

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 216 «С». 2023.15.02. 3 ПЗ

НУБІП України

КОСОЛАП СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

2023 р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 57.085.23

НОГОДЖЕНО
Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та
екології

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувача кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

Коломієць Ю.В. 2023 р. Кваско О.Ю. 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему «Регенерація проростків фенхелю (*Foeniculum vulgare* Mill.) *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу»

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Керівник кваліфікаційної магістерської роботи

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.

(підпис)

(ПІБ)

Коломієць Ю.В.

(підпис)

(ПІБ)

Виконав

Косолап С.М.

(підпис)

(ПІБ студента)

КНІВ-2023

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

2023 р.

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Косолапа Сергія Миколайовича
(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Регенерація проростків фенхелю (*Foeniculum vulgare* Mill.) *in vitro* шляхом непрямого морфогенезу»

Затверджена наказом ректора НУБіП України від 15.02.2023 р. №216 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 1 листопада 2023 р.

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи регулятори росту, живильні середовища, рослини

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Одержання стерильних проростків з насіння *Foeniculum vulgare*
2. Індукція калюсних тканин *Foeniculum vulgare*
3. Регенерація *in vitro* *Foeniculum vulgare*
4. Вплив взаємодії НОК та БАП на вагу калюсу фенхелю

Перелік графічного матеріалу:

Дата видачі завдання 1 вересня 2022 року

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Реферат

Робота виконана на 43 сторінках, містить 3 розділи, 6 рисунки, 4 таблиці, 32 використаних джерел.

мета нашої роботи дослідження простого та ефективного способу індукції калусної тканини рослин фенхелю *in vitro* на середовищі мурасіге та скуга (ms) за використання різних концентрацій регуляторів росту.

Регулятори росту нафтилоцтова кислота (нок) і банзиламінопурин (бап) використовувалися в концентраціях (0,5, 1 і 1,5 мг/л) для кожного гормону,

щоб досягти їхньої найкращої концентрації. Частина рослин (стебла, листя), отримані з рослин, які одержали із стерильного насіння, культивували *in vitro*.

Результати показали, що стеблові експлантати дали найкращий результат порівняно з листковими експлантатами у відсотках частоти індукції калусу

(суха та свіжа вага). Взаємодія між типами експлантів і регуляторами росту рослин у середовищі показала, що за культивування стеблових експлантів

на середовищі (1 мг нок + 1 мг бап) дає найвищий відсоток індукції калусу сухої та свіжої маси калусу.

Органогенез був досягнутий у фенхелю (*foeniculum vulgare mill.*) з використанням експлантату гіпокотилів з пророслих *in vitro* саджанців.

Банзиламінопурин, нафтилоцтова кислота та індолілоцтова кислота здатні індукувати регенерацію пагонів, але ефект комбінації банзиламінопурину з

нафтилоцтовою кислотою був більш вираженим. Висоочастотну регенерацію пагонів (8 пагонів на експлант) отримано на комбінації

банзиламінопурину 0,1 мг/л, нафтилоцтової кислоти 0,1 мг/л та індолілоцтової кислоти 0,5 мг/л. Взаємодія банзиламінопурину з нафтилоцтовою кислотою та

індолілоцтовою кислотою призводила до збільшення кількості регенованих пагонів. Спостерігалася інша морфологія калусу, але вона не мала зв'язку з

потенціалом регенерації.

Вступ	НУБІП У КРАЇНИ	6
Розділ 1. Огляд літератури	НУБІП У КРАЇНИ	8
1.1. Ботанічний опис <i>Foeniculum vulgare</i>	НУБІП У КРАЇНИ	8
1.2. Хімічний склад і харчова цінність фенхелю	НУБІП У КРАЇНИ	10
1.3. Традиційне та сучасне використання	НУБІП У КРАЇНИ	14
1.4. Фітохімія <i>Foeniculum vulgare</i>	НУБІП У КРАЇНИ	16
1.4.1. Лєтронї сполуки	НУБІП У КРАЇНИ	17
1.4.2. Флавоноїди	НУБІП У КРАЇНИ	18
1.4.3. Фенольні сполуки	НУБІП У КРАЇНИ	19
1.5. Фармакологічна дія	НУБІП У КРАЇНИ	20
Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень	НУБІП У КРАЇНИ	25
2.1. Стерилізація рослинного матеріалу	НУБІП У КРАЇНИ	25
2.2. Пророщування насіння	НУБІП У КРАЇНИ	25
2.3. Індукція калюсу	НУБІП У КРАЇНИ	25
2.4. Регенерація <i>in vitro</i>	НУБІП У КРАЇНИ	26
2.5. Культивування мікророзмножених проростків <i>in vivo</i>	НУБІП У КРАЇНИ	28
Розділ 3. Результати досліджень	НУБІП У КРАЇНИ	29

3.1. Одержання стерильних проростків з насіння <i>Foeniculum vulgare</i>	29
3.2. Індукція калюсних тканин <i>Foeniculum vulgare</i>	31
3.3. Регенерація <i>in vitro</i> <i>Foeniculum vulgare</i>	35
3.4. Вплив взаємодії НОК та БАП на вагу калюсу фенхелю	38
Висновки	42
Список використаних джерел	43

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

ВСТУП

Foeniculum vulgare – це найстаріша дійсна назва в межах роду *Foeniculum* для рослини, яку Карстен назвав *Foeniculum Foeniculutn*. Однак, згідно з міжнародними правилами номенклатури, біноміальна назва *Foeniculum vulgare* не була належним чином опублікована Хіллом у його довідці [1] з тієї причини, що він не послідовно приймав біноміальну систему номенклатури.

Згідно з міжнародними правилами, прийнятими в Кембриджі, назва *Foeniculum vulgare* має належати Філіпу Міллеру, який вперше правильно опублікував її у восьмому виданні свого «Словника садівників» у 1768 році. Відтоді назва цієї рослини є записується як *Foeniculum vulgare* Mill. Це лікарська рослина, що належить до родини зонтичних (*Ariaceae*), відома і використовується людьми з давніх часів завдяки своїм смаковим властивостям. Культивувався майже в кожній країні [2]. Він загальновідомий як фенхель і відомий під більш ніж 100 назвами.

Це традиційна і популярна трава з довгою історією використання як ліки. Серія досліджень показала, що *F. vulgare* ефективно контролює численні інфекційні захворювання бактеріального, грибного, вірусного, мікобактеріального та протозойного походження [3–7].

Має антиоксидантну, протипухлинну, хіміопротекторну, цитопротекторну, гепатопротекторну, гіполікемічну та естрогенну дії [8–12]. У деяких публікаціях стверджується, що *F. vulgare* має особливий ефект покращення пам'яті та може зменшити стрес [13].

Експерименти на тваринах і обмежені клінічні випробування показують, що тривале вживання *F. vulgare* не шкідливе. Фенхель можна вживати щодня в сирому вигляді у вигляді салатів і закусок, тушкувати, варити, смажити на грилі або запікати в кількох стравах і навіть використовувати для приготування трав'яних чаїв або спиртних напоїв.

Дієта з бажаною кількістю фенхелю може принести потенційну користь для здоров'я завдяки його цінному поживному складу щодо присутності

незамінних жирних кислот [14]. В останні роки підвищений інтерес до підвищення врожайності фенхелю в сільському господарстві завдяки його лікувальним властивостям і вмісту ефірної олії спонукав до культивування рослини у великих масштабах. Дослідження *F. vulgare* за допомогою сучасних технологій проводилися в усьому світі.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ботанічний опис *Foeniculum vulgare*

Фенхель - давня сезонна трава. Рослина фенхель виникла в південному Середземноморському регіоні, і завдяки натуралізації та культивуванню вона росте в дикому вигляді в Північній, Східній та Західній півкулях, зокрема в Азії, Північній Америці та Європі. Культивується на полях, а також росте в дикому вигляді. Ця трава була добре відома стародавнім єгиптянам, римлянам, індійцям і китайцям. Римляни вирощували його заради ароматного насіння, а їстівні м'ясисті пагони все ще є дуже поширеним овочем у південній Італії [21]. Відомо, що імператор Карл Великий заохочував його вирощування в Центральній Європі. Це незамінний інгредієнт сучасної французької та італійської кухні. Усі частини рослини є ароматичними і можуть бути використані різними способами.

F. vulgare — це прямостояча, розгалужена багаторічна трав'яниста рослина (рис. 1.1) з м'яким, пір'ястим, майже схожим на волосся листям, що досягає 6,6 футів (2 м) у висоту. Зовні ця рослина схожа на кріп. Його зазвичай вирощують в овочевих і трав'яних садах (рис. 1.1) через його листя та насіння зі смаком анісу, які зазвичай збирають для використання в кулінарії. Він прямостоячий і циліндричний, яскраво-зелений і гладкий, здається полірованим, з кількома розгалуженими листками (рис. 1.1), розрізаними на найтонші сегменти. Довжина листя досягає 40 см; вони тонкорозсічені, кінцеві частки ниткоподібні (ниткоподібні), шириною близько 0,5 мм. Яскраві золотисті квіти, утворені великими плоскими кінцевими парасольками, з тринадцятьма-двадцятьма променями, розпускаються в липні та серпні (рис. 1.1).



А



Б



Д



Г



Е



В

Рис. 1.1. *Foeniculum vulgare* Mill. (А) у своєму природному середовищі існування; (Б) стебло; (В) листя; (Г) суцвіття та квіти; (Д) фрукти; та (Е) популяція *F. vulgare* Mill.

