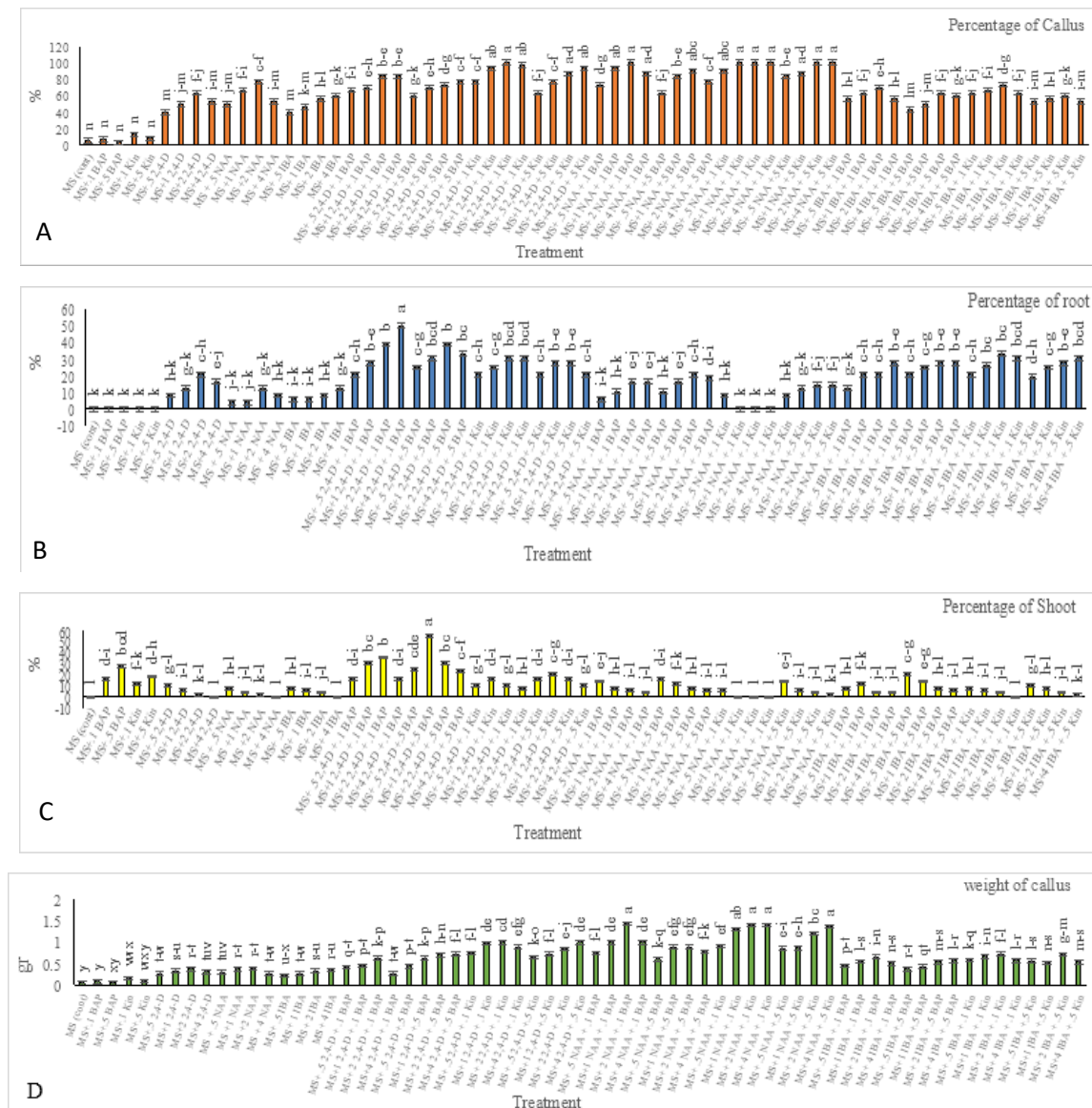
* Different letters indicate a significant difference at the 5% probability level.

طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده ها (شکل ۱- A)، بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده های رشد گیاهی) و اکثر تیمارهای هورمونی از نظر درصد تولید کالوس از ریزنمونه های گیاه رازیانه اختلاف معنی داری مشاهده شد. بین تیمار شاهد و محیط کشت فقط حاوی سیتوکینین (BAP و Kin در غلظت های ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد. از سوی دیگر، استفاده از اکسین های مختلف بدون حضور سیتوکینین (در غلظت های مختلف) به طور معنی داری درصد تولید کالوس را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. همچنین استفاده از اکسین و سیتوکینین در غلظت های مختلف (در ترکیب با همدیگر و در یک محیط کشت) به ویژه استفاده از BAP یا Kin به همراه 2,4-D و BAP یا Kin به همراه NAA درصد تولید کالوس از ریزنمونه های گیاه رازیانه را نسبت به تیمار شاهد، تیمار هورمونی فقط دارای سیتوکینین (BAP یا Kin) و تیمار هورمونی فقط دارای اکسین به طور معنی داری افزایش داد (شکل ۱- A). همچنین استفاده از BAP یا Kin به عنوان سیتوکینین در ترکیب با IBA در مقایسه با تیمار هورمونی فقط دارای اکسین، تأثیر معنی داری بر درصد تولید کالوس از ریزنمونه های گیاه رازیانه نداشته است. همچنین استفاده از Kin (به ویژه در غلظت های پائین تر) به همراه NAA (در اکثر غلظت ها) درصد تولید کالوس از ریزنمونه های گیاه رازیانه را در مقایسه با اکثر تیمارهای هورمونی افزایش داد. به طوری که بالاترین درصد تولید کالوس (۱۰۰ درصد) از ریزنمونه های گیاه رازیانه بیشتر در این تیمار هورمونی مشاهده شد (شکل ۲- B و C). طبق

نتایج به دست آمده بین تیمارهای هورمونی فقط دارای اکسین (در غلظت های مختلف) استفاده از NAA در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر (به تنهایی و بدون ترکیب با سیتوکینین) به طور معنی داری درصد تولید کالوس را در مقایسه با سایر تیمارها تا ۷۶/۶۶ درصد افزایش داد. از سوی دیگر در بین محیط کشت های دارای فقط اکسین کمترین درصد تولید کالوس (۴۰ درصد) مربوط به محیط کشت - های MS+0/5 IBA و MS+0/5 2,4-D بود (شکل ۱- A). همچنین طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها (شکل ۱- B)، بین تیمار شاهد و اکثر تیمارهای هورمونی از نظر درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل اختلاف معنی داری مشاهده شد. از سوی دیگر بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده های رشد گیاهی) و محیط کشت فقط دارای سیتوکینین (BAP یا Kin) و محیط کشت MS دارای NAA (۰/۵ یا ۱ یا ۲ میلی گرم بر لیتر) به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر Kin اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین محیط کشت های دارای فقط اکسین (در غلظت های مختلف) نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد. همچنین بین محیط کشت های دارای فقط 2,4-D یا IBA (در غلظت - های مختلف) و محیط کشت های دارای 2,4-D یا IBA به همراه BAP یا Kin (در غلظت های مختلف) اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده شد (شکل ۱- B). اما اختلاف معنی داری بین محیط کشت دارای فقط NAA و محیط کشت دارای NAA به همراه BAP یا Kin مشاهده نشد. بیشترین درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل شده از ریز نمونه گیاه رازیانه (۱۰۰ درصد) مربوط به محیط کشت MS+2 2,4-D+0/1BAP بود (شکل ۲- D و

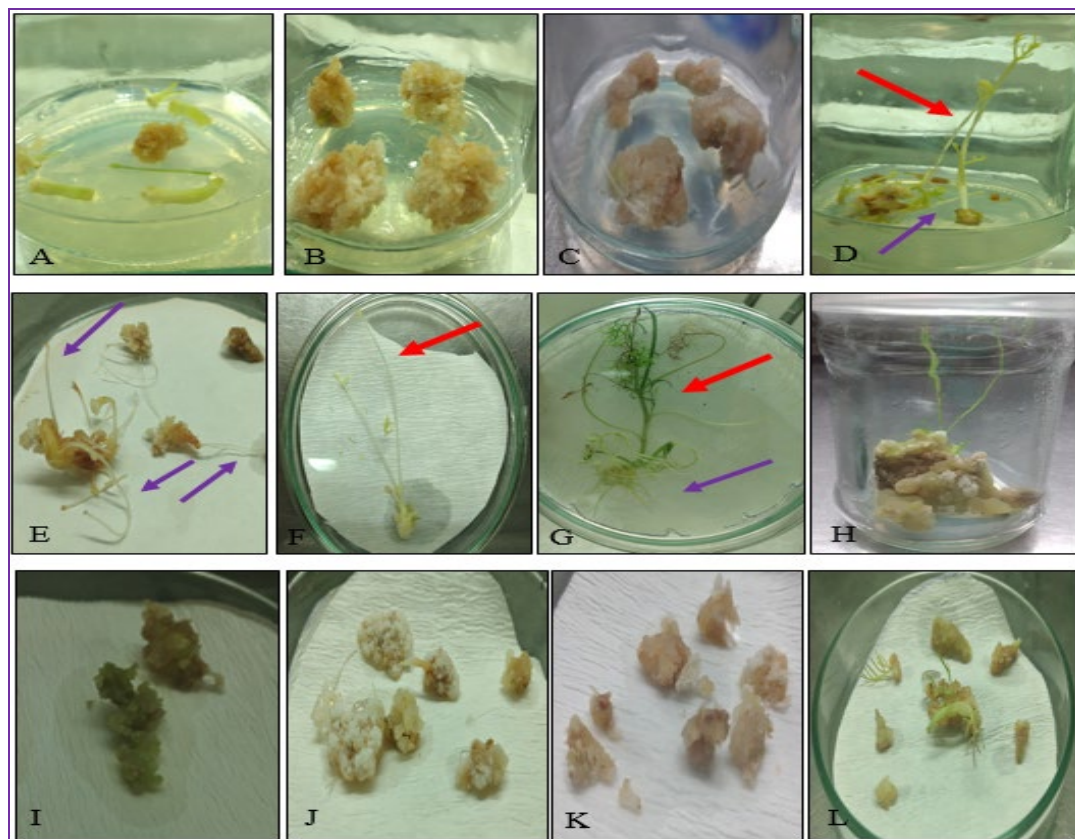
(E). از نظر درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس حاصل نیز بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده های رشد گیاهی) و اکثر تیمارهای هورمونی اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۱-۱). همانطوری که در شکل ۱-۱ C مشاهده می شود از نظر درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل از ریزنمونه های گیاه رازیانه بین تیمار شاهد و محیط کشت های دارای فقط سیتوکینین (BAP یا Kin در غلظت های مختلف) و همچنین محیط کشت های دارای 2,4-D (در غلظت های ۰/۵ یا ۱ یا ۲ یا ۴ میلی گرم بر لیتر) به همراه BAP (در غلظت های ۰/۱ یا ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) اختلاف معنی داری مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس حاصل (۵۵/۵۳ درصد) نیز مربوط به محیط کشت $MS+1 \text{ 2,4-D}+0/5BAP$ بود (شکل ۱-۱ C) (شکل ۲-F و G). همچنین از نظر وزن کالوس به دست آمده نیز بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده های رشد گیاهی) و محیط کشت های دارای فقط سیتوکینین اختلاف معنی داری مشاهده نشد. اما بین تیمار شاهد و محیط

