ارزیابی ژنتیکی و فیتوشیمی نمونه‌های حاصل از کشت بافت گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgar*) در غلظت‌های مختلف هورمونی

لیا شوشتری[۱]، علیرضا اطمینان[۱]، علی مهرآفرین[۲]، اردشیر قادری[۳*]

۱- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
۲- استادیار پژوهش، گروه کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۳- استادیار پژوهش، گروه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، صندوق‌پستی: ۱۳۶۹-۳۱۳۷۵، تلفن: ۱۹-۳۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶)، نمابر: ۳۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶)
پست الکترونیک: Ardeshir582003@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۷ **تاریخ تصویب:** ۹۳/۱۰/۱۶

چکیده

مقدمه: تنوع حاصل از کشت بافت که سوماکلونال نامیده می‌شود منبع ارزشمندی از تنوع ژنتیکی است که می‌تواند جهت اصلاح گیاهان دارویی استفاده شود.

هدف: ارزیابی کارایی نشانگرهای مولکولی در تشخیص تنوع سوماکلونال و رخداد پدیده متیلاسیون در ژنوم به عنوان یک عامل مؤثر بر ایجاد تغییرات در سطح ژنوم و عملکرد متابولیتی گیاه رازیانه انجام شده است.

روش بررسی: DNA ژنومی هشت نمونه غیرنرمال کشت بافتی از نظر تیپ رشدی به همراه یک نمونه شاهد به روش دلاپورتا استخراج شد. مراحل نشانگر AFLP با دو روش هضم آنزیمی متفاوت به اجرا درآمد. آنالیز فیتوشیمیایی با استفاده از دستگاه GC/Mass انجام و درصد و اجزا اسانس مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج: نتایج بررسی الگوی باندی حاصل از روش‌های مختلف هضم آنزیمی حاکی از وجود چندشکلی میان تیمارها بود. همچنین تجزیه خوشه‌ای، نمونه شاهد و نمونه‌های غیرنرمال را به طور جداگانه گروه‌بندی نمود. نتایج آنالیز درصد و ترکیبات اسانس نشان داد که در گیاهان حاصل کشت بافت ترکیبات ارزشمندی نظیر Limonene، Fenchone، Estragole و Anethole تولید نمی‌شود و در عوض ترکیباتی نظیر 2,4 Decadienal و Cineol, Terpineol تولید می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد مارکر AFLP برای بررسی تنوع سوماکلونال در نمونه‌های باززا شده مؤثر بوده و تغییرات فنوتیپی و فیتوشیمیایی گیاهان غیرنرمال می‌تواند پیامد آلکیلاسیون در ژنوم باشد همچنین با تکیه بر تنوع حاصله می‌توان با اعمال تنش‌های مختلفی از جمله سرما، گرما و شوری اقدام به شناسایی ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ عملکرد و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نمود.

گل‌واژگان: *Foeniculum vulgar*، تنوع سوماکلونال، کشت بافت، متیلاسیون

مقدمه

رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgar* گیاهی است علفی و معطر، به ارتفاع یک تا دو متر که به حالت وحشی به شکل چندساله و به صورت پرورشی، گیاهی دو ساله می‌باشد [۱]. در اسانس رازیانه بیش از ۳۰ نوع ترکیب ترپنی وجود دارد که از مهم‌ترین مواد مؤثره آن می‌توان به آنتول اشاره نمود که یک ماده معطر با ارزش تجاری محسوب می‌شود. از جمله سایر متابولیت‌های ثانویه این گیاه می‌توان به استراگول، فنچون، لیمونن، α و β پینن اشاره نمود. قسمت‌های مورد استفاده رازیانه ریشه، برگ و میوه آن است که در عمل کلیه قسمت‌های گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله خواص درمانی آن می‌توان به رفع سوء هاضمه، ضداسپاسم عضلات و همچنین ضدمیکروب موضعی اشاره نمود [۲].