Стебло смугасте, листя 3-4 перисті, сегменти ниткоподібні, до 1,6 дюйма (4 см) завдовжки; обшивка основи листя. Він має зелене, гладке та слизьке стебло з вертикальними жорсткими гілками та сильно розділеними листками на лінійні сегменти (рис. 1.1). Промені складаються з 5–30 номерів довжиною 0,39–2,4 дюйма (1–6 см). Квіти дрібні, жовті, у великих плоских парасольках (рис. 1.1). Плоди від довгастої до яйцеподібної форми, довжиною 0,12–0,2 дюйма (3–5 мм) і шириною 1,5–2,0 мм (рис. 1.1). На плодах зберігається стилоподій. Плоди подовжені, мають міцні ребра. Найбільш шановані насіння фенхелю мають довжину від трьох до п'яти ліній і є еліптичними, злегка вигнутими та дещо тупими на кінцях (рис. 1.2). Вони зеленувато-жовті, кольору сіна, від чого і походить термін фенхель. Дикі плоди короткі, темного кольору і тупі на кінцях, мають менш приємний смак і запах, ніж у солодкого фенхелю. Насіння дозріває з вересня по жовтень. Ця рослина може розмножуватися фрагментами крони або кореня, але вільно розмножується насінням.



Рис. 1.2. Звичайне насіння фенхелю (а) і насіння фенхелю з цукром і без нього (б), що використовуються в мухвас.

1.2. Хімічний склад і харчова цінність фенхелю

Foeniculum vulgare широко вирощують заради їстівних плодів або насіння. Це солодкі та сухі; повністю стиглий екземпляр – вишуканий п'їд. Фрукти часто сушать для подальшого використання, і цей сушений

фрукт під назвою фенхель є основним предметом торгівлі. У таблиці 1.1 наведено склад поживних речовин фенхелю.

КУБІП Україна

Таблиця 1.2

Живильні речовини, знайдені в сушеному фенхелі (USDA, США).

Композиція	Кількість (на 100 г)
вологість	90,21 г
Енергія	31 ккал
білок	1,24 г
Загальний ліпід (жир)	0,2 г
вуглевод	7,3 г
Загальна кількість харчових волокон	3,1 г
цукри	3,93 г
Кальцій, Ca	49 мг
Залізо, Fe	0,73 мг
Магній, Mg	17 мг
Фосфор, P	50 мг
Калій, K	414 мг
Натрій, Na	52 мг
Цинк, Zn	0,2 мг
Вітаміни	
Вітамін C	12 мг
Тіамін B-1	0,01 мг
Рибофлавін B-2	0,032 мг
Ніацин B-3	0,64 мг
Вітамін B-6	0,047 мг
Фолієва кислота	27 гμ
Вітамін A	48 гμ
Вітамін E	0,58 мг
Вітамін K	62,8 гμ

Н	Ліпіди		
	Жирні кислоти, загальні насичені	0,09 г	
	Жирні кислоти, загальні мононенасичені	0,068 г	
Н	Жирні кислоти, загальні поліненасичені	0,169 г	
	Незамінні амінокислоти		
	лейцин	0,63 г	
Н	ізолейцин	0,73 г	
	Фенілаланін	0,45 г	
	Триптофан	0,53 г	
Н	Незамінна амінокислота		
	гліцин	0,55 г	
	Пролін	0,53 г	

Фенхель є одним з найбільших рослинних джерел калію, натрію, фосфору та кальцію. Згідно з даними Міністерства сільськогосподарства США щодо сорту Mission, фенхель найбагатший харчовими волокнами та вітамінами щодо потреб людини. У них менша кількість багатьох інших поживних речовин.

У таблиці 1) і підсумовано хімічний склад і харчову цінність [14] різних частин кропу, а саме пагонів, листків, стебел і суцвіть. Найвищу вологість мають листя та стебла (відповідно 76,36 та 77,46 г/100 г), а найменшу – суцвіття (71,31 г/100 г). Вуглеводи є найбільш поширеними макроелементами в усіх частинах і коливаються від 18,44 до 22,82 г/100 г. Білки, відновлюючи цукри та жири є менш поширеними макроелементами; білків коливався від 1,08 г/100 г у стеблах до 1,37 г/100 г у суцвіттях. Серед усіх частин кропу найвищий вміст жиру (1,28 г/100 г) та відновного цукру (1,49 г/100 г) виявлено у суцвіттях та стеблах відповідно. На основі приблизного аналізу можна

підрахувати, що свіжа порція 100 г цих частин дає в середньому 94 Ккал енергії. Найвищі значення отримано для суцвіть,

Близько двадцяти однієї жирної кислоти було ідентифіковано та кількісно визначено у вищезгаданих частинах фенхелю. Це капронова

кислота, каприлова кислота, капрінова кислота, ундеканова кислота,

лауринова кислота, міристинова кислота, мірстолеїнова кислота,

пентадеканова кислота, пальмітинова кислота, гептадеканова кислота,

стеаринова кислота, олеїнова кислота, лінолева кислота, α -ліноленова кислота,

арахідова кислота, ейкозанова кислота, цис-11,14-ейкозадієнова кислота, цис-

11,14,17-ейкозатрієнова кислота + генейкозанова кислота, бетенова кислота,

трикозанова кислота та лігноцерінова кислота. Таким чином, Баррос і його

колеги дійшли висновку, що поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) є

основною групою жирних кислот, присутніх у всіх частинах фенхелю. З

іншого боку, Вардавас і його колега повідомили про мононенасичені жирні

кислоти (МНЖК) як про основну групу жирних кислот у фенхелі [22]. Тим не

менш, ненасичені жирні кислоти (НЖК) коливаються від 66% до 80% і

переважають над насиченими жирними кислотами [14]. Найвища

концентрація n-3 жирних кислот виявлена в листі фенхелю, а найменша – у

суцвіттях. Співвідношення ω 6 до ω 3 жирних кислот відіграє важливу роль у

харчуванні людини. Найвищі рівні n-3 жирних кислот, виявлені в листі,

сприяли найнижчому співвідношенню ω 6 до ω 3 жирних кислот. Найнижчий

рівень n-3 жирних кислот, виявлений у суцвіттях, сприяв найвищому

співвідношенню ω 6 до ω 3 жирних кислот.

Фенхель має меншу кількість багатьох інших поживних речовин. За

вагою фенхель містить більше кальцію (49 мг/100 г), ніж яблука (7,14 мг/100

г), банани (3,88 мг/100 г), фініки (25,0 мг/100 г), виноград (10,86 мг/100 г),

апельсин (40,25 мг/100 г), чорнослив (18,0 мг/100 г), родзинки (40,0 мг/100 г),

полуниця (14,01 мг/100 г). Фенольні сполуки є важливою складовою якості

фруктів, оскільки вони впливають на смак, колір і поживні властивості

фруктів. Серед фенольних сполук, проаналізованих у плодах цієї рослини, є

неохлорогенова кислота (1,40%), хлорогенова кислота (2,98%), галова кислота (0,169%), хлорогенова кислота (6,873%), каваова кислота (2,960%), п-кумарова кислота (4,325%), ферулової кислоти-7-о-глюкозид (5,223%), кверцетин-7-о-глюкозид (3,219%), ферулова кислота (3,555%), 1,5-дикафеоїлхінова кислота (4,095%), гесперидин (0,203%), корична кислота (0,131%), розмаринова кислота (14,998%), кверцетин (17,097%), і апігенін (12,558%) [23].

Таким чином, як типовий сезонний свіжий фрукт, фенхель є важливою складовою регіонального раціону Європи та інших регіонів. Різні сорти частин фенхелю широко використовуються в багатьох кулінарних стравах у всьому світі. Пагони, ніжні листя і стебла розжовуються і смоччуться завдяки їх вишуканому смаку анісу. Всі ці частини також зазвичай використовуються як овочі. Сирими їх додають в салати, тушкують з квасолею і нутом, фарширують рибу для гриля, кладуть в супи і хлібні бульйони. Крім приправи, фенхель використовується для консервування їжі. Квіткові стебла, цукор і мед, витримані в коньяку, створюють високо цінний алкоголь. Трав'яні чаї, приготовані зі свіжих ніжних або висушених квітконосів, вживають охолодженими або гарячими, залежно від пори року. *F. vulgare* славиться своєю ефірною олією. Характерний анісовий запах *F. vulgare*, який зумовлений його ефірною олією, робить його чудовим ароматизатором, вишкілки, м'ясних і рибних страв, морозива та алкогольних напоїв. Кулінарне використання фенхелю настільки різноманітне/широко поширене, що він експортувався з країни в країну протягом століть [14].

1.3. Традиційне та сучасне використання

Foeniculum vulgare широко використовується в традиційній медицині для широкого спектру захворювань. Фенхель використовується в різних традиційних системах медицини, таких як Аюрведа, Унані, Сідха, в індійських та іранських традиційних системах альтернативної та балансуєної медицини [20]. Його стебло, плоди, листя, насіння і сама рослина в медицині

використовуються в різних формах для лікування різноманітних захворювань. Методи приготування, використання та застосування *F. vulgare* добре задокументовані в загальній етноботанічній літературі [24-

32]. Наведено етномедичне використання *F. vulgare* для 43 різних типів захворювань у Болівії, Бразилії, Еквадорі, Ефіопії, Індії, Ірані, Італії, Йорданії,

Мексикі, Пакистані, Португалії, Сербії, Південній Африці, Іспанії, Туреччині та США [28, 29, 33-44]. Він використовується для лікування простих захворювань (наприклад, кашлю/застуди, порізів) до дуже складних

захворювань (наприклад, захворювань нирок, раку). Він також має широкий

спектр застосування у ветеринарії [45, 46]. *F. vulgare* використовується в

багатьох частинах світу для лікування низки захворювань, наприклад, болі в животі, протиблювотний засіб, аперитив, артрит, рак, кольки у дітей,

кон'юнктивіт, запор, депуративна, діарея, дієрез, емменагога, лихоманка,

метеоризм, гастралгія, гастрит, безсоння, подразнення товстої кишки,

захворювання нирок, проносе, лейкорей, біль у печінці, виразка ротової порожнини та біль у животі.

