Research Article

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research DOI: 10.22092/IJRFPBGR.2023.362211.1436
Vol. 31, No. 1, Page 68-84 (2023) DOR: 20.1001.1.17350891.1402.31.1.5.6

Optimization of regeneration of anise (*Pimpinella anisum* L) in *in vitro* condition

V. S. Hoseinzadeh [1], F. Zaker Tavallaie[2*] and L. Samiei [3]

1- M.Sc. graduated, Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Shirvan Agriculture Faculty, University of Bojnord, Bojnord, Iran.
2* Corresponding author, Assist. Prof, Dept. Production Engineering and Plant Genetics, Shirvan Agriculture Faculty, University of Bojnord, Bojnord, Iran. Email: f.zaker.t@um.ac.ir
3- Assoc. Prof, Dept. Ornamental plants are part of the Plant Science Research Institute at Ferdowsi University of Mashhad. Iran.

Received: 05.05.2023 Accepted: 02.09.2023

Extended Abstract

Background and objectives:
Anise *Pimpinella anisum* L. is a valuable medicinal plant that 2-3% of its seed weight is essential oils, and about 80-90% of its essential oil is trans-antol. This research was carried out to optimize the indirect organogenesis of *P. anisum* under *in vitro* conditions.

Methodology:
In the first experiment, different methods of seed germinating and disinfection treatments for decontamination of samples were investigated. In the second experiment, the effect of different combinations of BA, Kin and NAA on the direct regeneration of hypocotyl bud explants was investigated. In the third experiment, callus production was investigated from explants of root, hypocotyl, hypocotyl bud, cotyledon leaf and normal leaf, using different concentrations of 2,4-D. In the fourth experiment, the effect of a narrower range of 2,4-D concentration on the callus formation of petiole and root explants was evaluated. In the fifth experiment, the produced calli was exposed to different concentrations of BA and NAA for regeneration. All experiments were conducted in a completely randomized design with three replications. Data analysis was done using Minitab software, and the mean comparison was made using the Tukey method ($p<0.05$).

Results:
The best germination was obtained at a value of 70% in 24 hours of seed soaking in water (hydro priming) and disinfection with 70% alcohol and 1.5% sodium hypochlorite in 1/2 MS culture medium. In direct regeneration, stem-less leaves were produced. The best direct regeneration response in terms of petiole length was related to treatments of 9 (0.5 mg/L BA plus 0.5 mg/L Kin plus 0.5 mg/L NAA), 14 (0.5 mg per liter Kin plus 1mg/L NAA), 17 (0.25 mg/L BA plus 0.25 mg/L Kin plus 1mg/L NAA) and 19 (1mg/L BA plus 1mg/L Kin plus 1mg/L NAA) with about 4 cm. The highest leaf number (47 leaves) was obtained using the treatments of 14 and 17. In the third experiment, petiole and root explants had the best callus formation. In the fourth experiment, using the treatment of (0.5 mg/L BA +0.75 mg/L of 2, 4-D), the highest rate of 97.22% callus formation was observed in petiole explants. In the fifth experiment, the callus obtained from the previous stage induced the highest shoot with a value of 40% in the control treatment without hormones. Some branches were rooted, and the resulting seedlings were transferred to the greenhouse after adaptation.

Conclusion:
It was concluded that for the regeneration and breeding of anise plant, the indirect regeneration of the callus is more suitable than the direct regeneration method. Also, the petiole was a suitable organ as the initial explant. The 1.5% sodium hypochlorite was the best disinfectant for seed decontamination. Hormonal treatment of 0.75 mg/L of 2, 4-D +0.5 mg/L of BA induced the highest rate (97.22%) of callus in a petiole explant. Therefore, it could be used as a successful hormonal compound for callus formation in anise. The production of branches and roots from callus in the control treatment indicated that it was possible to obtain a whole plant without using any plant growth regulators. The results of this research can be used in micropropagation studies, genetic engineering, cell suspension culture and production of secondary metabolites and other projects related to anise improvement and molecular studies.

Keywords: Anise, shoot induction, callus formation, BA, 2,4–D.

.

بهینه‌سازی باززایی آنیسون (*Pimpinella anisum L.*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

وجیهه سادات حسین‌زاده[۱]، فاطمه ذاکر تولایی[۲*] و لیلا سمیعی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد

۲* - نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی شیروان، دانشگاه بجنورد

پست‌الکترونیک: f.zaker.t@um.ac.ir

۳- دانشیار، گروه گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: آنیسون یا بادیان رومی با نام علمی *Pimpinella anisum* L. از تیره Apiaceae (Umbelliferea) و جنس *Pimpinella* است. آنیسون بومی نواحی سواحل غربی دریای مدیترانه، مصر و آسیای صغیر است. جنس *Pimpinella* دارای گونه‌های متعددی است که تاکنون ۱۵۰ گونه در اروپا، آسیا و آفریقا متعلق به این جنس شناخته شده‌اند. حدود ۲ تا ۳ درصد وزن بذر آنیسون را اسانس تشکیل می‌دهد و مهمترین ماده تشکیل دهنده اسانس، ترانس آنتول به میزان ۸۰ تا ۹۰ درصد آن است. این مطالعه با هدف بهینه‌سازی باززایی این گیاه در محیط درون شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در آزمایش اول، جوانه‌زنی بذرهای گیاه و انتخاب روش مناسب ضدعفونی برای آلودگی‌زدایی نمونه‌ها بررسی شد. در آزمایش دوم، باززایی مستقیم گیاه تحت تأثیر ترکیبات مختلف BA، Kin و NAA روی ریزنمونه جوانه هیپوکوتیلی بررسی گردید. در آزمایش سوم، تولید کالوس از ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل، جوانه هیپوکوتیلی، برگ لپه‌ای و برگ معمولی با استفاده از غلظت‌های مختلف 2,4-D انجام شد. در آزمایش چهارم، اثر دامنه محدودتری از غلظت‌های مناسب از 2,4-D روی ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه بررسی شد. در آزمایش پنجم، کالوس‌های تولید شده در مرحله قبل برای باززایی در معرض غلظت‌های مختلف BA و NAA قرار گرفتند. همه این آزمایش‌ها در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Minitab انجام و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها: بهترین پاسخ جوانه‌زنی به میزان ۷۰ درصد در شرایط ۲۴ ساعت خیس کردن بذرها و ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت-سدیم ۱/۵ درصد در محیط کشت MS ۱/۲ بدست آمد. بهترین پاسخ باززایی مستقیم از نظر طول دمبرگ مربوط به تیمارهای ۹ (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA)، ۱۴(۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA)، ۱۷(۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) و ۱۹ (یک میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) با حدود ۴ سانتی‌متر بود. از نظر تعداد برگ، بهترین پاسخ مربوط به تیمارهای ۱۴و ۱۷ با ۴۷ عدد برگ بود. در آزمایش سوم، ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه بهترین کالوس‌زایی را داشتند. در آزمایش چهارم، با استفاده از تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4D به میزان ۹۷/۲۲ درصد در ریزنمونه دمبرگ، کالوس‌زایی مشاهده شد. در آزمایش پنجم، کالوس‌های بدست‌آمده از مرحله قبل در تیمار شاهد بدون هورمون بیشترین شاخه‌زایی را به میزان ۴۰ درصد نشان دادند. بعضی از شاخه‌ها ریشه‌دار شده و گیاهچه‌های حاصل پس از سازگاری به گلخانه منتقل شدند.