وجود تنوع ژنتیکی یکی از عوامل مؤثر در موفقیت هر برنامه اصلاحی است. در سال‌های اخیر کشت سلول‌های گیاهی به عنوان یکی از منابع بالقوه تنوع ژنتیکی سودمند در گیاهان مطرح شده است. تنوع ایجاد شده در شرایط کشت بافت را تنوع سوماکلونال می‌نامند که حاصل طیف وسیعی از جهش‌ها، شامل جهش‌های نقطه‌ای، تغییر در آرایش کروموزومی (شامل وارونگی، حذف و اضافه داشت) و تغییر در تعداد آنها است. احتمال تغییرات ژنتیکی در هسته سلول‌ها معمولاً با زیاد شدن سن کشت افزایش می‌یابد و این تغییرات به شرایط کشت و نیز ترکیبات محیط کشت به ویژه تنظیم‌کننده‌های رشدی، نوع ریزنمونه و تعداد دفعات واکشت بستگی دارد. بنابراین تنوع سوماکلونال فرآیندی است که نه تنها روی ژن‌ها و در نهایت مورفولوژی گیاه اثر می‌گذارد بلکه باعث تغییر در بیان ژن و کنترل آن نیز می‌شود [۳]. بسیاری از پدیده‌ها با تغییرات ژنتیکی و در واقع با تغییر الگوی بیان ژن‌ها در ارتباط هستند و می‌توانند سبب ناپایداری ژنتیکی شوند. یکی از این پدیده‌ها که در گیاهان نقش بسیار مهمی در ایجاد این تغییرات ایفا می‌نماید، متیلاسیون DNA است [۴]. از سوی دیگر تغییرات محیطی و انواع تنش‌های محیطی می‌تواند تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی را به همراه وقوع متیلاسیون در DNA در پی داشته باشد [۵]. گزارش‌هایی وجود دارد که بیان می‌کند تنوع سوماکلونال وابسته به پدیده متیلاسیون است و عمدتاً با وقوع متیلاسیون در نوکلئوتیدهای سیتوزین روی می‌دهد [۶]. با توجه به اینکه تنوع سوماکلونال بیشتر در اثر وقوع جهش‌ها رخ می‌دهد بنابراین باید از تکنیک‌های ارزیابی مناسبی برای تشخیص این جهش‌ها در کشت بافت استفاده کرد. تحقیقات متعددی به منظور کشف این تنوع انجام شده است که استفاده از نشانگرهای DNA به دلیل دقت بالا و فراهم نمودن امکان بررسی تعداد زیادی نمونه در زمان کوتاه از جمله بهترین این روش‌ها می‌باشد [۷]. استفاده از نشانگرهای DNA در بررسی تنوع سوماکلونال تحت شرایط مختلف کشت بافت، نشان‌دهنده الگوی باندی متفاوت میان کالوس‌ها بوده است. تعداد واکشت‌ها با میزان تغییرات ژنتیکی در کالوس‌ها رابطه مستقیم داشته و از طرفی ترکیبات هورمونی محیط کشت می‌تواند سبب بروز تغییرات ژنتیکی در سطح مولکول DNA شود [۸]. استفاده از نشانگر مولکولی AFLP در بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت بافت گیاه مارچوبه، ۲/۹۴ درصد چند شکلی را در بین گیاهان باززا شده نشان داده است [۹]. به طور کلی گزارش شده است که ایجاد فنوتیپ غیرطبیعی در گیاهان باززا شده در شرایط کشت بافت با ایجاد تغییرات بزرگ در سطح ژنوم پیوستگی ندارد بلکه این تغییرات به دلیل بروز متیلاسیون در قسمت‌هایی از ژنوم رخ می‌دهد [۱۰]. متیلاسیون ژنوم می‌تواند تغییرات فنوتیپی جدید و قابل توارثی را به وجود آورد که ممکن است به عنوان یک صفت مطلوب قابل بهره‌برداری باشد [۵]. هدف از این تحقیق مطالعه تنوع سوماکلونال و کمیت و کیفیت اسانس در گیاهچه‌های باززا شده از کالوس‌های رشد یافته تحت اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی بوده است که این موارد با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP با به کارگیری دو سیستم هضم آنزیمی مختلف و آنالیز اسانس با دستگاه GC-MS مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ابتدا محیط القای کالوس با استفاده از چهار

