مطالعه روغن‌فرار کشت بافت رازیانه (*Foeniculum vulgare* Miller.) و مقایسه آن با گیاه کامل

محمدرضا شمس‌اردکانی[1]*، عباس حاجی‌آخوندی[2]، امیرحسین جمشیدی[3]، خسرو عبدی[4]

۱-دانشیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲-دانشیار فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳-دستیار تخصصی فارماکوگنوزی و عضو هیات علمی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی

٤-کارشناس ارشد توکسیکولوژی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

*آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم‌پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، کدپستی: ١٤١٧٤

تلفن: ٦٦٩٥٩٠٩٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٤٨١١٧٨ (٠٢١)

پست الکترونیک: shams@ias.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/۳/۱ **تاریخ تصویب:** ۸۳/٦/۳۰

چکیده

مقدمه: گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare* Miller.) گیاهی علفی، معطر و پایا از خانواده چتریان است که در مناطق مختلف ایران مورد استفاده خوراکی و دارویی قرار می‌گیرد و امروزه در بسیاری از نقاط جهان کشت و سازگار شده است. با توجه به اهمیت و کاربرد وسیع اسانس گیاه در ساخت داروها، مواد غذایی و آرایشی، بهداشتی تصمیم بر آن شد که کشت سلولی گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

هدف: هدف از این مطالعه، تولید و نگهداری کالوس از بذر گیاه رازیانه و بررسی توانایی کالوس برای تولید متابولیت‌های ثانویه و مقایسه آن با متابولیت‌های تولید شده در گیاه کامل است.

روش بررسی: بذرهای گیاه رازیانه، با قرار گرفتن در محلول‌های استریل‌کننده، استریل شدند و بعد از رشد در محیط آگار ۰/۸ درصد و تولید دانه رست، قسمت‌های فوقانی دانه رست در شرایط کاملاً استریل به محیط کشت MS اتوکلاو شده که دارای مقادیر مشخصی از هورمون‌های گیاهی بود منتقل و جهت رشد و ایجاد کالوس در گرمخانه در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نور نگهداری شدند. بعد از ایجاد مقادیر لازم از کالوس سبزرنگ، عصاره دی‌کلرو متانی کالوس تهیه شده و به دستگاه GC تزریق گردید. اسانس حاصل از سرشاخه‌های هوایی گیاه کامل نیز به دو روش تقطیر با آب داغ و بخار داغ تهیه و جهت تعیین ترکیبات موجود به دستگاه GC/MS تزریق شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که بیشترین درصد ترکیبات موجود در اسانس گیاه را ترانس آنتول، استراگول و فنچون تشکیل می‌دهند. در مقابل کالوس شامل (E,E) 2,4 – Decadienal به میزان ۲۲/٦٤ درصد و 1,8 cineole به میزان ۱۷/۳۵ درصد بودند.نتایج حاکی از آن است که کالوس به دست آمده از گیاه رازیانه در محیط MS و با هورمون‌های گیاهی فوق توانسته است ترکیبات فرار تولید نماید.

گل‌واژگان: رازیانه، کشت بافت، روغن فرار، کالوس

مقدمه

کشت سلول و بافت گیاهی که با عنوان‌های کشت درون‌شیشه‌ای[1] و یا کشت استریل نیز مطرح می‌شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است. هرچند که هزینه و سرمایه زیاد و همچنین نیاز به نیروی کار ماهر و متخصص از جمله معایب روش‌های بیوتکنولوژیکی به شمار می‌آیند، اما کشت بافت توانسته راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیتی منحصر به فرد ایجاد نماید که ساختن مصنوعی آن‌ها به دلیل مشکلات تکنیکی، مقدور نیست [۱]. ساختار پیچیده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه باعث شده که نتوان آن‌ها را به صورت مصنوعی سنتز نمود و لذا تنها منبع تولید آن‌ها سلول گیاه می‌باشد. اگر این سلول‌ها را نیز بتوان نظیر میکروارگانیسم‌ها کشت نمود، می‌توان تولید آنها را به مقدار قابل توجهی افزایش داد [۲].