نتیجه‌گیری: در این آزمایش اگرچه باززایی مستقیم منجر به تولید ساقه نشد، اما تولید برگ در این روش مشاهده شد. با توجه به عدم مشاهده نتایج مورد انتظار در روش باززایی مستقیم، تولید کالوس و باززایی غیرمستقیم مدنظر قرار گرفت که با موفقیت چشمگیر همراه بود. در مجموع نتیجه‌گیری شد که برای باززایی گیاه انیسون، روش غیرمستقیم یعنی باززایی گیاه از کالوس مناسب‌تر از روش باززایی مستقیم است. دمبرگ به عنوان بهترین ریزنمونه معرفی شد. تیمار هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA توانست در ریزنمونه دمبرگ به میزان ۹۷/۲۲ درصد کالوس القا نماید، بنابراین به عنوان یک ترکیب هورمونی موفق برای کالوس‌زایی در انیسون معرفی شد. تولید شاخه و ریشه از کالوس در تیمار شاهد، نشان داد که بعد از بدست آوردن کالوس، بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توان به گیاه کامل دست پیدا کرد. نتایج این پژوهش می‌تواند در مطالعات ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک، کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه و سایر پروژه‌های مرتبط با اصلاح گیاه و پروژه‌های کشاورزی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به ارزش دارویی گیاه آنیسون، نتایج این پژوهش می‌تواند دارای کاربرد عملی باشد.

واژه‌های کلیدی: آنیسون، شاخه‌زایی، کالوس‌زایی، BA، 2,4D.

مقدمه

آنیسون یا بادیان رومی با نام علمی .Pimpinella anisum L از تیره چتریان می‌باشد. تاکنون ۱۵۰ گونه در اروپا، آسیا و آفریقا متعلق به جنس Pimpinella شناخته شده است (Ahmadian, 2012). آنیسون، بومی ایران، نواحی سواحل‌غربی دریای مدیترانه، مصر، آسیای صغیر و جزایر یونان است. در حال حاضر در ایران، مکزیک، اسپانیا، شوروی، آلمان، ترکیه، ایتالیا، بلغارستان، هند، ژاپن، چین و رومانی همه ساله سطح وسیعی از کشت را به خود اختصاص می‌دهد (Mir Haider, 2018; Ahmadian, 2012). حدود دو تا سه درصد وزن بذر آنیسون را اسانس و حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد اسانس را ماده ارزشمند ترانس آنتول تشکیل می‌دهد. اسانس همچنین دارای ترکیبات ترپنی، کاویکول، فلاونویید، اسید چرب، استرول، پروتئین، فنیل پروپانوئید و فورانوکومارین است (Davazdah Emami & Majnoun Hosseini, 2018). اثرهای فارماکولوژیکی آنیسون بیشتر مربوط به ترانس-آنتول موجود در اسانس آن است که از نظر فرمول شبیه به کاتکول آمین‌ها می‌باشد. ترانس‌آنتول در صنایع‌غذایی و دارویی، بهداشتی، عکاسی و غیره استفاده می‌شود (Romdhane & Tizaoui, 2005). به گزارش Yousefzadeh (۲۰۱۸) آنیسون در مرحله جوانه‌زنی تقریباً حساس به شوری ولی گیاه کامل تا حدی متحمل به خشکی است. بررسی پرایمینگ بذر انیسون با نیتریک اکساید بر شاخص‌های جوانه‌زنی آنیسون در شرایط شوری نشان داد که کاربرد نیتریک‌اکساید می‌تواند بر جوانه‌زنی آنیسون در شرایط شوری مؤثر باشد (Mohammadian *et al.* 2017). بررسی اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه گیاهچه آنیسون، نشان داد که پیش‌تیمار بذر آنیسون با غلظت کم کیتوزان جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را بهبود می‌بخشد (Mahdavi, 2016). همچنین پیش‌تیمار اسمزی بر شاخص‌های جوانه‌زنی آنیسون تحت تنش شوری، مشخص کرد که تنش شوری بر همه شاخص‌های جوانه‌زنی گیاه اثر منفی دارد، اما پیش‌تیمار بذر با کلرید کلسیم، مانع پیامدهای منفی شوری در گیاه می‌شود (Fathi & Hasanpour, 2018). در پژوهشی برای ضدعفونی بذر آنیسون، کلروکس ۲۰ درصد، برای ریشه‌زایی ۳ میکرومولار اسید ایندول ۳- بوتریک و برای پرآوری نیز، ۵ میکرومولار ۶- بنزیل آمین و پورین و ۱ مولار کینتین و ۰/۵ میکرومولار نفتالین استیک اسید به عنوان بهترین تیمارها گزارش شد (Amer & Omar, 2019).

استفاده از تکنیک کشت بافت نقش مهمی در تکثیر درون شیشه‌ای و اصلاح گیاهان داشته است. ازجمله مزایای این تکنیک می‌توان به قابلیت تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا، حفاظت از گیاهان در معرض خطر انقراض و قابلیت تکثیر انبوه و یکنواخت گیاهان از تعداد محدودی از پایه مادری اشاره کرد (Hasnain *et al.*, 2022; De Carlo *et al.*, 2021). از این تکنیک تاکنون برای تکثیر تعداد بسیاری از گیاهان دارویی، زراعی، زینتی و باغی استفاده شده است (Nazari *et al.*, 2020; Samiei *et al.*, 2021; Narimani *et al.*, 2022; Bansal *et al.*, 2023) باوجود اینکه گیاه

آنیسون یک گیاه ارزشمند دارویی می‌باشد، در مورد ریزازدیادی و کشت بافت این گیاه مطالعات محدودی تاکنون انجام شده است (Amer & Omar, 2019; Ghazi et al., 2019). برخی از مطالعات کشت بافت در این گیاه به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط مختلف انجام شده است (Arafa & Aly 2022).

کشت بافت گیاهان معمولاً به دو روش باززایی مستقیم و باززایی غیرمستقیم انجام می‌شود. در روش باززایی مستقیم، تولید اندام‌های گیاهی به طور مستقیم و بدون گذر از مرحله تشکیل کالوس انجام می‌گردد. از مزایای این روش، دستیابی به میزان انبوه گیاهان شبیه به پایه مادری در مدت زمان کوتاه می‌باشد (Desai et al., 2022). در زمینه باززایی مستقیم گیاه آنیسون، از جوانه‌های جانبی و جوانه‌های انتهایی گیاهچه‌های کشت بافتی در حضور تنظیم کننده‌های رشد مختلف استفاده شده است و هر دو نوع ریزنمونه به عنوان ریزنمونه‌های مناسب برای پرآوری این گیاه معرفی شده است (Amer & Omar, 2019). هرچند که به‌دلیل محدودیت تحقیقات انجام شده، نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه بسیار ضروریست.

در روش باززایی غیرمستقیم گیاهان، ریزنمونه‌ها ابتدا وادار به تولید کالوس می‌شوند و بعد اندام‌زایی و تولید گیاهچه از کالوس انجام می‌شود. بهینه‌سازی دستورالعمل‌های باززایی غیرمستقیم گیاهان منجر به تسهیل تکثیر درون شیشه‌ای، تولید جنین سوماتیکی، تولید متابولیت‌های ثانویه و روش‌های انتقال ژن به گیاهان می‌شود (Desai *et al.*, 2022; Long *et al.*, 2022). در گیاه آنیسون مطالعات در زمینه تولید ریزنمونه به روش باززایی غیرمستقیم نیز بسیار محدود است. Sobhanverdi و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی از برگ، هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل گیاه، به منظور القای کالوس و بعد باززایی از کالوس در گیاه آنیسون استفاده کردند و نشان دادند که محیط‌های حاوی بنزیل آمینوپورین در ترکیب با ایندول استیک اسید برای القاء کالوس در این ریزنمونه‌ها مؤثر هستند (Sobhanverdi *et al.*, 2013). با توجه به اینکه مطالعات بسیار محدودی در زمینه تولید درون شیشه‌ای گیاه آنیسون تا کنون انجام شده است، نیاز به انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. ازاین‌رو، این تحقیق با هدف بررسی قابلیت باززایی مستقیم و غیرمستقیم گیاه آنیسون در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در مطالعات ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک، کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه و سایر پروژه‌های مرتبط با اصلاح این گیاه و پروژه‌های کشاورزی مولکولی استفاده شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بهینه‌سازی اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه *P. anisum* L. در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. گیاه توسط کارشناسان پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، با کد هرباریومی 47884 (FUMH) شناسایی شد. ابتدا یک مجموعه آزمایش‌های مقدماتی به منظور بررسی شرایط مناسب جوانه‌زنی و ضدعفونی انجام و در ادامه آزمایش‌های اصلی انجام شد.