کشت های دارای فقط اکسین و محیط کشت های دارای اکسین به همراه سیتوکینین (در غلظت های مختلف و در ترکیب با یکدیگر) اختلاف معنی داری مشاهده شد (شکل ۱-D). بیشترین میزان وزن کالوس جمع آوری شده از محیط های کشت (۱/۴۳ گرم) مربوط به محیط کشت $MS+2NAA+0.1BAP$ بود (شکل ۱-D) (شکل ۲-۲ H). همانطوری که از شکل ۱-D استنباط می شود استفاده از 2,4-D در ترکیب با Kin و نیز استفاده از NAA در ترکیب با BAP یا Kin تأثیر بیشتری بر وزن تر کالوس حاصل از ریز نمونه های گیاه رازیانه دارد. نوع (زبر یا نرم بودن بافت کالوس حاصل) و رنگ آن در جدول ۷ و به صورت کیفی نشان داده شده است. طبق نتایج حاصل اکثر کالوس های حاصل از ریز نمونه های گیاه رازیانه به رنگ قهوه ای و از نوع نرم بودند (شکل ۲-K). اما نمونه کالوس های به دست آمده از محیط کشت های حاوی غلظت های مختلف NAA به همراه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر Kin سبز رنگ و از نوع زبر بودند (شکل ۲-I و L).



شکل ۱ - تأثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی: (A) درصد تولید کالوس، (B و C) درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل (به ترتیب) و (D) وزن تر بافت کالوس حاصل.

Figure 1- Effect of plant growth regulators: A) Callus production percentage, (B and C) The percentage of root and shoot production from the resulting callus tissue (respectively) and (D) Fresh weight of the resulting callus tissue



شکل ۲- استقرار و تولید کالوس توسط ریزنمونه‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون‌شیشه‌ای. A) تیمار کنترل محیط کشت MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، B و C) تولید بافت کالوس از محیط کشت MS+1 NAA+0.1 Kin و MS+2 NAA+0.1 Kin (به ترتیب)، D و E) تولید ریشه از بافت کالوس و محیط کشت MS+4 2,4-D+0.1 BAP و MS+2 2,4-D +0.1 BAP (به ترتیب)، F و G) تولید شاخساره از بافت کالوس محیط کشت MS+0.5 BAP و MS+1 2,4-D +0.5 BAP (به ترتیب)، H) بیشترین وزن تازه ثبت شده بافت کالوس MS+2 NAA +0.1 BAP (به ترتیب)، I) تولید بافت کالوس با رنگ سبز محیط کشت MS+0.5 BAP و MS+2 NAA +0.1 Kin (J)، تولید بافت کالوس با رنگ سفید محیط کشت MS+0.5 NAA +0.1 BAP (K)، تولید بافت کالوس با رنگ قهوه‌ای محیط کشت MS+2 IBA +0.1 BAP (L)، تولید بافت کالوس زیر محیط کشت MS+2 2,4-D +0.5 BAP.