علی‌رغم هزینه لازم جهت پیشبرد روش‌های بیوتکنولوژی تولید ترکیب‌های معطر چندین عامل وجود دارد که مشوق این ایده است. مصرف‌کننده‌های طبیعت‌گرا از عوارض جانبی احتمالی افزودنی‌های مصنوعی غذا، نگران می‌باشند. بنابراین فرآورده‌های طبیعی به طور روزافزونی ترجیح داده می‌شود. به‌علاوه ترکیب‌های معطر حاصل از سیستم‌های کشت بافت گیاهی، تخمیر میکروبی و یا تبدیلات زیستی باید نسبت به نوع سنتزی آنها طبیعی‌تر باشند. همچنین مصرف‌کننده‌ها در رابطه با باقیمانده‌های حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها که معمولاً در محصولات غذایی کشاورزی وجود دارد، نگران می‌باشند. این در حالی است که تولید این ترکیب‌ها به روش کشت بافت گیاهی نیازی به این مواد ندارد. البته تنها پذیرش مصرف‌کننده در سوق دادن صنایع جهت یافتن روش‌های بیوتکنولوژی به منظور تولید ترکیبات معطر تعیین‌کننده نیست. محرک‌های دیگری مانند فراهم شدن نامنظم مواد خام به واسطه شرایط نامناسب آب و هوایی، تغییرات فصلی یا محصولی، بلایای طبیعی یا بی‌ثباتی سیاسی در مناطق رویش گیاه نیز در این کار دخیل می‌باشند [۳].

به منظور بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* به انجام آزمایش‌های مختلف جهت ایجاد کالوس از این گیاه مبادرت نمودیم. رازیانه جزء خانواده چتریان[1] است. این خانواده، بسیار وسیع و مشهور می‌باشد و حدود ۳۰۰ جنس و ۳۰۰۰ گونه علفی معطر دارد. اگرچه گونه‌های مربوط به این خانواده در سرتاسر جهان پراکنده‌اند ولی تمرکز اصلی آن‌ها در مناطق معتدل و نواحی کوهستانی دنیای قدیم است. رازیانه گیاهی است افراشته و دایمی (گاهی دوساله و به ندرت یک ساله) به ارتفاع ۱ تا ۱/۸ متر، بدون کرک، با ساقه‌های منشعب و مدور که بر روی آنها دنده‌های ظریف مشاهده می‌شود [٤،٥،٦]. میوه‌ها دارای مزه شیرین هستند و این زیرگونه را به طور گسترده جهت مصارف غذایی و دارویی کشت می‌نمایند [۷]. این گیاه بومی جنوب اروپا، آسیای میانه و مناطق مدیترانه‌ای است. همچنین در سطح گسترده در اکثر مناطق جهان به ویژه بلغارستان، رومانی، مجارستان، یونان، ترکیه، ایتالیا، فرانسه، آلمان، انگلستان، چین، هند و آمریکا کشت می‌شود. در این تحقیق شرایط ایجاد کشت بافت رازیانه و روغن فرار گیاه کامل با ترکیبات فرار حاصل از کشت بافت گیاه رازیانه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه رازیانه

گیاه مورد مطالعه از مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی واقع در کرج تهیه گردید. ارتفاع مزرعه ۱۵۰۰ متر از سطح دریا و دارای مختصات جغرافیایی ۳۵َ ، ۵۰° شمالی و ۵۸َ، ۵۰° شرقی می‌باشد. نوع خاک مزرعه سندی کلی[2] با pH ۷/۹ می‌باشد. در هر هکتار ۱۰۰ مترمکعب کود، ٦۰ کیلوگرم P_2O_5 به شکل فسفات آمونیوم و ٦۰ کیلوگرم K_2O به شکل سولفات پتاسیم اضافه گردید. گیاه رازیانه در مردادماه جمع‌آوری شد. تمام اندام گیاه جمع‌آوری و به مدت ۱۰ روز در سایه و در دمای اتاق خشک گردید. نمونه‌ها تا زمان

[1] *in vitro*

[1] Umbelliferae (Apiaceae)

[2] Sandy clay

اسانس‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند. بذرهای مورد استفاده به منظور ایجاد دانه‌رست از بذرگیری همین نمونه‌ها به دست آمدند.