Окрім використання в медичних цілях, надземні частини, а саме листя,

стебла та плоди/насіння *F. vulgare*, широко використовуються як галактагоги

не лише для збільшення кількості та якості молока, але й для покращення надходження молока у матерів, які годують грудьми [32, 34, 37, 47]. З давніх часів насіння фенхелю використовувалися як інгредієнт для видалення будь-

якого неприємного запаху з рота [48]. Натуральний світло-зелений барвник,

отриманий з листя, використовується в косметиці, для фарбування текстилю/дерев'яних матеріалів і як харчовий барвник. Жовтий і коричневий

барвники отримують з'єднанням квітів і листя фенхелю [49]. У Португалії, Італії, Іспанії та Індії стебла, плоди, листя, насіння та вся рослина

використовуються як овоч [3, 9, 48, 50, 51]. Насіння фенхелю з цукром і без

нього використовуються в *mukhwas* (освіжувач ротової порожнини). У

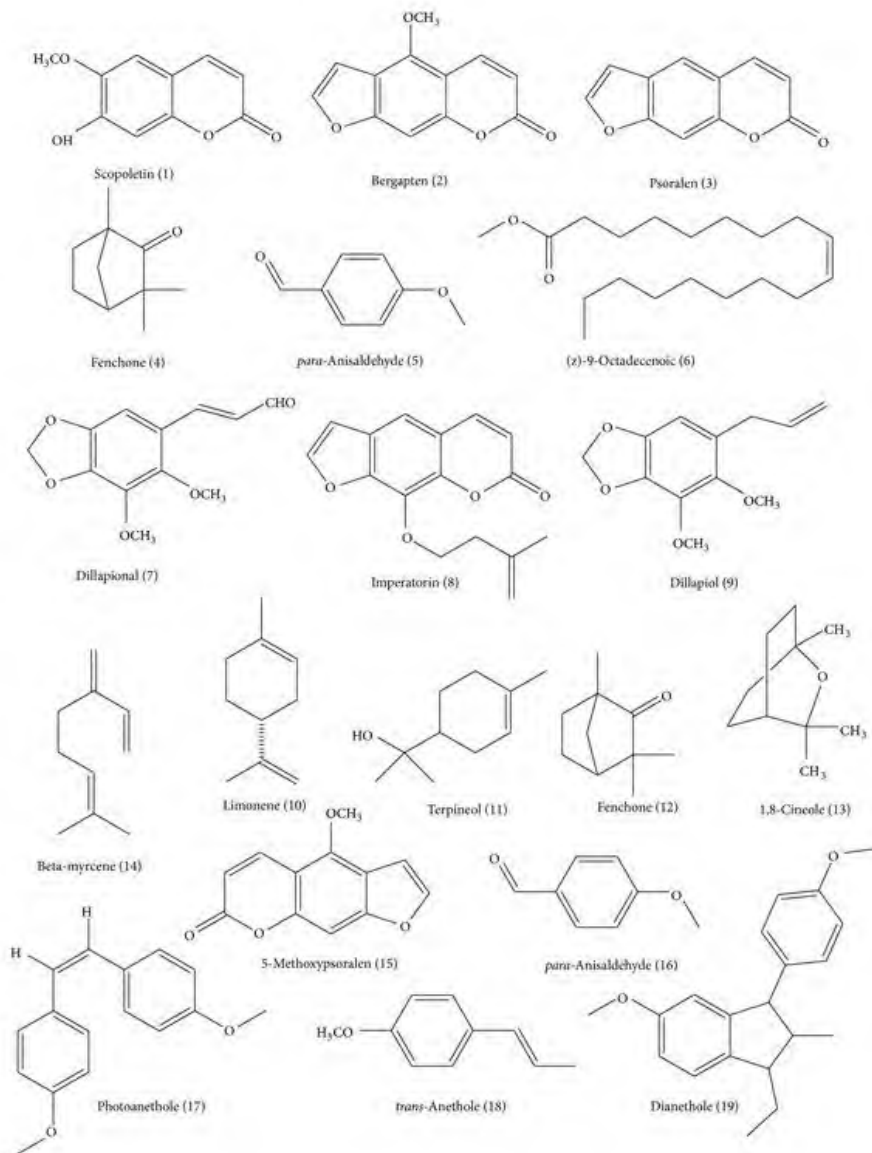
багатьох частинах Індії та Пакистану смажене насіння фенхелю споживають як *mukhwas* (освіжувач ротової порожнини). *Mukhwas* — барвистий освіжувач

ротової порожнини.

рота після їжі або засіб для травлення. Його можна приготувати з різних насіння та горіхів, але часто зустрічається з насінням фенхелю, насінням анісу, кокосом і кунжутом. Вони солодкі на смак і дуже ароматні завдяки наявності цукру та додаванню різних ефірних масел. Насіння може бути пікантним, покритим цукром і яскраво забарвленим.

1.4. Фітохімія *Foeniculum vulgare*

Фітохімічні дослідження, проведені на *Foeniculum vulgare*, призвели до виділення жирних кислот, фенольних компонентів, вуглеводнів, летких компонентів і кількох інших класів вторинних метаболітів з його різних частин (рис. 1.2).



Переважно ці фітохімічні речовини містяться в ефірній олії. Деякі фітокомпоненти *F. vulgare* знайшли застосування як барвники та засоби проти старіння [49, 50]. Вони також мають значну біологічну та фармакологічну активність.

1.4.1. Летючі сполуки

Анісовий запах *F. vulgare* зумовлений вмістом у ньому ефірної олії. Це чудовий ароматизатор для різних типів їжі та харчових продуктів. Повідомлялося, що ефірна олія фенхелю містить більше 87 летючих сполук [51-57]. Накопичення цих летких сполук всередині рослини є змінним, з'являючись практично в будь-якій її частині, а саме в коренях, стеблах, пагонах, квітах і плодах [58, 59].

Guillén і Manzanos [60] досліджували вихід і склад летких компонентів, які містяться в пентанових екстрактах листя, стебел і насіння

F. vulgare. Вони ідентифікували загалом 37 летких сполук із пентанових екстрактів вищезазначених частин фенхелю за допомогою методів газової хроматографії (ГХ) і газової хромато-мас-спектрометрії (ГХ-МС). У надкритичному CO₂ (SC-CO₂) екстрактах насіння фенхелю було ідентифіковано загалом 28 сполук, головними з яких є транс-анетол (68,6–

75,0%), фенхон (8,40–14,7%) і метилхавікол (5,09–9,10%), тоді як лише 19 сполук було виявлено з гідродистильованої олії фенхелю [52]. Fang та ін. [53] характеризує 76 летких компонентів в ефірній олії *F. vulgare* за допомогою

трьох передових методів, а саме мікроекстракції розчинником у вільному просторі з наступною газовою хроматографією-мас-спектрометрією (HSME-GC-MS), твердофазної мікроекстракції (SPME-) GC-MS, і парової дистиляції-(SD-) GC-MS методи. У 2007 році Tognolini та ін. досліджував хімічний склад ефірної олії фенхелю. Дослідження GC/MS показало, що в ньому присутні 18 сполук, а анетол є найбільш поширеним [55]. Порівняльний профіль

зустрічальності монотерпенових вуглеводнів, оксигенованих монотерпенів і фенілпропаноїдів щодо різних стадій зрілості (незрілих, передчасних, зрілих і повністю зрілих) плодів *F. vulgare* повідомили Telci та ін. [56]. Вони прийшли

до висновку, що вміст ефірної олії зменшується зі збільшенням зрілості. Всього ідентифіковано 28 компонентів ефірної олії, що становить 98,6% від загальної кількості олії. Основною сполукою в ефірній олії був транс-анетол (72,2%), потім естрагол (7,6%), d-лімонен (6,8%) і фенхон, тобто 3,9% [61]. Загалом, 60 сполук, що представляють 90,1–98,7% ефірної

олії, були ідентифіковані за допомогою ГХ та ГХ/МС у двох сортах фенхелю, а саме, співкультурних сортах Ауреліо та Спарта. Основним компонентом ефірних масел є транс-анетол (59,8–90,4%). Крім того, ефірні олії фенхелю також містять незначну кількість різних компонентів, таких як лімонен (0,1–

21,5%), неофітален (0–10,6%), (E)-фітол (0,1–6,0%), екзофенілацетат (0,3–3,8%), естрагол (0,1–2,5%) і фенхон, тобто 0,1–3,1% [62]. Крім того, Zoubiri et al. [57] узагальнив порівняльний профіль летючих сполук, знайдених у різних сортах фенхелю з різних країн, таких як Естонія, Норвегія, Австрія, Молдова

та Туреччина. Хімічний склад олії насіння алжирської *F. vulgare* відрізнявся від турецької [51, 56], сербської [52], індійської [54] та китайської [53] кріп. Гексанові екстракти фенхелю були проаналізовані за допомогою GC-MS і 78 сполук були ідентифіковані з цих екстрактів; основні сполуки були

визначені як 1,3-бензолдіол, 1-метоксициклопексен, o-цимол, сорбінова кислота, 2-гідрокси-3-метил-2-циклопентен-1-он, естрагол, лімонен-10-ол і 3-метил-2-циклопентен-1-он [63]. Діао та ін. [64] ідентифікували загалом 28 компонентів за допомогою ГХ

та ГХ/МС з олії фенхелю, що становить 95,8% від загальної кількості. Було встановлено, що основним компонентом є транс-анетол (68,53%), фенілпропанол, за ним йдуть естрагол (10,42%) з лімоненом (6,24%), фенхоном (5,45%) та іншими як другорядними компонентами.

1.4.2. Флавоноїди

Флавоноїди, як правило, вважаються важливою категорією антиоксидантів у раціоні людини. Флавоноїди у великій кількості містяться в рослинах сімейства Аріасеae. Повідомлялося, що наявність флавонолових глікозидів у видах фенхелю пов'язана з його морфологічною гетерогенністю

та варіативністю. Загальний вміст флавоноїдів у водно-спиртових екстрактах становить близько мг/г. Флавоноїди, такі як ериодиктіол-7-рутинозид, кверцетин-3-рутинозид і розмаринова кислота, були виділені з *F.*

vulgare [65]. Серед флавоноїдів, присутніх у *F. vulgare*, найбільш поширеними є кверцетин-3-глюкуронід, ізокверцитрин, кверцетин-3-арабінозид,

кемпферол-3-глюкуронід і кемпферол-3-арабінозид, а також ізорамнетин глюкозид [66]. Повідомлялося, що О-галактозид, кемпферол-3-О-рутинозид і кемпферол-3-О-глюкозид також містяться у водному екстракті *F.*

vulgare [67]. Флавоноїди, такі як ізорамнетин 3-О- α -рамнозид, кверцетин і

кемпферол, також були виділені з етилацетатного екстракту, тоді як кверцетин 3-О-рутинозид, кемпферол 3-О-рутинозид і кверцетин 3-О- β -глюкозид були виділені з екстракту етилацетату. виділені з метанольного екстракту. Ці

флавоноїди виявляють чудову антиноцицептивну та протизапальну активність

[68]. Крім того, повідомлялося, що кверцетин, рутин і ізокверцитрин мають імунomodulatory дію [69].