ریزنمونه متفاوت در غلظت‌های مختلف هورمونی بهینه‌سازی شد. پس از بهینه‌سازی کالزایی، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ برای سه مرتبه به صورت ماهانه و متوالی در محیط‌های کشت مختلف حاوی غلظت‌های متفاوت از دو اکسین NAA و 2,4-D واکشت شدند. بدین ترتیب ۱۸ تیمار مختلف شامل سه دوره زمانی واکشت (یک، دو و سه ماهه) در شش غلظت اکسین مختلف (جدول شماره ۱) حاصل شد. کالوس‌های حاصل از هر تیمار به صورت جداگانه به محیط باززایی مناسب بهینه‌سازی شده (حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP) انتقال داده شدند. پس از تولید گیاهچه‌ها و رشد کافی آن‌ها در محیط باززایی، گیاهچه‌های دارای فنوتیپ غیرنرمال که حاصل از هشت تیمار مختلف بودند (جدول شماره ۲) به صورت مشاهده‌ای انتخاب و برای استخراج DNA به همراه یک نمونه گیاهچه شاهد (گیاهچه‌های حاصل از کشت بذرهای رازیانه در محیط کشت MS پایه) مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول شماره ۱- غلظت اکسین‌های مورد استفاده برای محیط‌های واکشت کالوس

محیط واکشت	غلظت 2,4-D (mg/lit)	غلظت NAA (mg/lit)
۱	۲	۰
۲	۴	۰
۳	۶	۰
۴	۰	۲
۵	۰	۴
۶	۰	۶

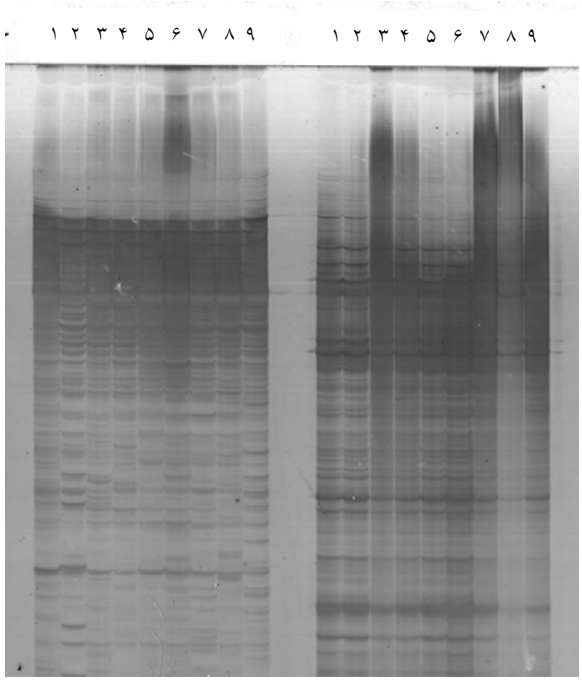
جدول شماره ۲- ویژگی نمونه‌های باززا شده غیرنرمال از نظر تعداد واکشت و غلظت هورمونی محیط کشت مورد استفاده در مرحله کالزایی

شماره نمونه	تعداد واکشت	غلظت NAA (mg/l)	غلظت 2,4-D (mg/l)	وضعیت گیاهچه
۱	۲	۰	۴	غیر نرمال
۲	۲	۰	۶	غیر نرمال
۳	۳	۰	۲	غیر نرمال
۴	۳	۰	۴	غیر نرمال
۵	۳	۰	۶	غیر نرمال
۶	۲	۶	۰	غیر نرمال
۷	۳	۴	۰	غیر نرمال
۸	۳	۶	۰	غیر نرمال
۹	-	-	-	شاهد