تولید دانه‌رست[1]

جهت استریل کردن دانه‌های گیاه رازیانه ابتدا به مدت نیم ساعت در آب مقطر استریل جهت خیس شدن و شستشوی ابتدایی قرار داده شد. سپس دانه‌ها به مدت دو دقیقه در الکل ۷۰ درجه و پس از آن در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۸ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن دانه‌ها چندین بار با آب مقطر استریل شستشو وآنگاه به وسیله پنس استریل دانه‌های استریل شده درون پتری‌دیش های حاوی محیط آگار ۸ درصد داده شدند. لازم به ذکر است که تمامی مراحل فوق در زیر کابین استریل (لامینار ایر فلو) انجام گرفت. پتری‌دیش‌های فوق تا زمان تولید دانه رست (۱۲ روز)، در تاریکی و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ایجاد کشت کالوس

به منظور تهیه کشت کالوس، دانه رست‌های استریل حاصل از دانه‌ها قطعه‌قطعه شده و به محیط کشت MS[2] به همراه میواینوزیتول[3] (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، گلیسین[4] (۲ میلی‌گرم در لیتر)، نیکوتینیک‌اسید[5] (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، پیریدوکسین[6] (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، تیامین[7] (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، سوکروز (۳۰ گرم در لیتر)، آب نارگیل (۱۵۰ میلی‌لیتر در لیتر)، آگار (۰/۸ درصد) و تنظیم‌کننده‌های رشد IAA[8] (۱ میلی‌گرم در لیتر)، ۲،٤ D (۱ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) منتقل گردیدند. pH محیط ۵/۷ بود. تمامی کشت‌ها در دمای ۲۵ ±۲°C و در تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت چند روز و تولید کالوس با واکشت قطعات کالوس تولیدی به محیط کشت جدید کالوس خوش رشد حاصل شد. آنگاه گروهی از کشت‌ها به محیط نور تمامی کشت‌ها در دمای ۲۵ ±۲°C منتقل شدند.

جداسازی ترکیبات فرار

به منظور بررسی روغن فرار گیاه روش تقطیر استفاده به عمل آمد. به عبارت دیگر با انجام عملیات اسانس‌گیری با دو روش تقطیر با آب و تقطیر با بخار و بررسی ترکیبات در دو روش، مقایسه‌ای بین نوع و میزان اجزای به دست آمده صورت گرفته است. در روش تقطیر با آب[1] استخراج توسط دستگاه کلونجر[2] در زمان ۱۵۰ دقیقه صورت گرفت. روش تقطیر با بخار نیز در طی ۱۵۰ دقیقه صورت گرفت. روغن‌های فرار حاصل تقطیر با هگزان نرمال استخراج و پس از آن با سولفات سدیم انیدر خشک شدند. جهت استخراج از نمونه‌های حاصل از کشت بافت عصاره‌گیری با دی‌کلرومتان صورت گرفت. ابتدا ۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به حدود ۱۰ گرم نمونه بافت اضافه شد. مجموع حلال و نمونه پس از سابیده شدن در هاون درون لوله آزمایش قرار گرفته و توسط ورتکس به مدت سه دقیقه عمل جداسازی انجام پذیرفت. پس از سانتریفوژ، فاز دی‌کلرومتانی توسط پیپت پاستور جدا گردید. آنگاه تا حجم ۱۰۰ میکرولیتر تغلیظ و مقدار یک میکرولیتر از آن به دستگاه GC و سپس GC/MS تزریق گرفت [۸].

کرماتوگرافی گازی

شرایط دستگاه:

مدل: Hewlett-Packard 6890

ستون: (ضخامت لایه ۰/۲۵ µm و ۰/۲۵ mm × ۳۰m)
HP1 fused silica

برنامه دمایی: ۲۶۵ °C –۵۰ با سرعت ۲/۵ °C/min

حجم تزریق: ۰/۱ میکرولیتر در مورد اسانس خالص و ۱-۰/۵ میکرولیتر در مورد عصاره

دمای محل تزریق: ۲۵۰ °C

دمای آشکارگر: ۳۰۰ °C

گاز حامل: نیتروژن (۱/۵ ml/min)

---

[1] Seedling
[2] Murashige & Skoog
[3] myo-inositol
[4] glycine
[5] nicotinic acid
[6] pyridoxine.HCl
[7] thiamine.HCl
[8] indole acetic acid

[1] Hydrodistillation
[2] Clevenger

کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنجی جرمی

از کروماتوگرافی گازی مدل Thermoquest 2000 دارای آشکارگر انتخابی جرمی مدل Thermo Finnigan Trace MS متصل به کامپیوتر مدل OptiPlex GX 110 با نرم‌افزار Xcalibur استفاده شد.