1.4.3. Фенольні сполуки

Зростає інтерес до фенольних компонентів фруктів і овочів, які можуть сприяти здоров'ю людини або знижувати ризик захворювання. Водний

екстракт плодів фенхелю багатий фенольними сполуками. Багато з них мають антиоксидантну дію та гепатопротекторні властивості. Вважається, що фенольні сполуки, присутні в *F. vulgare*, пов'язані з профілактикою

захворювань, можливо спричинених окисним стресом, таких як серцево-судинні захворювання, рак і запалення. Ці фенольні сполуки привернули

величезну увагу серед дієтологів, харчових науковців та споживачів через їх роль у здоров'ї людини. Повідомлялося, що фенхель містить гідроксильні похідні коричної кислоти, флавоноїдні глікозиди та флавоноїдні аглікони

[67]. Метанольний екстракт насіння фенхелю містить розмаринову кислоту,

хлорогенову кислоту як основні фенольні сполуки (14,9% і 6,8% відповідно), а також кверцетин і апігенін як основні флавоноїди (17,1% і 12,5% відповідно). Крім того, загальний вміст фенольних сполук у метанольному

екстракти фенхелю був вищим, ніж у флавоноїдних сполуках [23]. Повідомлялося, що *F. vulgare* містить фенольні кислоти, такі як 3-О-кофеїлхінова кислота, 4-О-кофеїлхінінова кислота, 5-О-кофеїлхінінова кислота, 1,3-О-ди-кофеїлхінінова кислота, 1,4-О-ді-кофеїлхінова кислота та 1,5-О-ди-кофеїлхінова кислота [65]. Дві сполуки А та В були виділені та охарактеризовані вперше з дикого фенхелю та ідентифіковані як 3,4-дигідроксифенетилацетол-6-О-кофеїл- β -D-глюкопіранозид та 3',8'-бінарингенін відповідно. Загальний вміст фенолів і флавоноїдів у дикому фенхелі (2,4% і 1,2% відповідно) був меншим у порівнянні з культивованим фенхелем (3,1% і 1,6% відповідно) [70].

1.5. Фармакологічна дія

Foeniculum vulgare офіційно зазначено в аюрведичній фармакопеї як важливу частину політравяних композицій для лікування різних захворювань і розладів. Для оцінки місцевого використання *F. vulgare* було проведено низку біологічних і фармакологічних досліджень. Кілька екстрактів *F. vulgare* і ізольовані сполуки були оцінені за кількома діями, а саме антистарінням, протиалергічною, антиколітичною, антигірсутичною, протизапальною, антимікробною та противірусною, антимутагенною, антицицептивною, жарознижуючою, спазмолітичною, антистресовою, антитромботичною, анксиолітичною, апоптотичною, серцево-судинною, хемомодулюючою дією, цитопротекцією а також протипухлинну, цитотоксичну, сечогінну, естрогенну, відхаркувальну, галактогенну, шлунково-кишкову дію, гепатопротекторну, інгібіторну дію на цитохром P450 3A4 в печінці людини, гіпоглікемічну, гіполіпідемічну, покращує пам'ять, ноотропну та окулогіпотензивну дію [11, 13, 20, 50].

Протимікробна та противірусна активність

Foeniculum vulgare використовувався як народний засіб для лікування численних інфекційних захворювань бактеріального, грибового, вірусного та мікобактеріального походження. У минулому було проведено кілька

досліджень, які підтверджують його антимікробний, антимікобактеріальний та противірусний потенціал. Душко та ін. досліджували антибактеріальну дію водного екстракту 12 лікарських рослин родини *Apiaceae*, включаючи

F. vulgare. Водний екстракт надземної частини *F. vulgare* пригнічував ріст *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*, *Erwinia carotovora*,

Pseudomonas fluorescens і *Pseudomonas glycinea*. Водний екстракт зразка насіння пригнічував ріст *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*,

Salmonella typhimurium, *Shigella flexneri* та *Bacillus cereus* з 13–22, 22–24, 14–

24, 20–21, 21–24, 11–12, 14–18, 17–18 і 24–26 мм зони гальмування відповідно

[3, 4]. Gulfranz та ін. досліджували антибактеріальну дію ефірної олії, а також етанольних і метанольних екстрактів плодів *F. vulgare* проти *Bacillus cereus*,

Bacillus megaterium, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia*

coli, *Klebsiella pneumonia*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas*

putida, *Pseudomonas syringae* та *Candida albicans*. Відповідно до результатів,

повідомлених Gulfranz et al., ефірна олія *F. vulgare* мав значну антимікробну дію проти деяких мікроорганізмів порівняно з метанольними та етанольними

екстрактами. Діаметр зони пригнічення росту коливався від 14 до 31 мм

(включаючи діаметр диска 6 мм), при цьому найвищі значення зони

пригнічення спостерігалися проти *Bacillus megaterium* (31 мм) і *Bacillus*

subtilis (29 мм). Роби та ін. [23] досліджували антимікробну дію метанолу,

етанолу, діетилового ефіру та гексану екстрактів насіння *F. vulgare* проти двох

видів грамнегативних бактерій (*Escherichia coli* та *Salmonella typhi*), двох видів

грампозитивних бактерій (*Bacillus cereus* та *Staphylococcus aureus*), один вид

дріжджів (*Candida albicans*) і один вид цвілі (*Aspergillus flavus*). Метанольний

екстракт продемонстрував більш ефективну протимікробну дію, ніж інші

екстракти. Результати методу дискової дифузії з подальшим вимірюванням

мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) показали, що *Bacillus*

cereus і *Aspergillus flavus* були найбільш чутливими досліджуваними

мікроорганізмами, демонструючи найбільші зони інгібування та найнижчі

значення МІК. Найменша активність була виявлена проти *Escherichia coli*, з найменшими зонами інгібування та найвищим значенням МІК [23]. Шривастава і Бхаргава досліджували антибактеріальну дію сирого, хлороформного та метанольного екстракту листя та квітів

F. vulgare разом із *Raphanus sativus* та *Brassica nigrum* проти *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Метаноловий екстракт квітки *F. vulgare* виявляв значну активність проти *Escherichia coli*, тоді як неочищений і хлороформний екстракти не проявляли антимікробної активності проти *Staphylococcus*

aureus. Серед різних протестованих штамів бактерій метанольний екстракт плодів *F. vulgare* пригнічував ріст *Staphylococcus aureus* та *Bacillus pumilus* із зоною інгібування 11,27 та 12,67 мм відповідно [7].

У літературі також повідомляється про кілька досліджень, які вказують на протигрибкову дію *F. vulgare* разом з антибактеріальним ефектом. Мартінс

та ін. досліджували антибактеріальну та протигрибкову дію трьох ефірних олій португальських рослин, а саме *Foeniculum vulgare*, *Mentha spicata* та *Rosmarinus officinalis* проти *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*

epidermidis, *Candida albicans* і фітопатогенні плісняви, *Aspergillus niger* і *Fusarium oxysporum*. Ефірна олія *F. vulgare* показала значну протигрибкову активність проти грибів, що псують харчові продукти, *Aspergillus niger* і *Fusarium oxysporum*, і може мати важливе

застосування як харчові добавки. Значення МІК ефірної олії *F. vulgare* становили 250 мкг/мл для *Fusarium oxysporum* і 750 мкг/мл для *Aspergillus niger*.

Олії, витягнуті з *F. vulgare*, демонструють різні рівні протигрибкової дії на експериментальний ріст міцелію *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* та *Rhizoctonia solani*. Ефірна олія *F. vulgare* показала значну протигрибкову активність проти штамів патогенних грибів, а

саме *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* та *Rhizopus solani*. Екстракти дихлорметану та ефірні олії з *F. vulgare* показали протигрибкову дію проти *Candida albicans*. Це може бути потенційним кандидатом на новий

протигрибковий засіб для лікування кандидозу та інших грибкових захворювань. У дослідженні *in vitro* водні та спиртові екстракти насіння *F. vulgare* виявляв інгібуючий ефект проти *Alternaria alternata*, *Mucor rouxii* та *Aspergillus flavus*. Цікаво, що водний екстракт насіння *F. vulgare* продемонстрував найсильнішу протигрибкову дію порівняно з еталонним фунгіцидним агентом, тобто гризеофульвіном.

Усі вищезазначені дослідження проводилися на сирих екстрактах, і важко точно визначити активний протимікробний метаболіт. Було виявлено, що похідне фенілпропаноїду під назвою дилапіонал, охарактеризоване зі стебла *F. vulgare*, є антимікробним компонентом зі значеннями MIC 125, 250 і 125 проти *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* і *Cladosporium cladosporioides* відповідно. Похідне кумарину, скополетин, також було виділено як незначний антимікробний агент. Характеристика семи різних типів оксигенованих монотерпенів із сирого екстракту метиленхлориду *F. vulgare*, припустив, що неочищений екстракт, що містить монотерпени, може бути новим лікарським ресурсом для антибактеріальних засобів.