Figure 2- Establishment and production of callus tissue by fennel (*F. vulgare*) explants in *in vitro*. A) Control (MS without plant growth regulators), B and C) production of callus tissue (MS+1NAA+0/1Kin and MS+2NAA+0/1Kin (respectively)), D and E) root production from callus tissue (MS+4 2,4-D+0/1BAP and MS+2 2,4-D +0/1BAP(respectively)), F and G) shoot production from callus tissue (MS+0/5BAP and MS+1 2,4-D +0/5BAP(respectively)), H) The highest fresh weight of callus recorded (MS+2 NAA + 0/1BAP), I) callus with green color (MS+2 NAA + 0/1Kin), J) callus with white color (MS+0.5 NAA + 0/1BAP), K) callus with brown color (MS+2 IBA + 0/1BAP), L) rough callus (MS+2 2,4-D+0/5BAP).

بررسی میزان ترکیبات بیوشیمیایی نمونه کالوس‌های منتخب

نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان دادند انواع مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌طور معنی-داری و در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان فعالیت

آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، میزان تجمع اسید آمینه پرولین، فلاونوئید کل و آنتوسیانین نمونه کالوس‌های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون‌شیشه‌ای موثر است (جدول ۶).

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر تنظیم کننده هـای رشد گیاهی بر ویژگی هـای بیوشیمیایی و متابولیت هـای ثانویه نمونه کالوس هـای گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون شیشه ای

Table 6- Mean square effect of plant growth regulators on biochemical characteristics and secondary metabolites of callus samples of (*F. vulgare*) in *in vitro* conditions

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی df	پراکسیداز Peroxidase	کاتالاز Catalase	پرولین Prolin	فلاونوئید Flavonoid	آنتوسیانین Anthocyanin
تیمار Treatment	24	14257.30 **	492908.51 ns	0.38 **	0.19 **	12.76 **
خطا Error	50	1443.85	50088.23	0.006	0.003	1.18
CV ضریب تغییرات	-	32.14	29.97	8.24	27.38	17.16

ns, ** and *: Non-significant and significant at 1 and 5 % level of probability, respectively.

طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها (جدول ۷)، از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز، تجمع اسید آمینه پرولین، میزان فلاونوئید کل و آنتوسیانین نمونه کالوس هـای گیاه رازیانه (*F. vulgare*) جمع آوری شده بین اکثر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

جدول ۷- تأثیر تنظیم کننده هـای رشد گیاهی مختلف بر میزان فعالیت آنزیم هـای پراکسیداز و کاتالاز، میزان تجمع اسید آمینه پرولین، فلاونوئید کل و آنتوسیانین نمونه کالوس هـای گیاه رازیانه (*F. vulgare*) در شرایط درون شیشه ای

Table 7- The effect of different plant growth regulators on the activity level of peroxidase and catalase enzymes, the amount of amino acid accumulation of proline, flavonoids, and anthocyanin in callus samples of fennel plant (*F. vulgare*) in *in vitro* conditions

Cell media (MS)	Peroxidase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ protein) $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ protein) $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Prolin ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Flavonoid (mg Quercetin.g ⁻¹)	Anthocyanin ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
MS (free)	89.54 def*	708.80 bc	0.62 ij	0.10 fg	5.55 cfg
1 2,4-D+0.1 BAP	100.23 def	608.62 c	0.62 ij	0.29 abc	9.50 a
2 2,4-D+0.1 BAP	95.13 def	689.33 bc	0.60 j	0.20 c-f	7.17 b-c
1 2,4-D+0.5 BAP	87.81 def	575.38 c	0.83 fg	0.38 a	8.48 ab
2 2,4-D+0.5 BAP	80.02 ef	515.43 c	0.73 g-j	0.34 ab	9.80 a
1 2,4-D+0.1 Kin	70.40 c	480.19 c	0.60 j	0.15 def	5.85 d-g
2 2,4-D+0.1 Kin	80.13 ef	498.11 c	0.73 g-j	0.20 c-f	7.77 a-d
1 2,4-D+0.5 Kin	67.73 c	444.16 c	0.68 hij	0.24 cd	7.77 a-d
2 2,4-D+0.5 Kin	86.36 ef	424.44 c	0.75 ghi	0.21 cde	8.68 ab
1 NAA+0.1 BAP	75.30 ef	465.13 c	0.70 g-j	0.17 def	6.16 c-g
2 NAA+0.1 BAP	68.67 c	443.63 c	0.75 ghi	0.20 c-f	7.97 abc
1 NAA+0.5 BAP	80.88 ef	389.44 c	0.75 ghi	0.22 cde	8.98 ab
2 NAA+0.5 BAP	87.80 def	487.85 c	0.75 ghi	0.38 a	8.88 ab
1 0.5 NAA+0.1 Kin	96.84 def	743.40 bc	0.79 fgh	0.04 g	5.15 c-h
2 NAA+0.1 Kin	100.89 def	627.40 c	0.99 c	0.11 cfg	5.75 d-g
1 NAA+0.5 Kin	73.68 ef	459.22 c	0.78 fgh	0.15 def	6.06 c-g
2 NAA+0.5 Kin	66.53 c	383.65 c	0.9 ef	0.21 cde	6.46 c-f
1 IBA+0.1 BAP	101.15 def	691.42 bc	1.01 c	0.15 def	4.44 f-i
2 IBA+0.1 BAP	161.36 cd	1064.85 b	1.23 cd	0.17 def	4.44 f-i
1 IBA+0.5 BAP	273.45 a	1813.89 a	1.79 a	0.25 bcd	3.03 i
2 IBA+0.5 BAP	149.78 cde	1081.99 b	1.29 c	0.18 def	4.44 f-i
1 IBA+0.1 Kin	104.09 def	794.58 bc	1.20 cd	0.15 def	5.55 e-h
2 IBA+0.1 Kin	203.93 bc	1105.03 b	1.46 b	0.19 def	3.43 hi
1 IBA+0.5 Kin	227.37 b	1516.20 a	1.16 d	0.18 def	4.24 ghi
2 IBA+0.5 Kin	265.64 b	1610.75 a	1.53 b	0.21 cde	3.13 hi