جوانه‌زنی بذرهای آنیسون

روش‌های مختلفی برای جوانه‌زنی بهتر بذرها بررسی شد. در روش اول، بذرها بعد از ۲۴ ساعت خیس شدن در آب، به داخل ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. در روش دوم، بذرها پس از ۲۴ ساعت خیس شدن، با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و پس از سه بار آبشویی با آب مقطر استریل در زیر هود لومینار، کشت شدند. در این روش دو پتری‌دیش در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد (یخچال) و سه پتری‌دیش در دمای اتاق گذاشته شد. در همه روش‌ها هر ۱۰ بذر در یک پتری‌دیش و برای هر تیمار پنج پتری‌دیش در نظر گرفته شد.

بررسی اثر روش ضدعفونی بر جوانه‌زنی بذرهای آنیسون

برای ضدعفونی کردن بذرها از تیمارهای T1): ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و بعد ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد، T2): ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و بعد ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد، T3): ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و بعد چهار دقیقه در کلریدجیوه ۰/۱ درصد، T4): ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و

بعد ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و کشت در محیط کشت ۱/۲MS دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و T5): ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد، چهار دقیقه در کلریدجیوه ۰/۱ درصد، سه بار شستشو با آب مقطر استریل و کشت در محیط کشت MS ۱/۲ دارای آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد.

در تمام تیمارها، بعد از انجام ضدعفونی سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل انجام شد. سپس بذرها در پتری‌دیش‌های دارای محیط ۱/۲MS کشت شده و به اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. برای هر تیمار دو پتری‌دیش و برای هر یک ۱۰ بذر در نظر گرفته شد.

باززایی مستقیم با استفاده از ریزنمونه جوانه هیپوکوتیل و غلظت‌های مختلف BA، Kin و NAA

در این آزمایش از ریزنمونه جوانه هیپوکوتیل گیاهچه‌های حاصل از بذر برای ارزیابی باززایی مستقیم استفاده شد. تیمارهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

تعیین بهترین ریزنمونه برای کالوس‌دهی با غلظت‌های مختلف 2,4-D

در این مرحله تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D (شاهد، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) روی کالوس‌دهی ریزنمونه‌های ریشه، هیپوکوتیل، برگ‌لپه‌ای، گره، دمبرگ و برگ معمولی بررسی شد. برای هر تیمار سه عدد پتری‌دیش و برای هریک چهار ریزنمونه در نظر گرفته شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف BAو2,4-D روی کالوس‌دهی ریزنمونه‌های منتخب

در این مرحله، با توجه به نتایج مرحله قبلی، ریزنمونه‌ها با نتیجه بهتر یعنی دمبرگ و ریشه در معرض دامنه محدودتری از غلظت‌های 2,4-D (۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند. در این آزمایش در نیمی از تیمارها، از هورمون BA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به همراه 2,4-D استفاده شد (جدول ۲).

باززایی گیاه از کالوس با استفاده از غلظت‌های مختلف BA و NAA

به منظور باززایی از کالوس، کالوس‌های به‌دست‌آمده از آزمایش قبلی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف BA و NAA قرار گرفتند (جدول ۲). از هر تیمار سه پتری‌دیش و در هریک ۱۰ ریزنمونه کالوس قرار داده شد و نتایج نهایی بعد از یک ماه بررسی گردید.

سازگاری و انتقال به گلخانه

تعدادی از شاخه‌های ریشه‌دار شده برای سازگاری به گلدان‌های حاوی پیت‌ماس منتقل شدند (Darroudi *et al*. 2017). ابتدا روی گیاهچه کیسه پلاستیکی گذاشته شد و بعد گوشه‌های آن برش داده شد تا اینکه به تدریج پس از یک هفته پلاستیک از روی گیاه برداشته شد و گیاه در گلخانه به رشد خود ادامه داد.

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار Minitab 16 و مقایسه میانگین تیمارها نیز با آزمون توکی انجام شد. نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم شدند. تبدیل داده‌های درصدی با استفاده از فرمول ArcSin Sqrt (x/100)) انجام شد.

جدول ۱- ترکیب هورمونی به‌کاررفته برای باززایی مستقیم

Table 1. Employed hormonal composition for direct regeneration

Treatments	BA[1](mg/l)	Kin[2] (mg/l)	NAA[3] (mg/l)	Treatments	BA (mg/l)	Kin (mg/l)	NAA (mg/l)
T_1	0	0	0	T_{11}	0.5	0	1
T_2	0.5	0	0.5	T_{12}	1	0	1
T_3	1	0.50	0.5	T_{13}	2	0	1
T_4	2	0	0.5	T_{14}	0	0.5	1
T_5	0	0.5	0.5	T_{15}	0	1	1
T_6	0	1	0.5	T_{16}	0	2	1
T_7	0	2	0.5	T_{17}	0.25	0.25	1
T_8	0.25	0.25	0.5	T_{18}	0.5	0.5	1
T_9	0.5	0.5	0.5	T_{19}	1	1	1
T_{10}	1	1	0.5				

BA (benzyl adenine)

Kin(kinetin)

NAA(1-Naphthaleneacetic acid)

جدول ۲- غلظت ترکیبات NAA و BA (نام کامل در جدول ۱) برای باززایی از کالوس و غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA برای القای کالوس در ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه

Table 2. Concentrations of NAA and BA for organogenesis from callus and Concentrations of 2, 4-D and BA for callus induction in petiole and root explants

Treatments	Organogenesis from callus		Treatments	Callus induction in petiole and root explants	
	BA (mg/l)	NAA (mg/l)		2,4-D[1] (mg/l)	BA (mg/l)
T1	0	0	T1	0.25	0
T2	0.5	0	T2	0.50	0
T3	1	0	T3	0.75	0
T4		0.25	T4	0.25	0.5
T5	0	0.5	T5	0.50	0.5
T6	0	1	T6	0.75	0.5
T7	0.5	0.25			
T8	1	0.5			
T9	1	1			

2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

نتایج

جوانه‌زنی بذرها

همه بذرهای داخل ژرمیناتور بعد از گذشت ۷ تا ۹ روز سبز شده و دارای ریشه‌چه و برگ شدند. بذرهای داخل اتاق نسبت به ژرمیناتور بهتر سبز کردند. بهترین جوانه‌زنی مربوط به بذرهایی بود که پس از ۲۴ ساعت خیس شدن، در محیط کشت 1/2MS و دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. در آزمایش‌های جوانه‌زنی به دلیل تعداد نابرابر بذر در تیمارها و تعداد نمونه نسبتاً کم به دلیل آلودگی بعضی از تکرارها، آنالیز واریانس انجام نشد.