Всього 78 сполук було ідентифіковано з активної антимікобактеріальної фракції *F. vulgare* за допомогою газової хромато-мас-спектрів (ГХ-МС). З них двадцять сполук було протестовано проти одного чутливого та трьох мультирезистентних штамів *Mycobacterium tuberculosis* за допомогою мікроаналізу Alamar Blue. Сполуки, які показали певний ступінь антимікобактеріальної активності проти всіх досліджуваних штамів, були наступними: лінолева кислота (MIC 100 мкг/мл), олеїнова кислота (MIC 100 мкг/мл), 1,3-бензолдіол (MIC 100–200 мкг/мл), ундеканал (MIC 50–200 мкг/мл) і 2,4-ундекадієнал (MIC 25–50 мкг/мл). 2,4-ундекадієнал був найактивнішою сполукою проти мультирезистентних видів *M. tuberculosis*. Таким чином, дієтичне споживання *F. vulgare* може знизити ризик інфекції *M. tuberculosis* [63].

Орхан та ін. [5] вивчали противірусну активність ефірної олії зразка плодів *F. vulgare* разом з 12 іншими турецькими лікарськими рослинами проти

ДНК вірусу простого герпесу типу 1 (HSV-1) і РНК вірусу парагрипу типу 3 (PI-3). Більшість олій і сполук показали сильну протівірусну дію проти HSV-1, коливаючись від 0,8 до 0,025 мкг/мл. Проте перевірені зразки були менш

ефективними проти PI-3, результати коливалися від 1,6 до 0,2 мкг/мл. Лише ефірні олії *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* (повністю зрілого), *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Ocimum minutiflorum*, *Ocimum vulgare* і *Satureja cuneifolia* значно інгібували цей вірус.

Усі ці літературні дані підтвердили традиційне використання *Foeniculum vulgare* при інфекційних захворюваннях, таких як

біль у животі, протиблювотний засіб, артрит, кон'юнктивіт, запор, депуративна хвороба, діарея, дірез, лихоманка, метеоризм, гастралгія, гастрит, безсоння, подразнена кишка, виразка ротової порожнини, біль у

животі, захворювання дихальних шляхів, шкірні захворювання і так далі. Завжди існує потреба в нових антимікробних агентах через швидкий

розвиток резистентності. Біоактивні метаболіти *F. vulgare* можуть бути потенційним джерелом нових антимікробних агентів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

НУБІП УКРАЇНИ

2.1. Стерилізація рослинного матеріалу

Насіння стерилізували, занурюючи їх у 70% етиловий спирт на різні періоди 1, 2, 3 і 4 хвилини, а потім переносили в 5% комерційний розчин гіпохлориту (Clorox®) і витримували протягом різних періодів 10, 15, 20, 25 і 30 хвилин. В ламінарному боксі гіпохлорит натрію зливали з насіння, потім насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою перед перенесенням на середовище для пророщування.

НУБІП УКРАЇНИ

2.2. Пророщування насіння

Стерилізоване насіння переносили в банки (5 насінин/банку), що містили тверде безгормональне живильне середовище такого складу MS (Murashige і Skoog) (30 г/л сахарози та 8 г/л агару) або переносили в той самий склад середовища з додаванням до 50 мг/л розчину гіберіклової кислоти як активатора росту. Кришку кожної банки загортали пара-плівкою та інкубували в кімнаті для вирощування при 25°C і фотоперіоді 16 годин флуоресцентного світла та 8 годин темряви. Схожість насіння досліджували за відсотком

НУБІП УКРАЇНИ

схожості насіння за такою формулою:

Відсоток схожості насіння = $\frac{\text{Кількість пророслого насіння}}{\text{Загальна кількість насіння}} \times 100\%$

НУБІП УКРАЇНИ

2.3. Індукція калюсу

Проростки віком 30-35 днів, отримані з насіння, пророщеного на твердих середовищах MS, розрізали в асептичних умовах на шматки листя, стебла і корені довжиною 4-6 мм, які використовували як джерело експлантів.

Експланти культивували на стерильному твердому MS середовищі, доповненому різними регуляторами росту, включаючи нафтилонову кислоту (НОК), 6-бензиламінопурин (БАП), 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту (2,4-Д), кінетин (КН) і тидіазурон (TDZ) у різних комбінаціях і концентраціях, таких

НУБІП УКРАЇНИ

як як (2,4-Д 0,5 мг/л + КІН 0,1 мг/л), (2,4-Д 0,5 мг/л + КІН 0,5 мг/л), (2,4-Д 1 мг/л + КІН 0,5 мг/л), (2,4-Д 1 мг/л + КІН 1 мг/л), (2,4-Д 2 мг/л + КІН 1 мг/л), (2,4-Д 2 мг/л + БАП 0,25 мг/л), (НОК 1 мг/л + КІН 1 мг/л), (НОК 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) та (TDZ 0,5 мг/л

+ 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) для ініціації калюсу. Кожна обробка складалася

з п'яти експлантів на банку з чотирма повторами. Усі культури інкубували в кімнаті для вирощування при температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$ і фотоперіоді 16 годин світла та 8 годин темряви. Індукцію та підтримку калюсу досліджували за

трьома параметрами: час індукції калюсу, відсоток індукції калюсу та

швидкість росту калюсу. Час індукції мозолі — це кількість днів, що пройшли до утворення калюсу. Відсоток індукції калюсу розраховується за такими формулами:

Відсоток індукції калюсу = Кількість утвореного калюсу / загальна

кількість культивованих експлантів $\times 100$

Швидкість росту калюсу представлена загальною свіжою вагою (мг) у різні часові проміжки (дні), яка була розрахована шляхом доведення ваги всіх мозолів, отриманих усіма раніше згаданими фітогормональними

комбінаціями, до 1000 мг, після чого відстежували та розраховували

збільшення свіжої ваги калюсу через різні проміжки часу (10, 20, 30 і 40 днів).

2.4. Регенерація *in vitro*

Мікророзмноження передбачає прямі та непрямі методи, які дозволяють

клональне розмноження *in vitro* частин або навіть клітин потрібної рослини до

цілої рослини. Прямі методи спрямовані на отримання клонів рослини

безпосередньо з меристематичної тканини та бруньок шляхом прямого

органогенезу та соматичного ембріогенезу. Непрямі методи передбачають

виробництво калюсу, за допомогою якого можна виготовити цілу рослину за

допомогою двох описаних вище методів.

Пряме мікророзмноження

Пряме мікророзмноження рідко; це передбачає пряме відростання або укорінення з бруньок або іншої меристематичної тканини. Це повинно відбуватися під впливом різних фітогормонів. *Foeniculum vulgare*, одержані рослини, розрізали на різні експланти корінь, стебла та листя та піддавали впливу різних типів фітогормонів та їх комбінацій, як раніше згаданих гормонів. І культивували на MS твердому середовищі при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ і 16-годинному фотоперіоді або на середовищі, що містить сахарозу, або на середовищі без сахарози та періодично досліджується макроскопічно та мікроскопічно для виявлення будь-яких ознак органогенезу або соматичного ембріогенезу.

Непряме мікророзмноження

Після того, як калус був успішно отриманий, що представляє етап I непрямого мікророзмноження, почався етап II, який включав одержання з пагонів, коренів або з клітин калусу соматичних ембріонів. Для індукування органогенезу або ембріогенезу до різних клітин калусу, застосовували різні умови. Фітогормони використовували як поодинокі, так і в комбінаціях з різними концентраціями, а середовища, вільні від гормонів, також використовували з високою інтенсивністю світла, щоб індукувати фотосинтез у клітинах калусу і, таким чином, стимулювати клітини до диференціювання в клітини-стріляки. Середовище лише з ауксинами використовували для індукування укорінення, середовища лише з цитокиїнами використовували для індукування пагоноутворення, а також деякі калуси перенесли на середовище без гормонів. У кожному дослідженні клітини калусу досліджували під мікроскопом для виявлення одержання соматичних ембріонів.

Деякі рослини помістили в пробірки, що містили гормональне рідке середовище з ауксином (НОК 1 мг/л), і дно пробірки закрили целофаном, оскільки темрява сприяє індукції коріння, і пробірки інкубували протягом 30 днів у кімнаті для вирощування при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ і 16 годин світлового періоду.

2.5. Культивування мікророзмножених проростків *in vivo*

Рослини поміщали в перфоровані горщики, що містять автоклавований азбестовий ґрунт, і всі горщики накривали прозорими пластиковими пакетами для підтримки високої вологості та забезпечення легкого освітлення. Горщики

поміщали в кімнату для вирощування при температурі $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ і фотоперіоді

16 годин світла та 8 годин темряви. Через два дні прозорі пластикові пакети

були перфоровані. Кожен горщик зрошували кожні два дні невеликою кількістю води. Через сім днів прозорі поліетиленові пакети зняли.

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

НУБІП Україна

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Одержання стерильних проростків за насіння *Foeniculum vulgarese*

Насіння *Foeniculum vulgarese*, стерилізовані в різні часові проміжки 70% етиловим спиртом та комерційним гіпохлоритом (5%), культивували на безгормональних середовищах або з 50 мг/л розчину гіберилової кислоти на твердому чи напівтвердому середовищі, а також у чашках Петрі, що містили фільтрувальний папір, зволожений або стерильною дистильованою водою, або стерильним рідким безгормональним середовищем, або 50 мг/л розчином гіберилової кислоти та культивували у кімнаті для вирощування при 25°C і фотоперіоді 16 годин світла та 8 годин темряви.

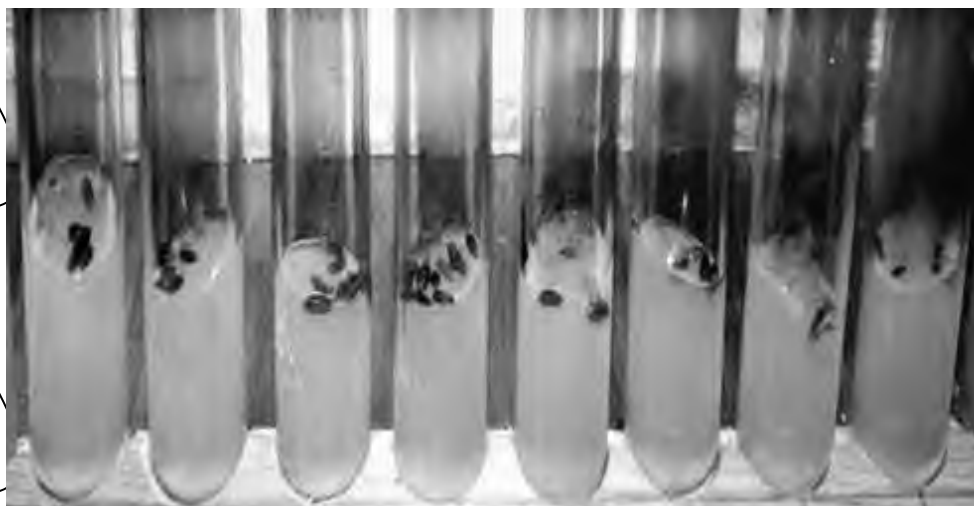


Рис. 3.1. Насіння, культивоване на середовищі (MS).