* Different letters in each column indicate statistically significant differences at the 5% probability level of Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز (به ترتیب $273/45$ و $1813/89 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ mg^{-1}) و تجمع اسید آمینه پرولین ($1/79$ میکروگرم در میلی گرم) مربوط به محیط کشت MS+1 IBA+0.5 BAP بود. همچنین بیشترین مقدار فلاونوئید ($0/38 \text{ mg.Quercetin.g}^{-1}$) مربوط به محیط کشت MS+2 NAA+0.5 BAP و بیشترین مقدار آنتوسیانین ($9/80 \mu\text{mol.g}^{-1}$) نیز مربوط به محیط کشت MS+2 2,4-D+0.5 BAP مشاهده شدند.

بحث

تنظیم کننده های رشد گیاهی به ویژه اکسین ها و سیتوکینین ها در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی (in vitro) رشد و نمو سلول های گیاهی را کنترل می کنند. اکسین ها و سیتوکینین ها در تقسیم سلولی، رشد سلولی و اندام زایی گیاهان نقش بسیار مهمی دارند. اکسین ها با اسیدی نمودن دیواره سلولی و افزایش قدرت توسعه پذیری آن منجر به رشد سلولی می شوند. سیتوکینین ها با تنظیم سنتز پروتئین های درگیر در شکل گیری دوک های میتوزی به طور مستقیم چرخه سلولی را تحت تأثیر قرار می دهند (Noruzpour et al., 2022). در پژوهش حاضر، از NAA، 2,4-D و IBA به عنوان اکسین و BAP و Kin به عنوان سیتوکینین (در غلظت های مختلف) جهت بررسی تأثیر این نوع از تنظیم کننده های رشد گیاهی (به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر) بر درصد تولید کالوس، درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل و وزن تر کالوس تولید شده از ریزنمونه های گیاه رازیانه درون محیط کشت پایه MS استفاده شد. طبق نتایج

حاصل در این پژوهش افزودن NAA در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر به درون محیط کشت در مقایسه با سایر اکسین ها در غلظت های مختلف درصد تولید کالوس از ریزنمونه های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و وزن تر آن را به طور معنی داری افزایش می دهد (جدول ۳). استفاده از NAA به جای 2,4-D و IAA میزان القا و تولید کالوس در ریزنمونه های گیاه مارچوبه (*Asparagus densiflorus*) را تا ۱۰۰ درصد افزایش می دهد (Toma & Rsheed, 2012). طبق یافته ها بیشترین درصد تولید کالوس و وزن تر آن زمانی به دست آمد که از غلظت های بالاتر اکسین های مختلف (۲ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر) درون محیط کشت استفاده شده است (جدول ۳). همچنین طبق نتایج این پژوهش، از نظر نوع و غلظت های مختلف اکسین مورد استفاده درون محیط کشت، بالاترین درصد تولید ریشه از بافت کالوس حاصل زمانی به دست آمد که از 2,4-D (به تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین های مختلف) و در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر استفاده شده باشد (جدول ۳). از نظر درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس به دست آمده نیز استفاده از 2,4-D و در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر (به تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین های مختلف) به طور معنی داری عملکرد بهتری نسبت به سایر اکسین های مورد استفاده درون محیط کشت داشته است (جدول ۴). از سوی دیگر، طبق یافته ها (جدول ۴)، استفاده از Kin (به تنهایی و یا در ترکیب با اکسین های مختلف) در ترکیب با اکسین های مختلف به جای BAP تأثیر معنی داری بر درصد تولید کالوس و وزن تر کالوس حاصل داشته است. مطابق با نتایج پژوهش حاضر، Zare et al., (2021) بیان کردند