نتایج

در این آزمایش از بین آغازگرهای درنظر گرفته شده برای تحقیق، در مجموع ۱۰ ترکیب آغازگری شامل ۵ ترکیب آغازگری M و E (جهت تکثیر قطعات حاصل از هضم *Eco*RI و *Mse*I) و ۵ ترکیب آغازگری M و B (جهت تکثیر قطعات حاصل از هضم *Bgl* II و *Mse*I) استفاده شد. امتیازدهی ژل‌ها فقط بر اساس باندهای پلی‌مورف کاملاً مشخص و مطمئن به صورت صفر و یک انجام گرفت. بررسی الگوی‌های باندی حاصل از نمونه‌های تکثیر شده با استفاده از ترکیبات پرایمرهای B و M تفاوت محسوسی را بین نمونه نرمال و نمونه‌های غیرنرمال مشخص ننمود. به بیان دیگر الگوهای باندی حاصل به صورت مونومورف بودند. اما در بررسی الگوی‌های باندی حاصل از نمونه‌های تکثیر شده با استفاده از ترکیبات آغازگرهای E و M، تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین نمونه‌های باززا شده غیر نرمال مشاهده شد (شکل شماره ۱).

اطلاعات مربوط به میزان پلی مورفیسم ترکیب این آغازگرها در جدول شماره ۴ ارائه شده است. آغازگرهای M و E در مجموع ۲۳ باند چند شکل ایجاد نمودند که بیشترین تعداد باند چند شکل مشاهده شده مربوط به جفت آغازگر E-CG/M-35 با ۷ باند و کمترین تعداد مربوط به جفت آغازگر E-CG/M-20 با ۲ باند چند شکل بود. میانگین تعداد باندهای چند شکل به ازای هر ترکیب آغازگر نیز برابر با ۴/۶ به دست آمد. در بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت بافت گیاه مارچوبه با استفاده از مارکر مولکولی AFLP چند شکلی به میزان ۲/۹۴ درصد در بین ۴۲ گیاه باززا شده مورد بررسی گزارش شده است [۹].



شکل شماره ۱ – الگوی باندی اصل از الکتروفورز نمونه‌های DNA تکثیر شده با استفاده از ترکیب آغازگری E-CG/M-GC

شماره چاهک‌ها (براساس جدول شماره ۲) به ترتیب نشان‌دهنده ۱- تعداد واکشت ۲، NAA = صفر میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = ۴ میلی‌گرم در لیتر؛ ۲- تعداد واکشت ۲، NAA = صفر میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = ۶ میلی‌گرم در لیتر؛ ۳- تعداد واکشت۳، NAA = صفر میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = ۲ میلی‌گرم در لیتر؛ ۴- تعداد واکشت۳، NAA = صفر میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = ۴ میلی‌گرم در لیتر؛ ۵- تعداد واکشت ۳، NAA = صفر میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = ۶ میلی‌گرم در لیتر؛ ۶- تعداد واکشت ۲، NAA = ۶ میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = صفر میلی‌گرم در لیتر؛ ۷- تعداد واکشت ۳، NAA = ۴ میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = صفر ۴ میلی‌گرم در لیتر؛ ۸- تعداد واکشت ۳، NAA = ۶ میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D = صفر میلی‌گرم در لیتر؛ ۹- شاهد؛

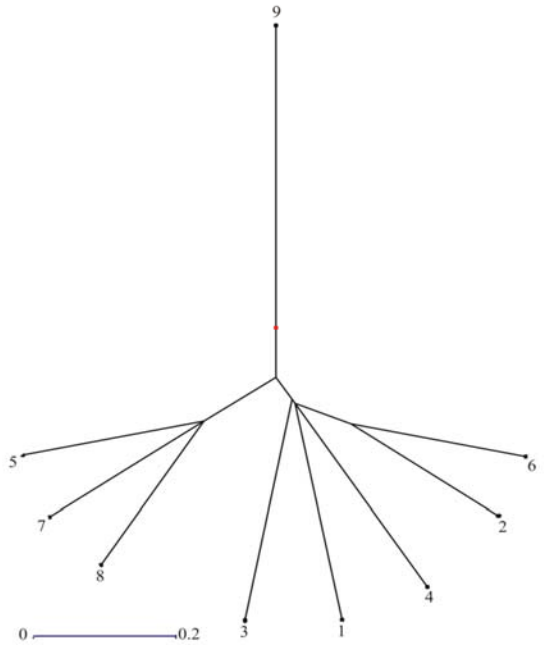
جدول شماره ۴- اطلاعات مربوط به تعداد باند چندشکل و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) پرایمرهای مورد استفاده