Відсоток проростання насіння наведено в таблиці 3.1. Результати показують, що занурення в етиловий спирт (70%) на 1 і 2 хвилини з подальшим зануренням у гіпохлорит натрію на 10, 15 і 20 хвилин було недостатньо ефективно, але деяке насіння було бактеріальне або грибне забруднення, але занурення в етиловий спирт (70%) на 3 і 4 хвилини разом із подальшим зануренням в гіпохлорит натрію на 25 і 30 хвилин не показали забруднення, але різні відсотки проростання. Лише занурення в етиловий спирт (70%) на 3

хвилини разом із зануренням у гіпохлорит натрію на 25 хвилин показало повне проростання без забруднення. Крім того, було встановлено, що збільшення часу стерилізації більшою мірою пригнічує поверхню деяких насіння, знижуючи швидкість проростання. Такі ж спостереження були отримані при використанні 50 мг/л розчину гіберилової кислоти без будь-яких змін у часі проростання насіння або відсотку проростання.

Таблиця 3.1.

Результати випробувань на схожість із відсотком схожості насіння через 30 днів спостережень.

70% етанол	Хлорол				
	10 хв	15 хв	20 хв	25 хв	30 хв
1 кв	інфекція	інфекція	інфекція	Незначна інфекція	Незначна інфекція
2 хв	інфекція	інфекція	незначна інфекція	Незначна інфекція	Незначна інфекція
3 хв	інфекція	інфекція	незначна інфекція	стерильно 97% схожіть	стерильно 55% схожіть
4 хв	інфекція	Незначна інфекція	стерильно	стерильно	стерильно
		через 5 днів	68% схожість	45% схожість	7% схожіть

3.2. Індукція калюсних тканин *Foeniculum vulgarese*

Отримані проростки використовували як експланти для одержання калюсу. Індукцію калюсу вивчали з використанням різних параметрів, таких як відсоток індукції калюсу (частота калюсогенезу), термін індукції калюсу та швидкість росту калюсу, вимірювання ваги та діаметру калюсу. У нашому дослідженні використовувалися різні фітогормони та комбінації фітогормонів, а результати з утворення калюсу наведено в таблиці 3.2 і на рисунку 3.1

Таблиця 3.2.

Частота калюсогенезу на різних експлантатах проростків за різних комбінацій регуляторів росту

Середовище	Корінь	Пагін	Листя
2,4-Д 0,5 + КІН 0,1	95±2	88±2	92±2
2,4-Д 0,5 + КІН 0,5	94±2	93±2	90±2
2,4-Д 1,0 + КІН 0,5	46±1	91±2	47±1
2,4-Д 1,0 + КІН 1,0	97±2	94±2	97±3
2,4-Д 2,0 + КІН 1,0	96±2	97±1	88±2
2,4-Д 2,0 + БАП 0,25	94±2	95±1	87±2
НОК 1,0 + КІН 1,0	75±1	76±1	77±1
НОК 1,0 + БАП 0,1	95±2	94±2	95±3
ТДЗ 0,5 + 2,4-Д 1,0 + БАП 0,1	96±2	93±2	96±3

Загалом стебло, корінь і сім'ядольні листки можуть індукувати утворення калюсу, але очевидно, що експланти стебла були основним експлантатом, який найкраще ініціював калюс над іншими корневими та листовими експлантатами. Також комбінації регуляторів росту (2,4-Д 1 мг/л + КІН 1 мг/л), (НОК 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) та (ТДЗ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) були найкращими для ініціації калюсу порівняно з іншими комбінаціями регуляторів росту. Час індукції калюсу наведено на рисунку 3.2 і в таблиці 3.3.

НУ

НУ

НУ

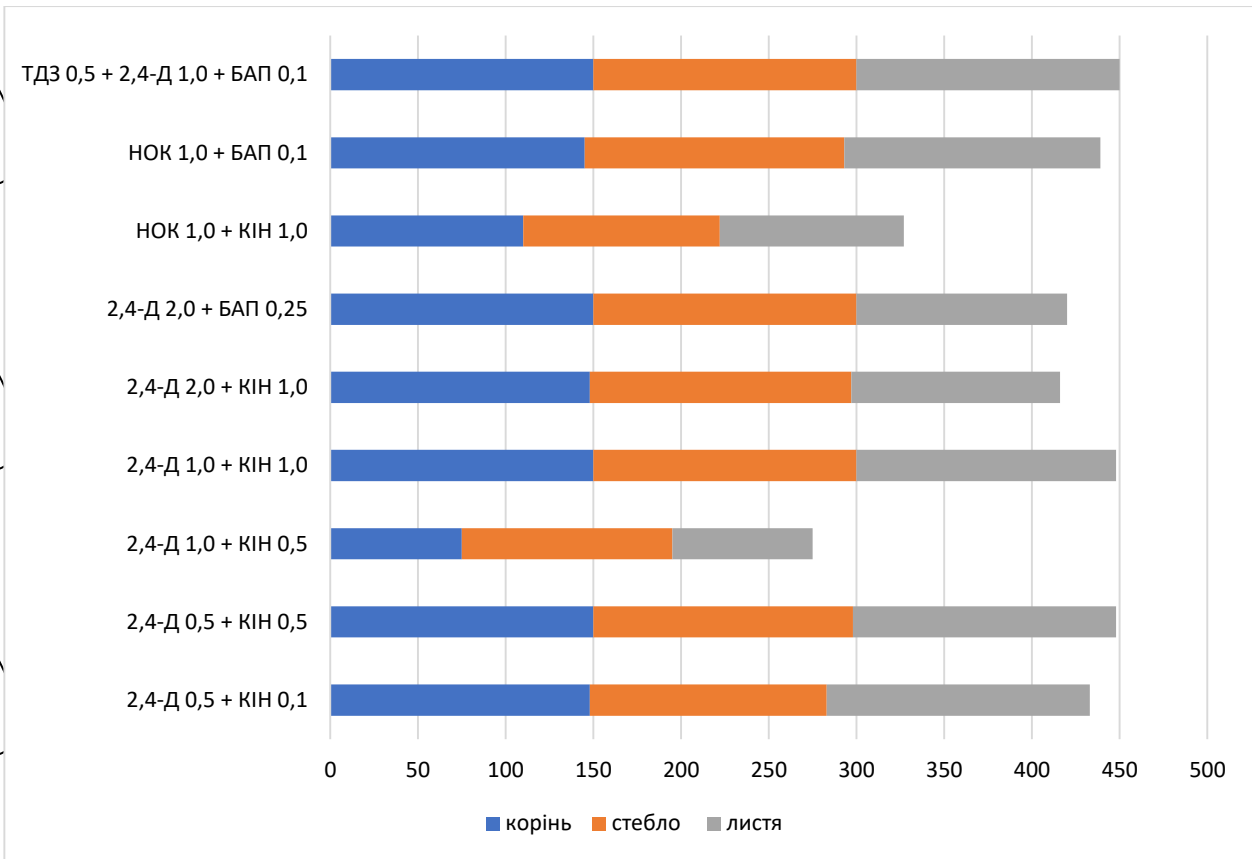


Рис. 3.2. Вага каллосу різних експлантатів за різних комбінацій регуляторів росту

НУ

НУ

НУ

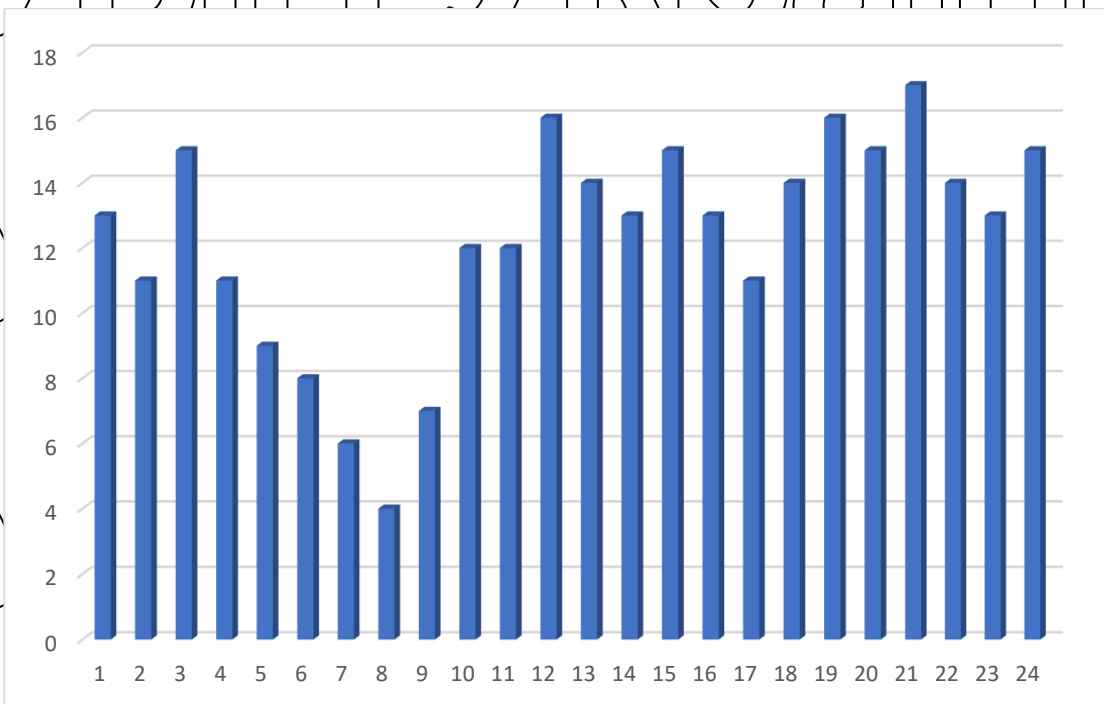


Рис. 3.3. Індукція каллусогенезу, доба
Усі згадані раніше комбінації регуляторів росту здатні індукувати калусну тканину, але комбінація регуляторів росту TDZ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л

НУ

мг/л + БАП 0,1 мг/л найшвидше індукувала утворення калюсу, з дещо нищою швидкістю індукцію калюсу спостерігали за комбінації 2,4-Д 2 мг/л + БАП 0,25 мг/л.