Arivalagan, با بررسی تأثیر انواع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر میزان تولید کالوس حاصل از ریزنمونه‌های گیاه *Sauropus endogynous* بیان کردند هیچ بافت کالوسی از محیط کشت حاوی Kin به تنهایی حاصل نمی‌شود و افزودن NAA به عنوان اکسین به محیط کشت دارای Kin تولید کالوس را القا می‌کند (Arivalagan et al., 2012). همچنین Rahman, et al (2019) نشان دادند افزودن Kin (به ویژه در غلظت‌های پائین‌تر) به عنوان سیتوکنین به محیط کشت حاوی اکسین القا و تولید کالوس را در ریزنمونه‌های پریش در مقایسه با محیط کشت حاوی فقط اکسین را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Rahman et al., 2019)، که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. با توجه به شکل ۱-A و D استفاده هم‌زمان از Kin یا BAP (به عنوان سیتوکنین) و 2,4-D یا NAA یا IBA (به عنوان اکسین) درون محیط کشت جهت القا و تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه، عملکرد معنی‌دار و بهتری را نسبت به محیط کشت دارای فقط اکسین یا فقط سیتوکنین نشان می‌دهد. طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها استفاده از Kin در ترکیب با NAA درصد تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه را افزایش می‌دهد (شکل ۱-A). همچنین بر اساس شکل ۱-A در اکثر موارد کاهش غلظت سیتوکنین‌ها و افزایش غلظت اکسین‌ها تولید کالوس را در ریزنمونه‌های گیاه رازیانه افزایش داد که نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر پژوهشگران بسیار مشابه است. افزایش غلظت NAA از ۰/۵ میلی گرم بر لیتر به ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر در کنار کاهش غلظت Kin درون محیط کشت MS میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های گیاه رازیانه

استفاده از Kin در مقایسه با BA تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه *Stevia rebaudiana* را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (Zare et al., 2021). همچنین مشخص شد بیشترین درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس ریزنمونه‌های گیاه رازیانه مربوط به محیط کشت دارای BAP به عنوان سیتوکنین و 2,4-D به عنوان اکسین بوده است (جدول ۴-۴). نتایج نشان دادند از نظر درصد تولید ریشه و اندام هوایی استفاده از BAP به جای Kin عملکرد بهتری دارد. (Hu et al., 2018)، با بررسی نوع سیتوکنین مورد استفاده جهت تولید اندام هوایی از بافت کالوس گیاه *Papaver pseudo-orientale* نشان دادند بیشترین درصد تولید اندام هوایی مربوط به محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر Kin (در ترکیب با اکسین‌های مختلف) بود (Hu et al., 2018). از سوی دیگر، طبق نتایج این پژوهش (شکل ۱-A و D) از نظر درصد تولید کالوس و وزن تر حاصل از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه، بین محیط کشت دارای فقط سیتوکنین (Kin یا BAP) و تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما با افزودن اکسین به محیط کشت دارای سیتوکنین درصد تولید کالوس و وزن تر آن به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱-A و D). استفاده از Kin در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر (به تنهایی و بدون اکسین) امکان تولید کالوس از ریزنمونه‌های گیاه پریش (*Catharanthus roseus*) را در مقایسه با ترکیب اکسین/سیتوکنین به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Rahman et al., 2019). (et al (2012)

براساس فرضیه توتی‌پتانسی، هر سلول گیاهی تمام اطلاعات ژنتیکی گیاه والد را داراست و می‌تواند دامنه وسیعی از مواد بیوشیمیایی که در گیاه کامل یافت می‌شود را تولید کند (Fehér, 2019). نوع و مقدار اکسین یا سیتوکنین، یا نسبت اکسین به سیتوکنین، تشکیل و تجمع متابولیت‌های ثانویه را در سلول‌های گیاهی کشت شده تغییر می‌دهد (Hussain et al., 2021). استفاده از BAP، 2ip و زآتن تأثیر مناسبی بر سطح متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از آزمایش‌های داشته است. همچنین مشخص شده است جیبرلیک‌اسید و آبسزیک‌اسید، تولید آنتوسیانین را در برخی از کشت‌های درون-شیشه متوقف می‌سازند (Hu et al., 2018). در بسیاری از موارد مشاهده شد تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D مانع تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. برای مثال، حذف 2,4-D و یا جایگزینی آن با NAA یا IAA سبب افزایش تولید آنتوسیانین در کشت تعلیقی *Daucus carota*، نیکوتین در کشت تعلیقی *Nicotiana tabacum*، شیکونین در کشت تعلیقی *Portulaca grandiflora* می‌شود (Srivastava, 2018). با وجود این، تحریک توسط 2,4-D در بیوسنتز کارتنوئید در کشت تعلیقی *Daucus carota* و تولید آنتوسیانین در کشت کالوس *Oxolis linearis* گزارش شده است (Nartop, 2018; Ozsan et al., 2018). سیتوکنین‌ها بسته به نوع متابولیت و گونه گیاهی اثرات متفاوتی دارند. برای مثال، Kin تولید آنتوسیانین را در کشت *Salix tetrasperma* Roxb تحریک کرده ولی مانع تولید آن در کشت سلول جنس *Populus* می‌شود (Shahid & Anis, 2018).