ترکیب آغازگر	تعداد باند چندشکل	PIC
E-CG/M-35	۷	۰/۳۵
E-CG/M-22	۶	۰/۴۱
E-CG/M-GC	۵	۰/۴۳
E-CG/M-17	۳	۰/۳۸
E-CG/M-20	۲	۰/۳۴

معیار محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) به عنوان قدرت تشخیص نشانگر، نه تنها به تعداد نشانگرهای چند شکل در هر جفت آغازگر بلکه به فراوانی هر نشانگر نیز بستگی دارد. به طور کلی هرچه مقدار PIC برای یک جفت آغازگر بیشتر باشد نشان‌دهنده‌ی کارآیی بالای آن در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده می‌باشد [۱۵].

همان طور که در جدول شماره ۴ مشاهده می‌شود در بین آغازگرهای مورد استفاده، بیشترین مقدار شاخص محتوای اطلاعات چند شکل (۰/۴۳) مربوط به ترکیب آغازگرهای E-CG/M-GC می‌باشد. با در نظر داشتن این موضوع که حداکثر مقدار شاخص محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) در نشانگرهای غالب مانند AFLP برابر با ۰/۵ است [۱۶]. با توجه به مقدار شاخص محتوای اطلاعات چند شکل به دست آمده برای این جفت آغازگر، می‌توان گفت این میزان PIC بالا نشان‌دهنده‌ی کارآیی بالای آن در تمایز نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق بوده و بنابراین می‌توان آن را جهت مطالعات مشابه پیشنهاد نمود.

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد، نمونه‌های مورد بررسی را به گونه‌ای دسته‌بندی نمود که نمونه نرمال به طور جداگانه در یک گروه و نمونه‌های غیرنرمال همگی در داخل یک گروه کلی دسته‌بندی شدند که البته در داخل این گروه به زیر گروه‌هایی نیز قابل دسته‌بندی می‌باشند. با توجه به شکل دندروگرام حاصل، تفاوت آشکار نمونه نرمال با سایر نمونه‌های غیرنرمال به طور واضح قابل مشاهده می‌باشد (شکل شماره ۲).

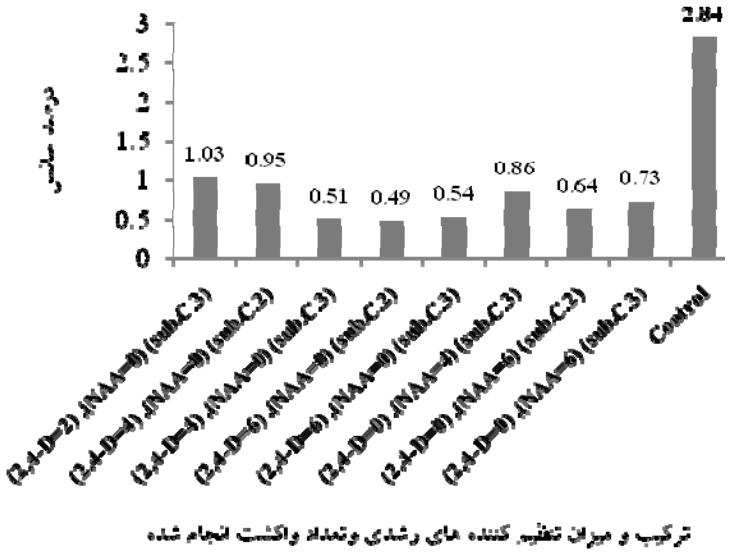


شکل شماره ۲- دسته‌بندی هشت نمونه غیرنرمال و نمونه نرمال (شماره ۹) بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA

نتایج حاصل از مقایسه درصد اسانس و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن در هشت تیمار غیر نرمال و شاهد نشان داد که در شرایط کشت بافت، ترکیباتی که در گیاه رازیانه دارای اهمیت می‌باشند تولید نشده‌اند (جدول شماره ۵). همچنین در این شرایط درصد اسانس به طور چشمگیری کاهش نشان داده است (شکل شماره ۳).