Швидкість росту калюсу

Швидкість росту калюсу відстежували та розраховували через різні проміжки часу (10, 20, 30 і 40 днів) на різних комбінаціях регуляторів росту, як показано в таблиці 3.3 і на рисунку 3.3.

З проілюстрованої кривої росту найкращими використаними комбінаціями регуляторів росту були TDZ 0,5 мг/л + 2,4-D 1 мг/л + ВАР 0,1

мг/л і 2,4-D 2 мг/л + ВАР 0,25 мг/л, що показав значно виражену швидкість росту більше, ніж інші комбінації регуляторів росту.

Усі одержані первинні калюси, пасирували на те саме середовище з тими ж комбінаціями регуляторів росту, що ініціювали їх, та інкубували протягом

30 днів у тих самих умовах. Не всі комбінації регуляторів росту здатні

підтримувати ріст калюсу. Тільки комбінації регуляторів росту (2,4-Д 0,5 мг/л + КІН 0,1 мг/л), (2,4-Д 0,5 мг/л + КІН 0,5 мг/л), (2,4-Д 1 мг/л + КІН 0,5 мг/л), (2,4-Д 1 мг/л + КІН 1 мг/л), (2,4-Д 2 мг/л + КІН 1 мг/л), (2,4-Д 2 мг/л + БАП 0,25 мг/л) та (ТДЗ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) змогли підтримувати

ріст калюсу, але (НОК 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) і (НОК 1 мг/л + КІН 1 мг/л) не змогли підтримувати ріст калюсу і найкраще ріст калюсу кореня, листя та стебла також помічений за першого субкультивування з

(2,4-Д 2 мг/л + БАП 0,25 мг/л) та (ТДЗ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л)

комбінації регуляторів росту. Наступне субкультивування проводили для

кожного 30-денного калюсу, отриманого з першого пасажу на комбінаціях регуляторів росту (2,4-Д 2 мг/л + БАП 0,25 мг/л) і (ТДЗ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л), оскільки вони показали найкращий ріст і для комбінацій

регуляторів росту (2,4-Д 0,5 мг/л + КІН 0,5 мг/л) і (2,4-Д 1 мг/л + КІН 1 мг/л),

оскільки вони показали найкращий ріст для найбільш поширеної використовуваної комбінації регуляторів росту 2,4-Д і кінетину.

Ріст калосу на цих комбінаціях регуляторів росту підтримувався, збільшувався, а також найкращий ріст калосу з кореня, листя та стебла був помічений у другому пасажі на середовищі з (2,4-Д 2 мг/л + БАП 0,25 мг/л) і (ТДЗ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л) комбінацією регуляторів росту.

Таблиця 3.3.

Час індукції калосу та швидкість росту калосу

№	Регулятори росту					Доба
	НОК	БАП	2,4-Д	КІН	ТДЗ	
1	1,0	0,1				13
2	1,0	0,1				11
3	1,0	0,1				15
4		0,25	2,0			11
5		0,25	2,0			9
6		0,25	2,0			8
7		0,1	1,0		0,5	6
8		0,1	1,0		0,5	4
9		0,1	1,0		0,5	7
10			1,0	1,0		12
11			1,0	1,0		12
12			1,0	1,0		16
13			0,5	0,5		14
14			0,5	0,5		13
15			0,5	0,5		15
16			2,0	1,0		13
17			2,0	1,0		11
18			2,0	1,0		14
19			1,0	0,5		16
20			1,0	0,5		15
21			1,0	0,5		17

22	1,0	1,0	00	14
23	1,0	1,0		13
24	1,0	1,0		15

Продовження таблиці 3.3.

№	Вага калюсу мг/добу			
	мг/10 доба	мг/20 доба	мг/30 доба	мг/40 доба
1	45.20	447.00	1050.00	1680.00
2	58.10	363.00	1410.00	1810.00
3	84.20	310.00	1000.00	1640.00
4	97.50	392.00	1700.00	2300.00
5	105.40	410.00	1900.00	2400.00
6	100.50	375.00	1550.00	2250.00
7	106.20	1350.00	1400.00	2600.00
8	128.10	505.00	2180.00	2700.00
9	120.40	445.00	2170.00	2400.00
10	57.30	200.00	920.00	1400.00
11	80.10	270.00	1085.00	1490.00
12	71.15	240.00	905.00	1380.00
13	42.50	120.00	365.00	510.00
14	77.60	150.00	400.00	520.00
15	63.40	140.00	320.00	400.00

3.3. Регенерація *in vitro* *Foeniculum vulgarese*

Випробування зі створення клонів рослини безпосередньо з експлантів або опосередковано після утворення калюсу були проведені для досягнення цієї точки з використанням різних гормонів окремо або в комбінаціях або навіть середовищ без гормонів для отримання клонів усієї рослини.

Пряме мікророзмноження

Foeniculum vulgare, одержані проростки, розрізали на різні експланти кореня, стебла та листя та піддавали впливу різних типів фітогормонів та їх комбінацій, як раніше згаданих гормонів, і культивували на MS-твердому середовищі (з вмістом або без сахарози) при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ і 16-годинному періоді.

Непряме мікророзмноження

На середовищі з різними регуляторами росту і комбінаціями регуляторів росту не спостерігали соматичного ембріогенезу, але лише на середовищі з NAA 1 мг/л + BAP 0,1 мг/л і NAA 1 мг/л + K 1 мг/л було відмічено органогенез

із пасированих калусів і комбінація регуляторів росту NAA 1 мг/л + BAP 0,1 мг/л була єдиною, яка могла продовжувати мікророзмноження.

Культивування на комбінації регуляторів росту NAA 1 мг/л + BAP 0,1 мг/л повторювали тричі з однаковими умовами, щоб забезпечити індукування непрямого органогенезу та мікророзмноження кожного разу з калусів листя, кореня та стебла.

Усі калуси вком 30, 60, 90, 120 та 150 днів, одержані на середовищі з вищезазначеними комбінаціями з експлантів кореня, листя та стебла, були згодом перенесені на середовища з KIN 0,5 мг/л та KIN 0,5 мг/л + BAP 0,5 мг/л

тверді та напівтверді середовища MS або середовища, що містять сахарозу,

або середовища, що не містять сахарози, що індукують калус, та інкубували при 25°C – та фотоперіоді 16 годин світла та 8 годин темряви. У кожному дослідженні клітини калусу досліджували під мікроскопом, щоб виявити індукцію соматичних ембріонів.

Не виявлено ознак соматичного ембріогенезу на середовищах KIN 0,5 мг/л і KIN 0,5 мг/л + BAP 0,5 мг/л твердих і напівтвердих середовищах MS без сахарози.

Соматичний ембріогенез спостерігали лише в 90, 120 та 150-денному калусі на середовищі з комбінацією регуляторів росту (TDZ 0,5 мг/л

+ 2,4-D 1 мг/л + BAP 0,1 мг/л) експлантів стебла та листя, а також калусу на

середовищі з комбінацією регуляторів росту (2,4-D 1 мг/л + KIN 1 мг/л) стеблових експлантів, тільки на твердих і напівтвердих сахарозних середовищах на основі MS, на яких було виявлено утворення глобулярних,

серцевих, торпедних і сім'ядольних форм ембріонів, як показано на рисунку 3.4. Каллюс, який був здатний давати ці форми соматичних ембріонів, почали давати зародки, потім карликові пагони та коріння до формування повних мікророзмножених рослин з добре розвиненими коренями, пагонами та листками. Ці рослини переносили на свіже середовище кожні 30 днів для підтримки їх життєздатності. Тільки рослини утворені експлантатами із стеблового калюсу на комбінації регуляторів росту (ТДЗ 0,5 мг/л + 2,4-Д 1 мг/л + БАП 0,1 мг/л), змогли продовжити процес непрямого мікророзмноження.



Рис. 3.4. Різні форми соматичних зародків калюсних клітин; А: куляста форма ембріона; Б: серцева форма ембріона; В: торпедоподібна форма ембріона.

Культивування мікророзмножених проростків in vivo

Після розміщення мікророзмножених саджанців у перфорованих горщиках та інкубації, саджанці залишаються життєздатними максимум протягом 10 днів, не проявляючи жодних ознак росту, після чого починають

в'янути. Це сталося через слабкість кореневої системи. Після зміцнення кореневої системи шляхом розміщення саджанців з їх корінням у контакт з рідким ауксином (НОК 1 мг/л) протягом 30 днів, і коріння почало ставати товщим і утворювало коричневі зачатки, саджанці показали помітне зростання, збільшення кількості та довжини від 9 см до 13 см за 15 днів і зберігали свою життєздатність протягом 20 діб.

3.4. Вплив взаємодії НОК та БАП на вагу калюсу фенхелю

Взаємодія між концентраціями регуляторів росту НОК та БАП має значний вплив на індукцію калюсної тканини рослини фенхелю з вегетативних частин (листя, стебло) (рис. 3.5, 3.6).