(*F. vulgare*) را افزایش می‌دهد (Hussain et al., 2021). این درحالی است که طبق نتایج پژوهش حاضر، بین تیمار شاهد (محیط کشت فاقد تنظیم-کننده‌های رشد گیاهی) و محیط کشت‌های دارای فقط اکسین و اکسین/سیتوکنین از نظر درصد تولید ریشه از بافت کالوس به دست آمده از ریزنمونه‌های گیاه رازیانه در شرایط درون‌شیشه‌ای اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۱-B). بیشترین درصد تولید ریشه از بافت کالوس نیز (۵۰ درصد) مربوط به محیط کشت BAP 2,4-D+1.0 MS+4 بود. (Mandal & Sharma, 2020) با بررسی تأثیر محیط کشت‌های مختلف جهت باززایی گیاه رازیانه *Foeniculum vulgare* بیان کردند بهترین محیط کشت و تیمار هورمونی برای تولید ریشه از بافت کالوس این گیاه محیط کشت SH به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم بر BAP است (Sharma & Mandal, 2020). از نظر درصد تولید اندام هوایی از بافت کالوس گیاه رازیانه نیز مشخص شد استفاده از BAP در مقایسه با Kin شاخساره‌های بیشتری تولید می‌شود (شکل ۱-C). بیشترین درصد تولید اندام هوایی (۵۵/۵۳ درصد) مربوط به محیط کشت BAP 2,4-D+5.0 MS+1 بود. بهترین محیط کشت به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی جهت تولید شاخه‌های ناب‌ه‌جا از بافت کالوس گیاه رازیانه *Foeniculum vulgare* فرایند باززایی گیاهی مربوط به محیط کشت SH حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA است (Sharma & Mandal, 2020). کشت سلول‌های گیاهی یک منبع مناسب و مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در اکثر گیاهان است (Espinosa-Leal et al., 2018).

نتیجه گیری کلی

معنی داری بر درصد تولید کالوس و وزن کالوس حاصل از ریزنمونه های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) داشته است. در این پژوهش بیشترین درصد تولید ریشه و اندام هوایی از بافت کالوس حاصل زمانی به دست آمد که از 2,4-D (به عنوان اکسین) و BAP (به عنوان سیتوکینین) استفاده شد. همچنین طبق یافته های پژوهش حاضر، مشخص شد بین میزان فعالیت آنزیم های پراکسیداز، کاتالاز، تجمع اسید آمینه پرولین، فلاونوئید و آنتوسیانین و تنظیم کننده های رشد گیاهی مختلف، اختلاف معنی داری وجود دارد.

با توجه به یافته های پژوهش حاضر، استفاده از سیتوکینین و اکسین در ترکیب با یکدیگر امکان القاء و تولید کالوس با وزن تر بالا در ریزنمونه های گیاه رازیانه (*F. vulgare*) را فراهم می کند. این در حالی است که استفاده از سیتوکینین و اکسین به تنهایی درون محیط کشت تأثیر مناسبی بر میزان تولید کالوس ندارد. همچنین نتایج حاصل نشان دادند استفاده از Kin به عنوان سیتوکینین در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر لیتر و NAA به عنوان اکسین در غلظت های ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر تأثیر مثبت و

References

- Arivalagan, U., Alderson, P. G., & Nagarajan, A. (2012). Effect of growth hormones on callus induction of *Sauropus androgynous* (Sweet shoot). *Annals of Biological Research*, 3, 4668-4674.
- Asree, H. J., & Khirallah, A. A. (2020). Induced callus of Fennel plant (*Foeniculum Vulgare* Mill.) in *InVitro*. *Plant Archives*, 20(1), 2949-2952.
- Bates, L. S., Waldren, R. A., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/bf00018060>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Chanes, B., & Mahely, A. (1996). Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*. Academic Press. New York, 2, 764-791.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 3. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science*, 10, 536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536>
- Han, Y., Jin, X. I., Wu, F. b., & Zhang, G. P. (2011). Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University Science B*, 12, 399-407. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1000219>
- Hu, Z., Weijian, L., Yali, F., & Huiquan, L. (2018). Gibberellic acid enhances postharvest toon sprout tolerance to chilling stress by increasing the antioxidant capacity during the short-term cold storage. *Scientia Horticulturae*, 237, 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.018>
- Hussain, S., Nanda, S., Zhang, J., Rehmani, M. I. A., Suleman, M., Li, G., & Hou,