جدول شماره ۵- ترکیبات عمده اسانس حاصل گیاهچه‌های باززاشده و شاهد (نرمال)

نام ترکیب	KI	شاهد	گیاهچه باززا شده (0.1mgl^{-1}2,4-D)+(1mg^{-1}BA)
α – Pinene	۹۱۴	۱/۹۶	۲/۸۶
β-Pinen	۹۶۹	۰/۹۴	۳/۹۱
Limonen	۱۰۳۶	۷/۰۳	–
1,8 Cineol	۱۰۴۲	–	۱۵/۶۴
Trepinen	۱۰۹۳	۰/۷۱	۶/۹۳
Fenchone	۱۱۰۱	۶/۹۵	–
Camphor	۱۱۵۲	۰/۶۳	۶/۴۱
4-Terpineol	۱۱۶۸	۰/۲۳	۶/۳۲
α-Terpineol	۱۱۹۴	–	۷/۸۲
Estragole	۱۲۴۲	۱۳/۵۲	–
E Anethole	۱۲۷۶	۴۹/۸۱	–
2.4-Decadienal	۱۳۲۶	-	۳۲/۲۱
Germacrene	۱۴۹۳	۰/۷۴	–



شکل شماره ۳- میزان درصد اسانس در تیمارهای غیرنرمال و شاهد

بحث

از آنجا که DNA ژنومی نمونه‌های مورد بررسی در مرحله هضم دوگانه آنزیمی با استفاده از ترکیب دو آنزیم *Eco*RI و *Mse*I برش داده شده و به سازگارسازهای متناسب متصل شده بودند، می‌توان این طور نتیجه‌گیری نمود که ترکیب آنزیم‌های *Eco*RI و *Mse*I در مرحله هضم، DNA نمونه‌های مختلف را به صورت متفاوتی از یکدیگر برش داده است. با توجه به اینکه تمامی نمونه‌ها حاصل از یک گیاه واحد بوده و هیچ‌گونه اختلاط ژنتیکی روی نداده است، می‌توان علت الگوهای متفاوت برش آنزیمی را به تغییراتی نسبت داد که در طی مراحل مختلف کشت بافت، تحت غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده رشدی و واکشت‌های متوالی، ممکن است در ساختار ژنوم رخ داده باشد. گزارش‌های دیگری نیز حاکی از آن است که میزان تغییرات ژنتیکی در هسته سلول معمولاً با زیاد شدن سن کشت و افزایش تعداد واکشت‌ها بیشتر می‌شود و میزان و نوع این تغییرات به ترکیبات محیط کشت به ویژه تنظیم‌کننده‌های رشد بستگی دارد [۳].