شرایط دستگاه:

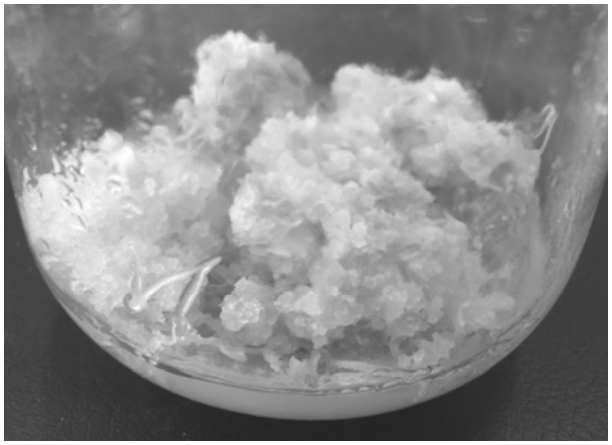
ستون: (ضخامت لایه ۰/۲۵ µm و ۰/۲۵ mm × ۳۰m)
Crosslinked 5% Ph Me Siloxane MS
برنامه دمایی: ۲٦۵ °C –۵۰ با سرعت ۲/۵ °C/min
حجم تزریق: ۰/۱ میکرولیتر
دمای محل تزریق: ۲۵۰ °C
گاز حامل: هلیوم (۱/۵ ml/min)
Electronic impact: ۷۰ eV
دمای منبع یونیزاسیون: ۲٤۰ °C
محدوده اسکن: ٤۸۰–۵۰
GC interface temperature: ۲٦۵ °C

شناسایی ترکیبات

سری هیدروکربن‌های خطی ۹ تا ۱۸ کربنی در همان شرایطی که اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شد، تزریق شده سپس برای هر کدام از قله‌های حاصل از طیف مقدار ضریب بازداری محاسبه گشته و با مقایسه با منابع موجود جهت شناسایی ترکیب استفاده شد [۹،۱۰،۱۱]. طیف‌های حاصل از دستگاه GC/MS با مقایسه با بانک‌های اطلاعاتی نظیر Wiley شناسایی گردیدند. همچنین الگوی شکست نمونه‌ها در طیف جرمی با منابع مقایسه گشتند [۱۰].

نتایج

کالوس به دست آمده حاصل انتقال قطعات فوقانی دانه‌رست به محیط کشت جامد MS می‌باشد. به طور کلی هر واکشت کشت جامد به فاصله زمانی حدود ٤ هفته صورت گرفته است. کالوس‌ها خیلی ترد، به رنگ سبز روشن، بسیار خوش‌رشد و دارای تارهای فراوان که منتشر به سمت بالا یا هم‌سطح آگار بودند. در هیچ کدام از ارلن‌ها این تارها به صورت فرو رفته در آگار دیده نشد (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱- تصویر کالوس رازیانه

همان‌گونه که در جدول شماره ۱ آمده است F۱۵۰ اسانس حاصل از گیاه رازیانه می‌باشد که مدت زمان اسانس‌گیری آن ۱۵۰ دقیقه و توسط تقطیر با آب داغ تهیه و F'۱۵۰ اسانسی است که در زمان ۱۵۰ دقیقه و توسط بخار آب گرفته شده است.