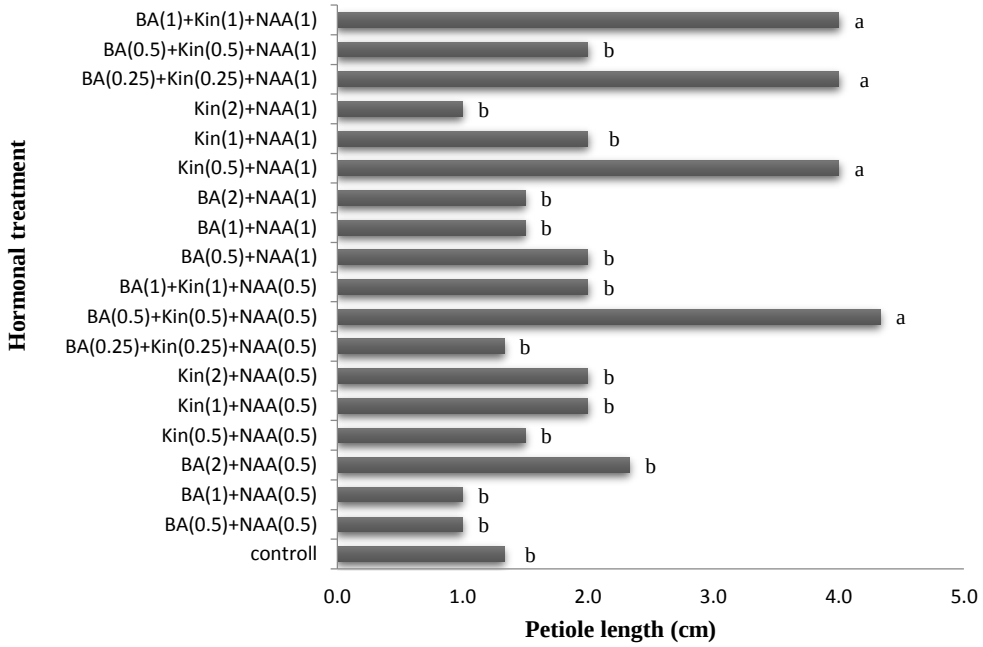
با توجه به مشاهده آلودگی باکتریایی در پتری‌دیش‌های حاوی بذرها در اتاقک رشد، پنج روش ضدعفونی T1 تا T5 مطابق آنچه در قسمت مواد و روش گفته شده، اعمال شد. تمام تیمارهای ضدعفونی به خوبی توانست ۱۰۰٪ آلودگی را کنترل

نماید. اما برخی از تیمارها قوه نامیه بذرها را کاهش داده و مانع جوانه‌زنی بذرها شد. کاربرد کلریدجیوه برای ضدعفونی بذرها به شدت باعث از بین رفتن قوه‌نامیه و جوانه‌زنی شد، به‌طوری‌که در تیمارهای حاوی کلریدجیوه هیچ‌گونه جوانه‌زنی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد آنتی‌بیوتیک هم اثر ممانعت-کنندگی روی جوانه‌زنی داشته و قوه‌نامیه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ازاین‌رو، تیمار با کمترین غلظت هیپوکلریت‌سدیم یعنی ۱/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه بدون آنتی‌بیوتیک مناسب‌ترین روش برای ضدعفونی سطحی در نظر گرفته شد. در این تیمار جوانه‌زنی بذرها به میزان ۷۰ درصد انجام شد.

باززایی مستقیم با استفاده از ریزنمونه جوانه هیپوکوتیل و غلظت‌های مختلف BA، Kin و NAA

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف BA، Kin و NAA تأثیر معنی‌داری بر طول دمبرگ (F=12.93**) و تعداد برگ‌های تولید شده (F=1350**) در گیاه آنیسون داشتند.

نتایج مقایسه میانگین نشان‌داد که بهترین پاسخ باززایی مستقیم از نظر طول دمبرگ مربوط به تیمار۹ (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه ۰/۵ میلی-گرم بر لیتر NAA) با ۴/۳۳ سانتی‌متر، تیمار۱۴ (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) با ۴ سانتی‌متر، ۱۷ (۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) با ۴ سانتی‌متر و تیمار۱۹ (یک میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) با ۴ سانتی‌متر است. این تیمارها در گروه a قرار گرفتند (شکل ۱).

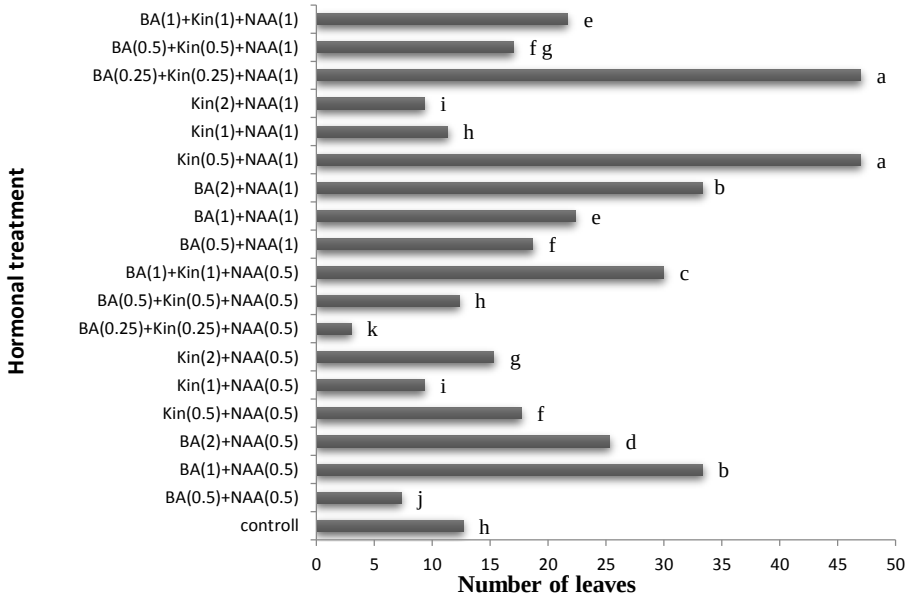


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف kin, NAA, BA بر طول دمبرگ

میانگین تیمارهای دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 1- The effect of concentrations of BA, NAA, and kin on petiole length.
Means of the treatments with the same letters are not significantly different (Tukey test p≤ 0.05).

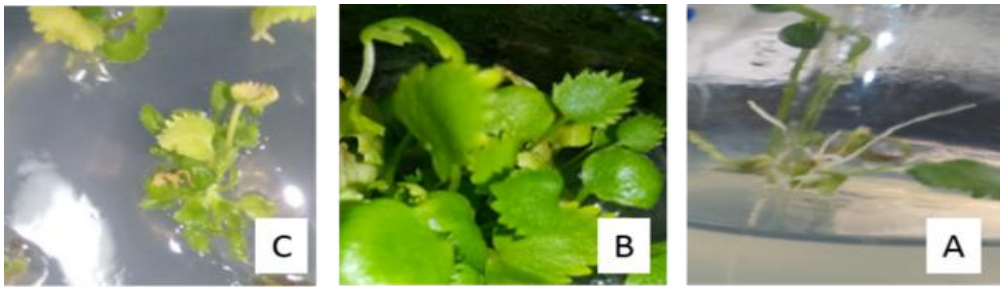
بیشترین تعداد برگ در تیمارهای ۱۴ (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک گرم بر لیتر NAA) و ۱۷ (۰/۲۵ میلی-گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) با ۴۷ عدد برگ بدست آمد (شکل ۲). نمونه‌هایی از برگ‌های حاصل از باززایی مستقیم در شکل ۳B آمده است. در این آزمایش در تیمارهای شاهد پنج (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه ۰/۵ گرم بر لیتر NAA)، شش (یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه ۰/۵ گرم بر لیتر NAA)، ۱۵ (یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک گرم بر لیتر NAA) و ۱۷ (۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA) علاوه بر برگ، ریشه‌های سفید و نازک هم تشکیل شد (شکل ۳A). اندازه برگ‌ها در تیمارهای مختلف متفاوت بود. در تیمارهای دارای Kin با سطح‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و تیمار دارای یک میلی‌گرم بر لیتر BA در ترکیب با یک میلی‌گرم بر لیتر Kin در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA برگ‌های کوچکتر(شکل ۳C) و تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر BA به‌اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA برگ‌های بزرگتر (شکل ۳B) نسبت به دیگر تیمارها تولید شد. در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به‌اضافه ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin به‌اضافه یک میلی‌گرم بر لیتر NAA، دمبرگ‌های قوی و با ضخامت بیشتر نسبت به سایر تیمارها تولید شد.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف BA، NAA و kin بر تعداد برگ