با توجه به اینکه آنزیم چهار باز بر مورد استفاده در هر دو سیستم هضم آنزیمی (*MSe* I) یکسان انتخاب شده است، تفاوت الگوهای هضم را باید در تفاوت میان دو آنزیم شش باز بر *Eco*RI و *Bgl* II جستجو نمود. در مقایسه ویژگی‌های این دو آنزیم مشخص می‌شود که آنزیم *Eco*RI آنزیمی حساس به متیلاسیون بوده و در صورت وقوع متیلاسیون در توالی شناسایی آن، دیگر قادر به برش DNA نخواهد بود. آنزیم *Bgl* II بر خلاف *Eco*RI هیچ‌گونه حساسیتی به انواع متیلاسیون روی داده در ژنوم نداشته، بنابراین به عنوان یک آنزیم غیرحساس به متیلاسیون حتی در صورت متیله شدن بازهای موجود در توالی شناسایی‌اش باز هم قادر به برش آنزیمی خواهد بود. از آنجا که متیلاسیون ژنوم عامل دسته‌ای از تغییرات فنوتیپی جدید و قابل توارث است [۵]. با در نظر گرفتن این موضوع و ویژگی‌های آنزیم‌های مورد استفاده در مرحله هضم، می‌توان تغییرات فنوتیپی به وجود آمده در گیاهان غیر نرمال، که نتیجه تغییرات سوماکلونال می‌باشد را به وقوع متیلاسیون در ژنوم نسبت داد که این امر با نتایج تحقیقات مشابه دیگر مانند آنالیز گیاهچه‌های نخل روغنی حاصل از کشت بافت با استفاده از مارکر مولکولی AFLP مطابقت دارد [۱۰]. بر اساس نتایج این تحقیق، تنوع سوماکلونال یا همان تنوع ایجاد شده در شرایط کشت بافت با پدیده متیلاسیون ژنوم در ارتباط می‌باشد. از سوی دیگر، نوع مارکر انتخابی برای تعیین این تنوع بسیار مهم است. به عنوان مثال، استفاده از مارکر AFLP با دو سیستم هضم آنزیمی مختلف تفاوت محسوسی را بین نمونه نرمال و نمونه‌های غیرنرمال مشخص نمود به طوری که در بررسی الگوهای باندی حاصل از نمونه‌های تکثیر شده با استفاده از ترکیبات آغازگرهای E و M، تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین نمونه‌های باززا شده غیرنرمال مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای نیز، نمونه‌های مورد بررسی را به گونه‌ای دسته‌بندی نمود که نمونه نرمال به طور جداگانه در یک گروه و نمونه‌های غیرنرمال همگی در داخل یک گروه کلی دسته‌بندی شدند. به عنوان یک نتیجه کلی می‌توان علت الگوهای متفاوت برش آنزیمی را به تغییراتی نسبت داد که در طی مراحل مختلف کشت بافت، تحت شرایط متفاوت هورمونی و واکشت‌های متوالی، ممکن است در ساختار ژنوم رخ داده باشد همچنین وقوع چنین تغییرات ژنتیکی در شرایط کشت دورن شیشه‌ای امکان ویژه‌ای در ایجاد ژنوتیپ‌هایی با خصوصیات جدید را فراهم می‌سازد که به منظور استفاده از آن می‌توان با اعمال تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف اقدام به شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های مورد نظر نمود. از سوی دیگر تحقیقات گذشته به منظور تولید متابولیت‌های ثانویه نشان داده است که درصد تولید اسانس در کشت درون شیشه‌ای رازیانه به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش نشان می‌دهد [۱۹، ۱۸، ۱۷]. این کاهش ناشی از خاموشی ژن‌های پایین دست مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه به دلیل تمایز نیافتگی در کشت درون شیشه و همچنین نبود سیگنال‌های القاءکننده مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز بیانگر این موضوع بود که با وجود تولید اسانس در کشت درون شیشه‌ای عملکرد متابولیت‌های ثانویه ارزشمند بسیار کم بود. همچنین نتایج سایر تحقیقات نشان داد که تنها در گیاهان باززا شده‌ای

که به گل رفته‌اند متابولیت Anethole تولید شده است [۱۹]. با توجه به تولید اسانس در کشت درون شیشه به نظر می‌رسد که با کاربرد الیسیتورهایی مانند متیل جاسمونات، کیتوزان و دوره‌های نوردهی بایستی در راستای تولید و افزایش میزان متابولیت‌های مهم گام برداشت.

منابع

1. Zargari A. Medicinal plants. Volume 1. *Tehran University of Medical Sciences* 1988, pp: 481.

2. Omidbeigi R. Approaches for production and processing of medicine herbs. 2nd Volume, *Tarahan- e Nashr Publication*. 1997, pp: 300 - 420.

3. Gaj MD. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant Growth Regul*. 2004; 43: 27 - 47.

4. Lambe P, Mutambel H, Fouche J, Deltour R, Foidart J and Gaspar T. DNA methylation as a key process in regulation of or-ganogenic totipotency and plant neoplastic progression. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 1997; 33: 155 – 62.

5. Lukens LN and Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement. *Curr. Opin Plant Biol*. 2007; 10: 317 - 22.

6. Negezahayo F, Dond Y and Liu B. Somaclonal variation at nucleotide sequence lenel in rice (*Oryza sativa* L.) at revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis. *Appl Genet* 2007; 48: 329 - 36.