با توجه به مطالعه طیف‌های جرمی حاصل از GC/Mass و اعداد کواتس محاسبه شده و مقایسه این مشخصات با ترکیبات استاندارد و مراجعه به منابع مختلف ۳۷ ترکیب در اسانس گیاه رازیانه شناسایی گردید که مجموعاً ۹۱/۳۷ تا ۹٦/۹۳ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند. عمده‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس در شرایط مختلف عبارت بودند از:
E Anethde (٤۷/۸۹ تا ۵۰/۱۸ درصد)، Estragole (۷/٦۳ تا ۸/۸٦ درصد)، D-(+)-Fenchone (۷/٦۳ تا ۸/۸٦ درصد) و dl Limonene (٦/۷۲ تا ۸/۱۲ درصد). کالوس‌های موجود در این تحقیق از نظر دارا بودن ترکیبات فرار مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص شد تنها در کالوس‌های قرار گرفته در نور این ترکیبات وجود دارند. کلیه ترکیبات شناسایی شده به همراه شاخص بازداری کواتس و درصد کمی هر ترکیب در روغن فرار حاصل از روش‌های مختلف اسانس‌گیری در جدول شماره ۱ آورده شده است. در جدول شماره ۲ دستجات ترکیبات موجود در اسانس‌های فوق‌الذکر آمده است.

جدول شماره ۱- ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌های فرار به دست آمده از گیاه رازیانه و کالوس حاصل از کشت بافت

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری	F۱۵۰	F´۱۵۰	کالوس
۱	α – Pinene	۹۰۲	۲/۹۹	۲/۶۳	۲/۳۵
۲	Camphene	۹۱٤	۰/۱۹	۰/۸۷	–
۳	Sabinene	۹۳۷	۰/۰۷	۰/۱۱	–
٤	2- ß-Pinene	۹٤۰	۰/٦۷	۰/۸٤	٤/۷۱
٥	β-Myrcene	۹٥۱	۰/۷۱	۰/۸۹	–
٦	α – Phellandrene	۹۷۰	۲/۷۲	۲/۱۱	–
۷	*P*-Cymene	۹۹۱	۰/۱٦	۰/۳۲	–
۸	*dl* Limonene	۹۹۹	۸/۱۲	٦/۷۲	–
۹	1,8 Cineole	۱۰۰۱	–	–	۱۷/۳٥
۱۰	*Cis*- β -Ocimene	۱۰۰٦	۰/۸٤	۰/٦۱	–
۱۱	γ - Terpinene	۱۰۲٤	۰/۸۹	۰/٥	۷/۰۷
۱۲	Cis-Sabinene hydrate	۱۰۳۸	Trace	۰/۰٦	–
۱۳	*D*-(+)-Fenchone	۱۰٥۸	۷/٦۳	۸/۸٦	–
۱٤	*Trans*-Limonene Oxide	۱۱۰۳	Trace	۰/۰۸	–
۱٥	Camphor	۱۱۰۷	۰/۷	۰/٦۷	٥/٥۷
۱٦	4-Terpineol	۱۱٤۱	۰/۰٥	۰/۱۳	٥/۷۸
۱۷	α -Terpineol	۱۱٥۳	–	–	٦/۱۳
۱۸	Estragole	۱۱۷۰	۱۲/٥۲	۱۰/۸٥	–
۱۹	Fenchyl Acetate <endo>	۱۱۸٥	۲/۰۱	۱/۲۹	–
۲۰	Fenchyl Acetate <exo>	۱۱۹۸	۳/٤٥	۲/٦۲	–
۲۱	*Z* Anethole	۱۲۱۷	۰/۳	۰/٥۲	–
۲۲	*E* Anethole	۱۲۷۸	٥۰/۱۸	٤۷/۸۹	–
۲۳	(*E,Z*) 2,4-Decadienal	۱۲۸۱	–	–	۱۰/۱٥
۲٤	Unidentified	۱۲۹۸	–	–	۳/٤۲
۲٥	(*E,E*) 2,4-Decadienal	۱۳۰۷	–	–	۲۲/٦٤
۲٦	Unidentified	۱۳۲۳	–	–	٦/٤۲
۲۷	α –Copaene	۱۳۳٦	۰/۱۱	۰/۱٥	–
۲۸	*Trans*-Caryophyllene	۱۳۷٦	۰/۲۲	۰/۲۷	–
۲۹	Fenchyl N-Valerate	۱٤۰۸	۰/۲۱	۰/۲۱	–
۳۰	*Trans*-β-Farnesene	۱٤۱۷	۰/۲٥	۰/۳	–
۳۱	Terpinyl Isobutyrate	۱٤۳۰	۰/۱٤	۰/۰۷	–
۳۲	Germacrene D	۱٤۳۷	۰/۷۸	۰/٦۹	–
۳۳	Bicyclogermacrene	۱٤٥۱	۰/۱	۰/۰٦	–
۳٤	α -Muurolene	۱٤٥۷	۰/۰۸	۰/۰۹	–
۳٥	Bisabolene	۱٤٦٥	۰/۰۷	۰/۰٦	–