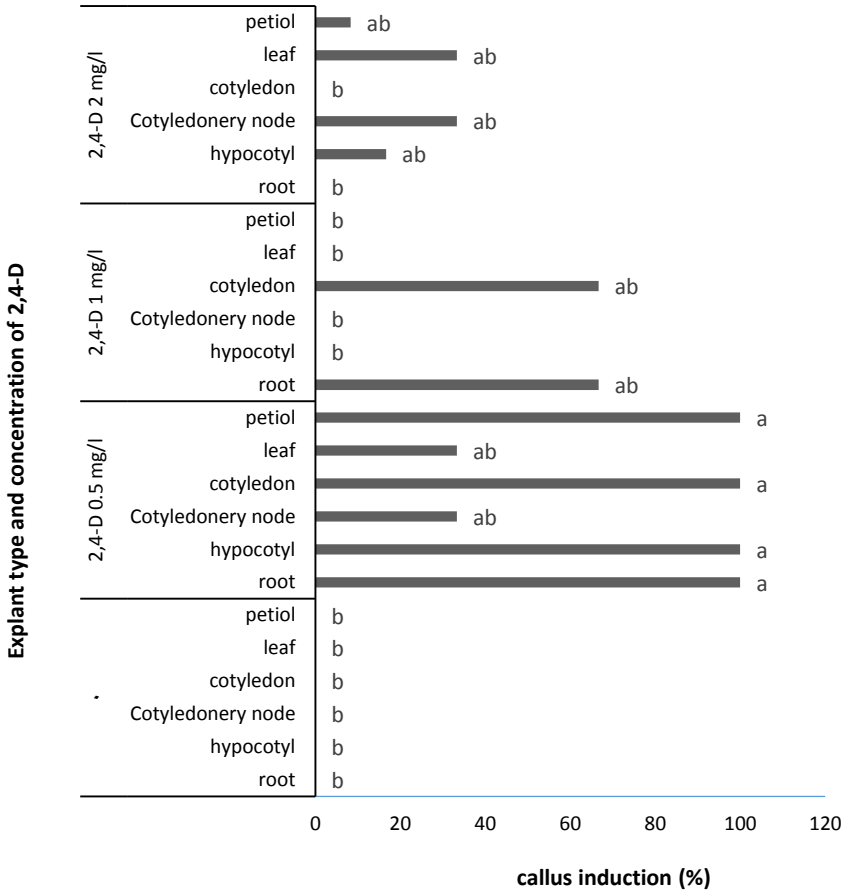
میانگین تیمارهای دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 2- The effect of different concentrations of BA, NAA, kin on the number of leaves. Means of the treatments with the same letters are not significantly different (Tukey test p≤ 0.05).



شکل ۳- باززایی مستقیم جوانه؛ **A**) تولید ریشه، **B**) نمونه با برگ درشت و**C**) نمونه با برگ ریز

Figure 3. Direct regeneration of the bud A) Root production, B) Sample with large leaves and C) Sample with small leaves.



شکل ۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف **2,4-D** و نوع ریزنمونه بر درصد القاء کالوس در گیاه آنیسون

میانگین تیمارهای دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

Figure 4- Effect of 2, 4-D concentrations and Explant type on callus induction percentage in anise plant. The means of the treatments with the same letters are not significantly different (Tukey test p≤ 0.05).

تعیین بهترین ریزنمونه برای کالوس‌دهی با غلظت‌های مختلف 2,4-D

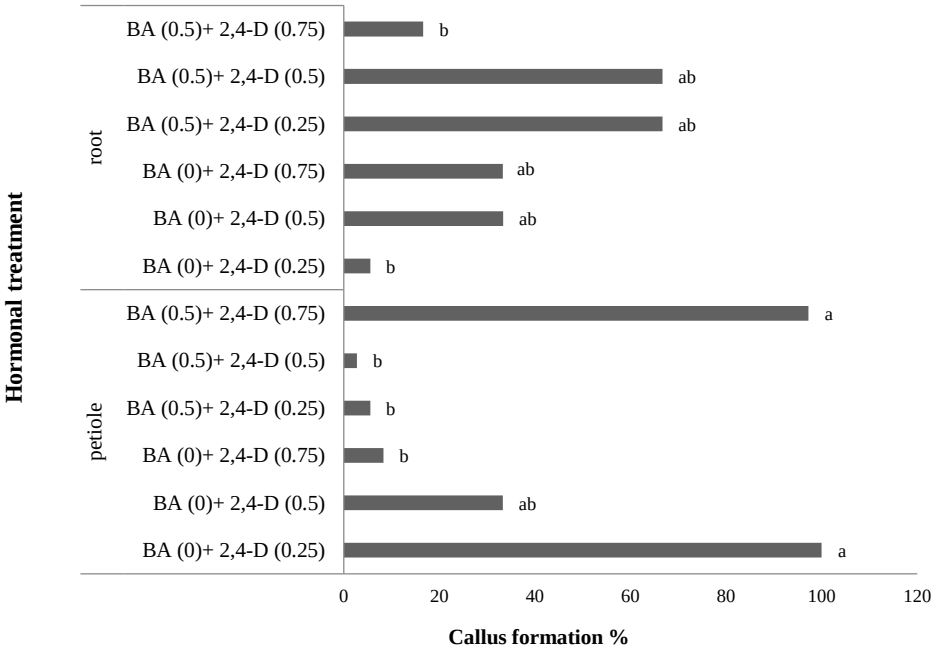
تجزیه واریانس فاکتوریلی ۵ ریزنمونه (ریشه، هیپوکوتیل، برگ لپه‌ای، گره، دمبرگ و برگ معمولی) با ۴ غلظت 2,4-D (شاهد، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) نشان داد که نوع ریزنمونه در تولید کالوس تأثیر معنی‌داری نداشت ولی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D در سطح احتمال ۱ درصد در تولید کالوس ریزنمونه‌های مختلف معنی‌دار بود ($F=23.38^{**}$). البته اثر متقابل غلظت 2,4-D در نوع ریزنمونه در سطح احتمال ۵ درصد در تولید کالوس معنی‌دار شد ($F=2.37^{**}$).

اگرچه از نظر آماری تفاوتی بین انواع ریزنمونه در القای کالوس مشاهده نشد، اما از آنجایی که ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ به‌لحاظ کیفیت، کالوس‌های بهتری تولید کردند، این دو ریزنمونه برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شدند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر 2,4-D در بیشتر ریزنمونه‌ها باعث کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد شد (شکل ۴).

بررسی القای کالوس در ریزنمونه‌های دمبرگ و ریشه با استفاده از غلظت‌های مختلف BA و2,4-D

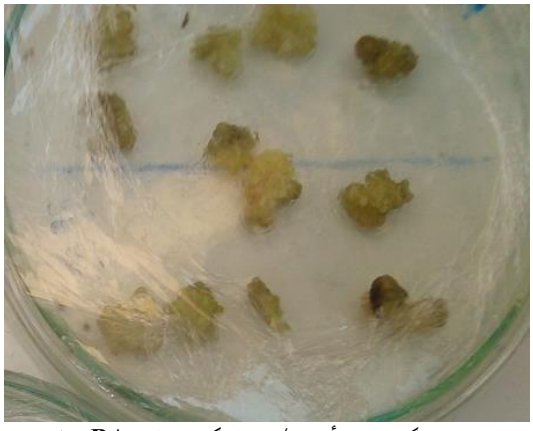
نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BA و 2,4-D در القای کالوس در ریزنمونه ریشه و دمبرگ در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری داشت ($F=3.25^{**}$).

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که ریزنمونه دمبرگ بیشترین کالوس‌زایی را به میزان ۱۰۰ درصد در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D داشت. البته با توجه به تولید اندک ریشه همراه کالوس در این تیمار، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به اضافه ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ۹۷/۲۲ درصد کالوس‌زایی به عنوان بهترین تیمار کالوس‌زایی در نظر گرفته شد (شکل ۵). کالوس تولید شده از ریزنمونه دمبرگ در شکل ۶ مشاهده می‌شود.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف BA و 2,4-D بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ در گیاه آنیسون
میانگین تیمارهای دارای حروف مشترک بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 5- The effect of BA and 2,4D concentrations on the callus formation on root and petiole explants in anise.
The means of the treatments with the same letters are not significantly different (Tukey test p≤ 0.05).