- H. (2021). Auxin and cytokinin interplay during leaf morphogenesis and phyllotaxy. *Plants*, 10(8), 1732. <https://doi.org/10.3390/plants10081732>
- Khan, R. U., Fatima, A., Naz, S., Ragni, M., Tarricone, S., & Tufarelli, V. (2022). Perspective, opportunities and challenges in using fennel (*Foeniculum vulgare*) in poultry health and production as an eco-friendly alternative to antibiotics: a review. *Antibiotics*, 11(2), 278. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020278>
- MacAdam, J. W., Nelson, C. J., & Sharp, R. E. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology*, 99(3), 872-878. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.872>
- Magyar-Tábori, K., Dobránszki, J., Teixeira da Silva, J. A., Bulley, S. M., & Hudák, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101, 251-267. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9696-6>
- Mehra, N., Tamta, G., & Nand, V. (2021). A review on nutritional value, phytochemical and pharmacological attributes of *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(2), 1255-1263. <https://doi.org/10.22271/phyto.2021.v10.i2q.13983>
- Nartop, P. (2018). Engineering of biomass accumulation and secondary metabolite production in plant cell and tissue cultures. In *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*, pp. 169-194. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812689-9.00009-1>
- Nikolova, M., Evstatieva, L., & Nguyen, T. D. (2011). Screening of plant extracts for antioxidant properties. *Botanica Serbica*, 35(1), 43-48.
- Noruzpour, M., Zare, N., Asghari-Zakaria, R., & Sheikhzade-Mosadegh, P. (2019). *Vaccinium arctostaphylos* L. Iranian Journal of Horticultural Science, 50(2), 435-48. <https://doi.org/10.22059/ijhs.2018.252894.1415>
- Noruzpuor, M., Zare, N., Asghari Zakaria, R., & Sheikhzade, P. (2022). Effects of benomyl and cytokinin on *in vitro* contamination and growth of *Vaccinium arctostaphylos* L. node explants. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(1), 150-165. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2022.356225.3070>
- Noshad, M., & Falah, F. (2020). Study the chemical composition of essential oil of *Foeniculum vulgare* and antioxidant activity and its cell toxicity. *Journal of Food Science and Technology*, 17(104), 124-133. <https://doi.org/10.52547/fsct.17.104.124>
- Ozsan, T., Kanmaz, M. G., & Onus, A. N. (2018). *In vitro* carrot (*Daucus carota* L.) regeneration: a study on the use of 2, 4-D and activated charcoal. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1(1), 29-32.
- Rahman, N. N. A., Rosli, R., Kadzimin, S., & Hakiman, M. (2019). Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental and Applied Agriculture*, 4(3), 928-932. <https://doi.org/10.5455/faa.54779>
- Rasheed, D. M., Emad, A. M., Ali, S. F., Ali, S. S., Farag, M. A., Meselhy, M. R., & Sattar, E. A. (2021). UPLC-PDA-ESI/MS metabolic profiling of dill shoots bioactive fraction; evidence of its antioxidant and hepatoprotective effects *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Food Biochemistry*, 45(6), e13741. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13741>
- Saremirad, A., Azarkish, R., & Abbasi, S. (2021). Optimization callus induction in Fennel (*Foeniculum vulgare* M.). *Journal of Medicinal Plants Biotechnology*, 6(2), 1-18.

- Shahid, A., & Anis, M. (2018). Production and enhancement of anthocyanin pigment in callus cultures of *Salix tetrasperma* Roxb. *The Journal of Plant Science Research*, 34(1), 9-14. <https://doi.org/10.32381/jpsr.2018.34.01.2>
- Sharma, P., & Mandal, J. (2020). *In vitro* shoot regeneration of hypocotyl explants of *Foeniculum vulgare*-a culinary and medicinal herb. *International Research Journal on Advanced Science Hub*, 2(Special Issue ICAMET 10S), 53-61. <https://doi.org/10.47392/irjash.2020.199>
- Srivastava, A. (2018). *In vitro* mutagenic studies of *Portulaca Spp.* (Doctoral dissertation, Maharaja Sayajirao University of Baroda (India)).
- Toma, R. S., & Rsheed, K. A. (2012). *In vitro* propagation through seed culture and regeneration of *Asparagus densiflorus* L. through callus cultures derived from hypocotyls. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 9(2), 94.
- Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1), 88-93. <https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88>
- Yang, I. J., Lee, D. U., & Shin, H. M. (2015). Anti-inflammatory and antioxidant effects of coumarins isolated from *Foeniculum vulgare* in lipopolysaccharide-stimulated macrophages and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 37(3), 308-317. <https://doi.org/10.3109/08923973.2015.1038751>
- Zare, N., Noruzpour, M., & Sheikhzadeh, P. (2021). Effects of yeast extract on growth, biochemical properties and production of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Vaccinium arctostaphylos* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 13(1), 37-54. [in persian] <https://doi.org/10.22108/IJPB.2021.125157.1230>