ادامه جدول شماره ۱- ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌های فرار به دست آمده از گیاه رازیانه و کالوس حاصل از کشت بافت

۳۶	δ - Cadinene	۱۴۸۰	Trace	۰/۱۴	–
۳۷	Myristicin	۱۴۸۷	Trace	۰/۲۱	–
۳۸	Geranyl n butyrate	۱۵۱۸	۰/۱۱	۰/۰۶	–
۳۹	Germacrene D 4 ol	۱۵۲۸	۰/۲۵	۰/۱	–
۴۰	Caryophyllen oxide	۱۵۳۳	۰/۰۶	۰/۰۵	–
۴۱	*Epi-α*- Cadinol	۱۶۰۵	۰/۰۸	۰/۰۶	–
۴۲	Apiol	۱۶۳۷	۰/۱۲	۰/۱۲	–
۴۳	β- sinensal	۱۶۵۰	۰/۱۵	۰/۱۶	–

جدول شماره۲ – درصد و میزان دسته ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه و کالوس رازیانه

	F ۱۵۰	F ' ۱۵۰	کالوس
مونوترپن هیدروکربنی	۱۷/۳۶	۱۵/۶۰	۱۴/۱۳
مونوترپن اکسیژنه	۱۳/۷۲	۱۳/۵۹	۳۴/۸۳
مجموع مونوترپن ها	۳۱/۰۸	۲۹/۱۹	۴۸/۹۶
سزکویی‌ترپن هیدروکربنی	۰/۸۳	۱/۰۷	–
سزکویی‌ترپن اکسیژنه	۱/۹۰	۱/۷۳	–
مجموع سزکویی‌ترپن‌ها	۲/۷۳	۲/۸۰	–
مجموع فنیل پروپانوییدها	۶۳/۱۲	۵۹/۳۸	–
مجموع ترکیبات هیدروکربنی	۱۸/۱۹	۱۶/۶۷	۱۴/۱۳
مجموع ترکیبات اکسیژنه	۷۸/۷۴	۷۴/۷۰	۶۷/۶۲
غیره	–	–	۳۲/۷۹
درصد ترکیبات شناسایی شده	۹۶/۹۳	۹۱/۳۷	۹۱/۵۹

بحث

با مقایسه اسانس‌های حاصل از گیاه که به دو روش تقطیر با بخار و با آب به دست آمده‌اند مشخص می‌گردد که میزان آنتول و ترکیبات فنیل پروپانوییدی در روش تقطیر با آب کمی بیشتر است.

همان‌گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است جمعاً ترکیب شناسایی شده است که در این بین ۱۴/۱۳ درصد را منوترپن‌های هیدروکربنی و ۳۴/۸۳ درصد را منوترپن‌های اکسیژن تشکیل می‌دهند (E,E) 2,4- Decadienal (۲۲/۶۴ درصد) و ۱و۸ سینئول (۱۷/۳۵درصد) بالاترین میزان مواد تشکیل‌دهنده را دارند.

در پژوهش‌هایی که بر روی کشت بافت رازیانه تاکنون انجام شده است تجمع آنتول در کالوس مشاهده نشده است. این در حالی است که وجود ترکیبات فرار در مطالعات مختلف گزارش شده است. البته در شرایطی که کالوس‌ها تولید غنچه کرده باشند آنتول مشاهده می‌گردد. به عنوان مثال کاشت درون شیشه‌ای گیاه رازیانه توسط Anzidei و همکاران با القای کالوس در چندین جمعیت رازیانه صورت گرفت. تمامی کالوس‌ها با تنظیم‌کننده‌های 2,4D یا αNAA به همراه کینتین تشکیل شدند. تنها کالوس‌هایی که با αNAA و کینتین تولید شده بودند ایجاد ریشه نمودند. کالوس‌های رشد کرده در حضور 2,4D یا αNAA به همراه کینتین تفاوت‌های قابل