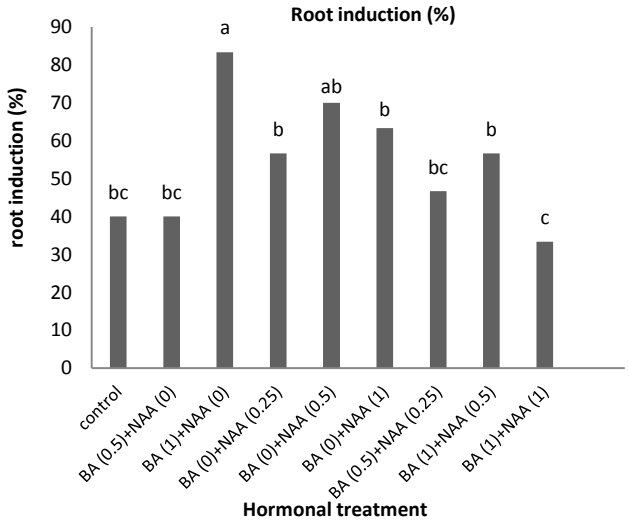


شکل ۶- کالوس تولید شده از ریزنمونه دمبرگ تحت تأثیر ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر **BA** به اضافه ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر **2,4-D**

Figure 6-Callus produced from petiole explant under the influence of 0.5 mg/L BA plus 0.75 mg/L 2, 4-D

باززایی کالوس در تولید ریشه با استفاده از غلظت‌های مختلف BA و NAA

تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA در باززایی کالوس در تولید ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود ($F=6.2^{**}$). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه از کالوس با میزان ۸۳/۳۳ درصد مربوط به تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر BA بود (شکل ۷). نمونه ریشه تولید شده از کالوس در شکل ۸ آمده است.



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف **BA** و **NAA** روی القای ریشه در کالوس حروف متفاوت در هر ستون نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است

Figure 7- The effect of different concentrations of BA and NAA on root induction in callus. Means with the same letters are not significantly different (p< 0.05)

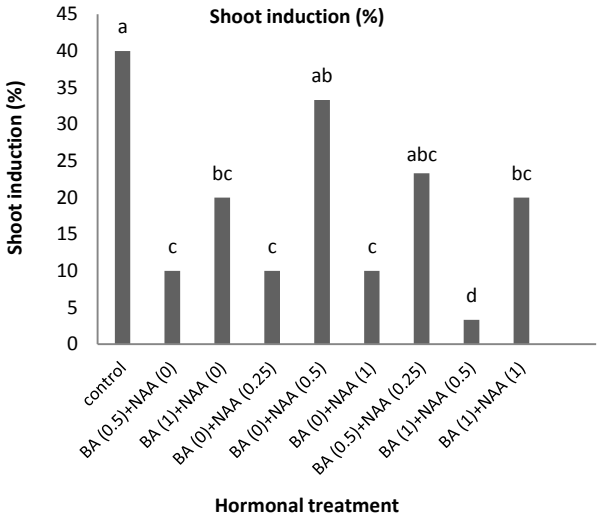
شکل ۸- نمونه ریشه تولید شده از کالوس

Figure 8. Root sample produced from callus.

باززایی کالوس در تولید شاخساره با استفاده از غلظت‌های مختلف BA و NAA

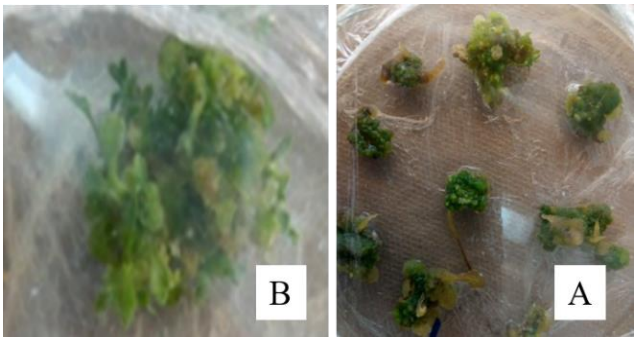
تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA در باززایی کالوس در تولید شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود ($F=19.4^{**}$). بهترین غلظت هورمونی برای تولید شاخساره از کالوس‌های آنیسون در تیمار شاهد (بدون هورمون) بدست آمد (شکل ۹). نمونه شاخساره تولید شده از کالوس در تیمار شاهد در شکل ۱۰ دیده می‌شود.

بعضی از شاخساره‌های تیمار شاهد در محیط کشت بدون هورمون ریشه‌دار شده و به مرحله سازگاری راه یافتند (شکل ۱۱). گیاهچه حاصل از باززایی پس از مرحله سازگاری در گلخانه در شکل ۱۲ آمده است.



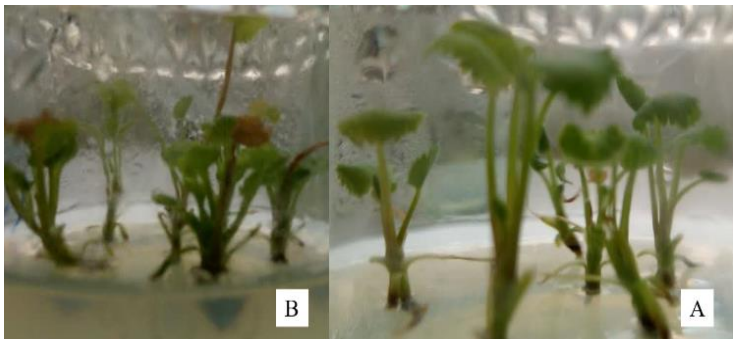
شکل ۹- اثر غلظت‌های مختلف **BA** و **NAA** روی القای شاخساره از کالوس حروف متفاوت در هر ستون نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است

Figure 9- The effect of different concentrations of BA and NAA on shoot induction in callus. Means with the same letters are not significantly different (p< 0.05)



شکل ۱۰- **A**) نمونه کالوس‌های تولیدکننده شاخساره، **B**) شاخساره تولید شده از کالوس در تیمار شاهد

Figure 10- Shoot produced from callus in the control treatment .



شکل ۱۱- شاخه‌های توسعه یافته و ریشه‌دار شده

Figure 11. Branches developed and sometimes rooted.

شکل ۱۲- گیاه سازگار شده در گلخانه

Figure 12. Adapted plant in the greenhouse.

بحث

بهترین درصد جوانه‌زنی به میزان ۷۰ درصد در بذرهایی بدست آمد که پس از ۲۴ ساعت در آب خیس شدن، در محیط کشت 1/2MS و دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شده بودند. استفاده از کلرید جیوه و آنتی‌بیوتیک برای ضدعفونی، قوه نامیه بذرها را به شدت کاهش داده و اثر بازدارندگی روی جوانه‌زنی داشت. کلرید جیوه یک ترکیب سمی است که معمولاً برای ضدعفونی سطحی بافت‌های گیاهی و کاهش آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. در آزمایش‌های کشت بافت غلظت کلرید جیوه باید به گونه‌ای باشد که همچنان که آلودگیهای قارچی و باکتریایی را از بین می‌برد، به بافت‌های گیاهی آسیب نزند (Antony et al., 2015, Bhat et al. 2022). در این آزمایش اگرچه از غلظت نسبتاً پایینی از کلرید جیوه استفاده شد، اما کاهش قوه نامیه بذر انیسون نشان داد که احتمالاً این غلظت، یا مدت در معرض قرارگیری بذرها آسیب‌زا بوده است. ازاین‌رو، در آزمایش‌های آینده بهتر است از کلرید جیوه استفاده نشود، یا از غلظت‌های پایین‌تر و مدت زمان کوتاه‌تر برای ضدعفونی گیاه آنیسون استفاده شود.