7. Martins M, Sarmento D and Oleveira MM. Genetic stability of micropropagted almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep*. 2004; 23: 492 – 6.

8. Pourjabar A, Mohammadi SA, Khosroshahli M, Motalebi AR and Ziai SA. Optimization of in vitro culture of Milk Thistle (*Silybum marianum*) and analysis of somaclonal variation by RAPD markers. *Journal of Plant Physiology and Breeding* 2009; 19 (2): 95 - 106.

9. Pontaroli AC and Camadro EL. Somaclonal variation in Asparagus officinalis plants regenerated by organogenesis from long term callus cultures. *Genetic and Molecular Biology* 2005; 28 (3): 423 - 30.

10. Lei CP, Jiun KS, Choo CS and Singh R. Analysis of tissue culture – derived regenerants using methylation sensitive AFLP. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnol*. 2006; 14 (2): 47 - 55.

11. Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep*. 1983; 1: 19.

12. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 2005; 21: 4414 - 70.

13. Adams RP.Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry.Allured Publishing Corporation Carol Stream, IL. 2001, pp: 456 - 63.

14. McLafferty FW and Stauffer DB. The Wiley / Nbs registry of mass spectral data. New York: Wiley. 1989, pp: 163 - 81.

15. Lubberstedt T, Melchinger AE, Duble C, Vauylsteke M and Kupie M. Relationship among U. S. maize inbreds: IV Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. *Crop. Sci*. 2009; 31: 893 - 9.

16. De Riek J, Calsyn E, Everaert I, Van Bockstaele E and De Loose M. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness,

Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theor Appl Genet*. 2001; 103: 1254 – 65.

17. Anzidei M. *In vitro* culture of *Foeniculum vulgare*: callus characteristic in relation to morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1996; 45: 263 - 8.

18. 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.

19. 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.

Genetic and Phytochemical Evaluation of Tissue Culture-derived Plants in Fennel (*Foeniculum vulgar*) under Different Concentrations of Growth Regulators

Shooshtari L (Ph.D.)[1], Etminan A (Ph.D.)[1], Mehrafarin A (Ph.D.)[2], Qaderi A (Ph.D.)[3*]

1- Department of Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
2- Cultivation & Development Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
3- Biotechnology Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Biotechnology Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, P.O.Box: 31375-1369, Karaj, Iran
Tel: +98-26-34764010-18, Fax: +98-26-34764021
Email: Ardeshir582003@yahoo.com

Abstract

Background: The genetic diversity among plants derived from tissue culture is called somaclonal variation, which provides a valuable source of genetic variation for the improvement of medicinal plants.

Objective: The present study was conducted to investigate the efficiency of molecular markers in detection of somaclonal variation and to assess the importance of DNA methylation in occurrence of genomic changes.

Methods: The genomic DNA of a normal plant and eight abnormal regenerated plants from calluses cultured in different conditions were extracted using modified Delaporta method. The AFLP procedure was performed with application of two different double digestion methods using restriction enzymes. The digested fragments were ligated to appropriate adaptors and amplification was carried out using appropriate primers. *Also percentage and component of essential oil were indicated by GC/MS analysis.*

Results: Analysis of banding patterns showed high differences in amount of polymorphism detected between two different double digestion methods. According to the results of cluster analysis based on the Jaccard's similarity coefficient, all tested plants divided into two main group. While the first group contained only normal sample, other abnormal samples were placed in the second group. Phytochemical analysis showed that the important secondary metabolites such as Limonene, Fenchone, Estragole ,Anethole didn't produce in *invitro* culture condition. In contrast some metabolites like Cineol, Terpineol, 2,4 Decadienal produce just in invitro culture.

Conclusion: The results indicated that the used method has the potential to be used for assessment of somaclonal variations in regenerated plants. Additionally, considering characters of served enzymes in this study, phenotypic variations in abnormal plants that are resulted from somaclonal variation can be related to genome methylation.

Keywords: ***Foeniculum vulgar*, Methylation, Somaclonal variation, Tissue culture**