توجهی را در سطح سلولی و بافت نشان دادند که این امر وابسته به توانایی و استعداد ریخت‌زایی آنها بود [۱۲]. کشت کالوس نامتمایز رازیانه در تحقیق دیگری بررسی شد و مشخص گردید که هیچ تجمع آنتولی در آن به چشم نمی‌خورد. هم‌چنین در تحقیقی دیگر که بر روی کشت ساقه رازیانه در محیط MS و به همراه αNAA (2 mg/l) و kin (0.5 mg/l) صورت گرفت، کالوس حاصل روغن فرار تولید نکرد [۱۳]. در پژوهشی که Paupardin و همکاران بر روی کشت بافت رازیانه به منظور دسترسی به متابولیت‌های ثانویه انجام دادند نشان داده شد که کالوس‌هایی که در آنها تولید غنچه شده است تولید آنتول نمودند. بیشترین میزان تولید آنتول با تنظیم‌کننده‌های رشد NAA (0.1 mg/l) به همراه BA (0.1-1 mg/l) بوده است. البته تحت این شرایط میزان آنتول نسبت به گیاه کامل در طبیعت پایین بود. بر طبق این تحقیقات NAA در دوزهای پایین سبب افزایش کانال‌های ترشحی و تحریک فعالیت آنها می‌شود [۱٤]. تحقیقات چندی بر روی سلول‌های سوسپانسیونی جدا شده از این گیاه وجود دارد. در تحقیق انجام شده اوژنول، بنزیل‌الکل، فنیل‌اتانل و آنیزآلدیید مخصوصاً از محیط کشت جدا شده است اما در هیچ کدام آنتول مشاهده نشد. حتی پس از افزودن پیش‌سازهایی نظیر فنیل‌آلانین در محیط یا پس از هیدرولیز عصاره گرفته شده نیز آنتول وجود نداشت [۱٤].

منابع

1. Bajaj YPS, Furmanowa M and Olszowska O. Biotechnology of micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: Bajaj Y P S (Ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry.* volume 4: *Medicinal and aromatic plants 1*. New York: Springer-Verlag; 1988. pp. 68 - 103.

2. Scragg AH. The economics of mass cell culture. In: Morris P, Scragg AH, Stafford A, Fowler MW. (Eds) *Secondary metabolism in plant cell cultures*. Cambridge: Cambridge University Press; 1986. pp: 202-7.

3. Harlander S. Biotechnology for the production of flavoring materials. In: Gary R. (ed.). Source book of flavors. 2th ed.: Chapman & Hall; 1994. pp. 155-175, 717

4. Rechinger KH, Hedge IC. Umbelliferae. In: Rechinger KH. *Flora Iranica*. Graz: Akademische Druck-u. Verlagsanstatlt; 1986; 162: 346-7.

5. Davis PH. *Flora of Turkey and the east Aegean Islands*. Edinburgh: University press; 1972; 4: 376-7.

6. Evans WC. *Trease and Evans' pharmacognosy.* 15th ed. London: WB Saunders Company Ltd.; 2002.

7. Tutin TG. Umbelliferae. In: Tutin TG, HeYwood VH, Meore DM. *Flora Europaea*. Cambridje: University press; 1981, 2: 341.

8. Wagner H and Sabine B. *Plant drug analysis.* 2th ed. Springer-Verlag; 1996: 150-1, 176.

9. Davis NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J. Chromatography*. 1990; 503: 1-24

10. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry. Illinois: Allured Publishing Corporatio; 1995.

11. Connolly JD and Hill RA. Dictionary of terpenoids. Vol. 1,3. London: Chapman and Hall; 1991.

12. Anzidei M. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristic in relation to morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1996; 45: 263-268.

13. Mulder – Krieger Th, Verpoorte R, Svendsen AB and Scheffer JC. Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A

review. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 1988; 13: 85-154.

14. Hunault G, Desmarest P and Manoir JD. XI *Foeniculum vulgare* Mill.: Cell culture, regeneration and the production of anethole. In: Bajaj YPS (ed). Biotechnology in Agriculture and forestry, vol 7. Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989; pp. 185-212.