غلظت ۱/۵ درصد هیپوکلریت‌سدیم به مدت ۱۵ دقیقه بدون آنتی‌بیوتیک، مناسب‌ترین روش برای ضدعفونی سطحی بذرهای آنیسون در نظر گرفته شد. در تحقیقات گذشته استفاده از هیپوکلریت‌سدیم با غلظت ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه برای ضدعفونی آنیسون مناسب تشخیص داده شد (Amer & Omar, 2019). هیپوکلریت سدیم یک ماده شیمیایی مؤثر برای ضدعفونی گیاهان در مطالعات کشت بافتی است. این ماده یک ضدعفونی کننده در دسترس است که برای از بین بردن طیف وسیعی از قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها مؤثر است. به دلیل اینکه این ماده در غلظت‌های پایین نیز مؤثر است، آسیب کمتری نیز به بافت‌های گیاهی می‌رساند (Yildiz *et al*., 2012: Mukherjee *et al*. 2021). ازاین‌رو، با توجه به نتایج این تحقیق، استفاده از هیپوکلریت سدیم برای ضدعفونی بذرهای گیاه آنیسون در مقایسه با کلرید جیوه که سمیت بالایی دارد و نگرانی‌های زیست محیطی بسیاری که در مورد استفاده از آن وجود دارد، توصیه می‌شود. در بسیاری از تحقیقات گذشته، استفاده از هیپوکلریت سدیم برای ضدعفونی تعداد بسیاری از گیاهان مؤثر بوده است (Zaker Tavallaie *et al*. 2019 & Momeni *et al*. 2018).

در مرحله باززایی مستقیم اگرچه ساقه تشکیل نشد، اما بیشترین طول دمبرگ در تیمار ۹ و بیشترین تعداد برگ در تیمارهای ۱۴ و ۱۷ بدست آمد. Amer و Omar (۲۰۱۹) بهترین نتیجه باززایی مستقیم در انیسون را با تیمار ۵ میکرومولار BA به‌اضافه یک میکرومولار Kin به‌اضافه ۰/۵ میکرومولار NAA بدست آوردند. در مطالعه‌ای روی باززایی گیاه *Pimpinella candolleana*، GA3 و BA برای افزایش طول دمبرگ‌ها پیشنهاد شد. این پژوهشگران گزارش کردند که سیتوکنین‌ها می‌توانند در افزایش طول دمبرگ در گیاه آنیسون اثرگذار باشند (Srilakshmi & Gayatri, 2014).

در مطالعات باززایی مستقیم، به طور معمول از جوانه گیاه استفاده می‌شود که معمولاً پس از کشت در محیط‌های حاوی نسبت بالاتری از سیتوکینین، از محل جوانه، پرآوری شاخساره انجام می‌شود. در این تحقیق پس از قراردادن جوانه هیپوکوتیل در محیط‌های حاوی سیتوکینین، با وجود انتظار، شاخساره‌ای از محل جوانه پرآوری نشد و فقط تعداد زیادی برگ تولید شد که امکان ادامه فرایند پرآوری و بعد ریشه‌زایی این گیاه را غیرممکن می‌کرد. دلیل این موضوع، احتمالاً می‌تواند به ساختار مورفولوژیکی طبیعی این گیاه مرتبط باشد. اگرچه در این آزمایش نتیجه معینی نداشت، امکان دارد این نتیجه به دلیل استفاده از هیپوکوتیل از نمونه‌های کشت بافتی باشد که ممکن است با استفاده از جوانه‌های جانبی روی گیاه در شرایط برون شیشه‌ای مرتفع شود. هر چند اعلام نتیجه قاطع نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

به دلیل عدم تشکیل ساقه در باززایی مستقیم، در ادامه کار، کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم در دستورکار قرار گرفت که با موفقیت همراه بود. در آزمون کالوس‌زایی، اگرچه به لحاظ آماری بین ریزنمونه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما کیفیت و نوع کالوس در تیمارهای مختلف متفاوت بود. با توجه به برتری کیفیت کالوس‌های تولید شده از ریشه و دمبرگ، این دو نوع ریزنمونه برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شدند. در نهایت ریزنمونه دمبرگ به عنوان بهترین ریزنمونه برای انجام باززایی غیرمستقیم معرفی شد. Zaker Tavallaie و همکاران (۲۰۱۹) ریزنمونه ریشه را به عنوان بهترین ریزنمونه در *Astragalus verus* برای تولید کالوس معرفی کردند. در پژوهش Sobhanverdi و همکاران (۲۰۱۳)، در گیاه انیسون، ریزنمونه‌های محور بالای لپه و محور زیر لپه موفق‌تر از سایر ریزنمونه‌های مورد استفاده بودند. در تحقیقی Sadatnoori و همکاران (۲۰۱۳) نیز هیپوکوتیل را به عنوان بهترین ریزنمونه برای تولید جنین سوماتیکی در زیره سیاه *Bunium persicum* معرفی کردند. Khatibzadeh و همکاران (۲۰۱۳) در گیاه انجدان رومی *Levisticum officinale* بهترین کالوس‌زایی را در ریزنمونه هیپوکوتیل و ریشه مشاهده کردند. در مطالعه Fazeli-Nasab و Fooladvand (۲۰۱۷) روی باززایی آنیسون بیشترین کالوس‌زایی مربوط به ریشه بود.

در این پژوهش بهترین کالوس‌زایی به میزان ۹۷/۲۲ درصد در تیمار دارای ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA در ریزنمونه دمبرگ مشاهده شد. در مطالعه Zaker Tavallaie و همکاران (۲۰۱۹) در *Astragalus verus*، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین کالوس‌زایی را در پی داشت. Sadatnoori و همکاران (۲۰۱۳) بیشترین کالوس‌زایی در زیره سیاه را با تیمار دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌اضافه یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم بر لیتر NAAمشاهده کردند. در مطالعه Khatibzadeh و همکاران (۲۰۱۳) در گیاه انجدان رومی بهترین کالوس‌زایی تحت تأثیر ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA به دست آمد. در مطالعه Fazeli-Nasab و Fooladvand (۲۰۱۷) روی گیاه آنیسون، بیشترین کالوس‌زایی با تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بدست آمد. مطالعه پژوهش‌های مربوط به کالوس‌زایی نشان داد که بیشترین موفقیت تولید کالوس از ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر NAA و 2,4-D به‌دست آمده است (Zaker Tavallaie *et al.* 2019; Sadatnoori *et al*., 2013; Khatibzadeh *et al.*, 2013 and Fazeli-Nasab & Fooladvand, 2017). در این مطالعه بیشترین درصد القای ریشه از کالوس با میزان ۸۳/۳۳ درصد مربوط به تیمار یک میلی‌گرم بر لیتر BA بود و بیشترین تولید شاخساره از کالوس‌های آنیسون در تیمار شاهد (بدون هورمون) مشاهده شد. در مطالعه Sadatnoori و همکاران (۲۰۱۳) در مورد زیره سیاه، بهترین باززایی جنین از کالوس، مربوط به تیمار دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2iP | N6-(2-Isopentenyl) adenine به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA (ndole-3-butyric acid)بود (Sadatnoori *et al.*, 2013)

در این مطالعه کالوس‌های قرار داده شده در تیمار شاهد بیشترین شاخه‌زایی را نشان دادند. همچنین بعضی از شاخساره‌های حاصل از همین تیمار در محیط کشت بدون هورمون ریشه تولید کرده و به مرحله سازگاری رسیدند.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که برای باززایی گیاه انیسون با هر هدف اصلاحی، روش غیرمستقیم یعنی باززایی گیاه از کالوس مناسب‌تر از روش باززایی مستقیم است. همچنین دمبرگ می‌تواند گزینه مناسبی به عنوان ریزنمونه اولیه باشد. ماده ارزان و در دسترس درصد هیپوکلریت‌سدیم با غلظت کم به خوبی می‌تواند آلودگی‌زدایی از بذرها را انجام دهد. تیمار

هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی-گرم بر لیتر BA به میزان ۹۷/۲۲ درصد توانست در ریزنمونه-ها کالوس القا نماید، ازاین‌رو به عنوان یک ترکیب هورمونی موفق برای کالوس‌زایی در انیسون معرفی شد. تولید شاخه و ریشه از کالوس در تیمار شاهد، نشان داد که بعد از بدست آوردن کالوس، بدون استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌توان به گیاه کامل دست یافت. البته، ترکیب پیت‌ماس بستری نسبتاً مناسب برای سازگاری و رشد و نمو گیاهچه‌های باززا شده بود. یادآوری می‌شود که تعداد محدودی از شاخه‌ها ریشه‌دار شده و به مرحله سازگاری و گیاه کامل رسیدند. نتایج این پژوهش می‌تواند در مطالعات ریزازدیادی، مهندسی ژنتیک، کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه و سایر پروژه‌های مرتبط با اصلاح گیاه انیسون و پروژه‌های مولکولی مورد استفاده قرار گیرد و دارای کاربرد عملی باشد.

References

– Ahmadian, A., 2012. Important Medicinal Plants of Iran (Vol. 1- Shrub Plants). Publications of Torbat Heydarieh University, Iran 408p. (In Persian).

– Amer A. and Omar H. 2019. *In vitro* propagation of the multipurpose Egyptian medicinal plant *Pimpinella anisum*. Egyptian Pharmaceutical Journal, 18(3):254-262.

– Antony, T., Anees, P. V. M., Kumar, V., Sangamithra, D., Philip, T. and Santhoshkumar, A. V. 2015. Application of mercuric chloride and charcoal in micro-propagation of teak (*Tectona grandis).* Indian Journal of Tropical Biodiversity, 23(2): 157-166.

– Arafa, N. M. and Aly, U. I. 2022. Induced biosynthesis of acephenanthrylene in callus culture of *Pimpinella anisum* L., by yeast and phenylalanine application. Egyptian Journal of Chemistry, 65(12): 327 – 335

– Bansal, S., Sharma, M. K., Joshi, P., Malhotra, E. V., and Malik, S. K. 2023. Meta-topolin mediated enhanced *in vitro* propagation and genetic integrity assessment in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam). South African Journal of Botany, 157: 27-36.

– Bhat, M. S., Rather, Z. A., Nazki, I. T., Banday, N., Wani, T., Rafiq, S., and Darwish, H. 2022. Standardization of *in vitro* micropropagation of Winter Jasmine (*Jasminum nudiflorum*) using nodal explants. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(5): 3425-3431.

– Davazdah emami, S. and Majnoun Hosseini, N., 2018. Cultivation and production of some medicinal and spice plants. Tehran University Publication, Tehran, Iran. 320 pages. (In Persian).

– Darroudi H, Akbari Nia M., Safar Nejad A., Hosseini S.M. And Hajian Shahri M. 2017. Acclimatization of tissue cultured plantlets *Ribes khorasanicum* as an endemic endanger species in different substrates. Plant Research Journal (Iranian Biology Journal). 30(2), 346-356. (In Persian).

– De Carlo, A., Tarraf, W., Lambardi, M., and Benelli, C. 2021.Temporary immersion system for production of biomass and bioactive compounds from medicinal plants. Agronomy, 11(12), 2414.

– Desai, P., Desai, S., Rafaliya, R., and Patil, G. 2022. Plant tissue culture: Somatic embryogenesis and organogenesis. In Advances in Plant Tissue Culture (pp. 109-130). Academic Press.

– Fathi, Sh. and Hasanpour, M., 2018. The effect of osmotic pretreatment on germination indicators of anise medicinal plant under salt stress. Seed Research, 9(32), 45-55. (In Persian).

– Fazeli-Nasab, B. and Fooladvand Z., 2017. The effects of plant growth regulators and explants on callus induction in Ajowan. The journal of Molecular and cellular researches. Iranian Biology Journal, 32(1): 63-75. (In Persian).

– Ghazi, A., Ghani, F. H., and Mohsin, N. M. 2019. *In Vitro* Regeneration of *Pimpinella Anisum* L. Using Different Plant Growth Regulators. Iraqi Journal of Science, 60(4), 715-723.

– Hasnain, A., Naqvi, S. A. H., Ayesha, S. I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S. and Abdelhamid, M. 2022. Plants *in vitro* propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. Frontiers in Plant Science, 13, 1009395.

– Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H. and Farsi, M., 2013. Effect of explants types and levels of plant growth substances on callogenesis in *Levisticum officinale* Koch. on a modified MS medium. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(2): 387-397. (In Persian).

– Long, Y., Yang, Y., Pan, G., and Shen, Y. 2022. New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. Frontiers in plant science, 13: 926752.

– Mahdavi, B., 2016. Effects of Priming Treatments on

of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. Journal of chemical technology and Biotechnology, 80: 759-766.
- Samiei, L., Davoudi Pahnehkolayi, M., Tehranifar, A., and Karimian, Z. 2021. Organic and inorganic elicitors enhance *in vitro* regeneration of *Rosa canina*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19, 1-7.
- Sadatnoori, S.A., Mortazavian, S.M.M., Ghamari Zare, A., Omidi M. and Hoori M. 2013. Evaluation of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Black Cumin (*Bunium persicum* Boiss). Journal of Agricultural Biotechnology, 5(2): 69-86. (In Persian).
- Sobhanverdi, T. , Chopani, A. and Fatovat, R., 2013, investigating the effect of different hormonal compounds and the type of explant on callus formation and regeneration of the medicinal plant anise (*Pimpinella anisum* L.), the second national conference of medicinal plants and sustainable agriculture, Hamadan. (In Persian).
- Srilakshmi, A. and Gayatri, M.C., 2014. Micropropagation of *Pimpinella candolleana* wight & ARN. An endemic medicinal herb from South India. International Journal of Pharma and Biosciences, 5(4): 253-259.
- Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T Kahramanogullari, C., and Tuna, E. 2012. The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the Tissue. The Natural Products Journal, 2(4), 328-331.
- Yousefzadeh, S., 2018. The response of anise medicinal plant to the effect of salinity and drought stress in the germination stage, the third national biology conference of Payame Noor University, Sari, Iran. (In Persian).
- Zaker Tavallaie, F., Ebrahimi, S., Zare Mehrjerdi, M. and Ghorbanzadeh Neghab, M., 2019. Investigating the effect of explant type and hormonal composition on *Astragalus verus* callogenesis, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 28(1): 102-114. (In Persian)

Germination and Seedling Growth of Anise (*Pimpinella anisum* L.). Agriculture Science Developments, 5(3): 28-32.
- Mir Haider, H., 2018. Herbal education, the use of plants in the prevention and treatment of diseases, Islamic culture publishing office, Tehran. Iran (Vol.2). 536p. (In Persian).
- Momeni, A., Zaker Tavallaie, F., Shokoohifar, F. and Kheirkhah, M., 2018. Optimization of regeneration in Mountain Ziziphora (*Ziziphora clinopodioides* Lam). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 27(1): 143-151. (In Persian).
- Mohammadian, A., Barzin, G., Atai Samagh, H. and Safarzadeh, A., 2017. Effect of priming with nitric oxide on germination indicators of medicinal plant anise (*Pimpinella anisum* L.) under salinity stress conditions, 7th National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources, Institute of Education Excellent Mehr Arvand, Tehran, Iran (In Persian).
- Mukherjee, S., and Chakraborty, S. 2021. Plant tissue culture: a review on recent advances and future prospects. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 9(02): 1-10.
- Narimani, R., Samiei, L., and Moghaddam, M. 2022. Micro propagation optimization of two endangered and endemic of Iran species of Ferulago (*Ferulago subvelut*ina Rech. f. and *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 29(2). (In Persian).
- Nazari, R., Abedy, B., Balandari, A., Samiei, L., and Tehranifar, A. 2020. Use of response surface methodology for optimizing the media of establishment and proliferation phases of Iranian seedless barberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 141, 87-101.
- Romdhane, M. and Tizaoui, C. 2005. The kinetic modelling of a steam distillation unit for the extraction