Рис. 3.5. Стебла, культивовані на середовищі (MS)

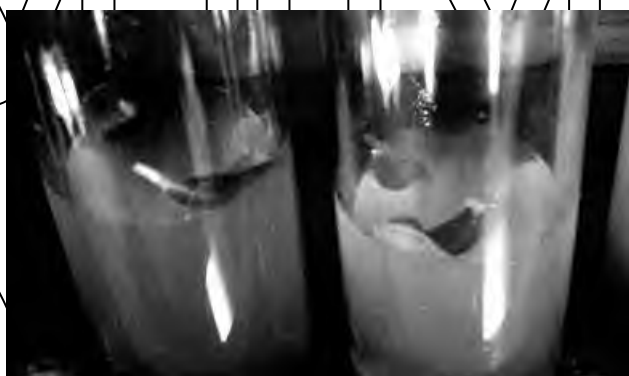


Рис. 3.6. Листки, культивовані на середовищі (MS)

Найбільшу вагу фенхелю (2,44 г) було отримано для експлантату стебла, тоді як (1,27 г) для листя. Концентрація з регуляторами росту (1 мг/л) НОК з (1 мг/л) БАП (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Індукція калюсу з експлантату пагону на середовищі з 1 мг/л

НОК і 1 мг/л БАП

Таблиця 3.4

Сира вага калюсу частин рослини (стебло/листя) та ефект взаємодії між різними концентраціями БАП та НОК

Калюс з листових експлантатів, г	Калюс з експлантатів пагону, г	БАП, мг/л	НОК, мг/л
0.74	1.18	0.5	0.5
0.77	1.07	1	0.5
0.27	0.73	1.5	0.5
0.88	1.52	0.5	1
1.21	2.44	1	1
0.72	1.27	1.5	1
0.68	1.36	0.5	1.5
0.55	1.78	1	1.5
0.50	0.74	1.5	1.5
±0.7	±1,34		

Далі йшла комбінація (1,5 НОК) + (1 БАП) мг/л, зі свіжою вагою калюсу експлантату стебла (1,78 г), тоді як свіжа вага частини листя була (0,73 г)

Свіжа вага калюсу була зменшена на (0,5 НОК + 1,5 БАП) мг/л (0,55 г) для

стебла, тоді як вага калюсу в листі була (0,27 г). Він суттєво відрізняється від усіх коефіцієнтів регуляторів росту НОК та БАП.

Таблиця 3.5

Суша вага калюсу частин рослини (стебло/листя) та ефект взаємодії між різними концентраціями БАП та НОК

Калюс з листкових експлантатів, г	Калюс з експлантатів пагону, г	БАП, мг/л	НОК, мг/л
0.96	0.110	0.5	0.5
0.105	0.168	1	0.5
0.01	0.05	1.5	0.5
0.87	0.154	0.5	1
0.141	0.242	1	1
0.03	0.07	1.5	1
0.107	0.130	0.5	1.5
0.115	0.186	1	1.5
0.02	0.07	1.5	1.5
±0,175	±0,13		

Таким же чином, суха вага показала різні значення в таблиці 3.5, було помічено, що найвища суха маса частини стебла рослини калюсу становила (0,242) г і листя (0,141) г при взаємодії (1 НОК + 1 БАП) мг /л, що значно відрізняється від ренти-обробок, і найнижча суха маса калюсу між комбінаціями при концентрації (НОК/0,5, БАП/1,5) мг/л становила 0,05 г (0,01) для листя і значно відрізняється від усіх методів лікування БАП та НОК, за винятком інтерференційного лікування (НОК 1,5+ 1,0 БАП) мг/л.

Співвідношення між регуляторами росту оксидотокініну, доданими до MS, відіграло важливу роль у отриманні найкращої свіжої та сухої маси калюсу в середовищі сільського господарства завдяки фізіологічному балансу

між ауксином і цитокініном. Збільшення концентрації ауксину і цитокініну за рахунок іншого впливає на калус і зменшує його ріст (Mino, 2100).

Genteno et al., (2016) також відзначили необхідність гормонального балансу між ауксинами та цитокінами в індукції та зростанні калюсу, що пояснює збільшення свіжої та сухої маси індукованого калюсу вегетативних частин листя, стебла, воронки.

Склад калюсу залежить від генетичного та фізіологічного стану частини рослини та її гормонів у ній, фізіологічного віку частини рослини, типу поживних речовин та умов культури тканин

(температура, світло, цукор та ін.) мають значний вплив на склад калюсу та кількість його свіжої та сухої маси (Garcia et al., 2011).

ВИСНОВКИ

1. Найкращими умовами для стерилізації насіння було обробка етиловим спиртом (70%) 3 хвилини з подальшим перенесенням у гіпохлорит натрію (5%) на 25 хвилин, при цьому максимальна ефективність стерилізації становила 98%.

2. Найкращими комбінаціями регуляторів росту для індукції калюсу були (ТДЗ 0,5 + 2,4-Д 1 + БАП 0,1) і (2,4-Д 2 + БАП 0,25), на даних варіантах середовищ спостерігали найкращу швидкість росту, особливо з експлантів стебла.

3. Комбінація регуляторів росту НОК 1+ БАП 0,1 була найкращою для органогенезу, тоді як комбінація регуляторів росту ТДЗ 0,5 + 2,4-Д 1 + БАП 0,1 була єдиною, на якій спостерігали соматичний ембріогенез.

4. Соматичний ембріогенез спостерігали лише в 90, 120 та 150-денному калюсі на середовищі з комбінацією регуляторів росту (ТДЗ 0,5 + 2,4-Д 1 + БАП 0,1) на експлантатах стебла та листя.

5. Виявлено утворення глобулярних, серцевих, торпедних і форм соматичних ембріонів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. J. Hill, *The British Herbal: An History of Plants and Trees, Natives of Britain, Cultivated for Use, or, Raised for Beauty*, London, UK, 2006.

2. B. Muckensturm, D. Foechterlen, J. P. Reduron, P. Danton, and M. Hildenbrand, "Phytochemical and chemotaxonomic studies of *Foeniculum vulgare*," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 25, no. 4, pp. 353–358, 2007.

3. G. J. Kaur and D. S. Arora, "Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 9, article 30, 2019.

4. B. Manonmani and V. M. Abdul Khadir, "Antibacterial screening on *Foeniculum vulgare* Mill.," *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol. 2, no. 4, pp. 390–394, 2011.

5. I. E. Orhan, B. Ozcelik, M. Kartal, and Y. Kan, "Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components," *Turkish Journal of Biology*, vol. 36, no. 3, pp. 239–246, 2012.

6. P. Morales, A. M. Carvalho, M. C. Sanchez-Mata, M. C. Amara, M. Molina, and I. C. F. R. Ferreira, "Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables," *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 59, no. 5, pp. 851–863, 2012.

7. A. Dua, G. Garg, and R. Mahajan, "Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller)," *European Journal of Experimental Biology*, vol. 3, no. 4, pp. 203–208, 2013.

8. T. Malini, G. Vanithakumari, N. Megala, S. Anusya, K. Devi, and V. Elango, "Effect of *Foeniculum vulgare*. Mill seed extract on the genital organs of male and female rats," *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 29, no. 1, pp. 21–26, 2013.

9. H. Özbek, S. Ugras, H. Dulger et al., "Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil," *Fitoterapia*, vol. 74, no. 3, pp. 317–319, 2013.

10.M. Oktay, I. Gulcin, and O. I. Kufrevioglu, "Determination of " in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 36, no. 2, pp. 263–271, 2013.

11.M. Pradhan, S. Sribhuwaneswari, D. Karthikeyan et al., "In-vitro cytoprotection activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in cultured human blood lymphocytes and antitumour activity against B16F10 melanoma cell line," *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 1, no. 4, pp. 450–452, 2018.

12.N. A. El-Soud, N. El-Laithy, G. El-Saeed et al., "Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* mill. Essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats," *Macedonian Journal of Medical Sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 139–146, 2011.

13.S. Koppula and H. Kumar, "*Foeniculum vulgare* Mill. (Umbelliferae) attenuates stress and improves memory in wister rats," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 4, pp. 553–558, 2013.

14.L. Barros, A. M. Carvalho, and I. C. F. R. Ferreira, "The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): shoots, leaves, stems and inflorescences," *LWT: Food Science and Technology*, vol. 43, no. 5, pp. 814–818, 2010.

15.C. Garg, S. A. Khan, S. H. Ansari, A. Suman, and M. Garg, "Chemical composition, therapeutic potential and perspectives of *Foeniculum vulgare*," *Pharmacognosy Reviews*, vol. 3, no. 6, pp. 346–352, 2019.

16.W. He and B. Huang, "A review of chemistry and bioactivities of a medicinal spice: *Foeniculum vulgare*," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5, no. 16, pp. 3595–3600, 2011.

17.M. A. Rather, B. A. Dar, S. N. Sofi, B. A. Bhat, and M. A. Qurishi, "Foeniculum vulgare: a comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety," *Arabian Journal of Chemistry*, 2012.

18.N. S. Jamwal, S. Kumar, and A. C. Rana, "Phytochemical and pharmacological review on *Foeniculum Vulgare*," vol. 4, pp. 327–341, 2013.

19.S. Grover, C. P. Malik, A. Hora, and H. B. Kushwaha, "Botany,

cultivation, chemical constituents and genetic diversity in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill): a review,” *International Journal of Life Sciences*, vol. 2, no. 2, pp. 128–139.

20.R. Rahimi and M. R. S. Ardekani, “Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy,” *Chinese Journal of Integrative Medicine*, vol. 19, no. 1, pp. 73–79, 2013.

21.K. H. Krishnamurthy, “Medicinal plants: Madhurika, saunf or fennel (*Foeniculum vulgare*, Gaertn),” *Journal of New Approaches to Medicine and Health*, vol. 19, no. 1, pp. 1–4, 2011.

22.G. I. Vardavas, D. Majchrzak, K. H. Wagner, I. Elmadfa, and A. Kafatos, “Lipid concentrations of wild edible greens in Crete,” *Food Chemistry*, vol. 99, no. 4, pp. 822–834, 2006.

23.M. H. H. Roby, M. A. Sarhan, K. A. Selim, and K. I. Khalel, “Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.),” *Industrial Crops and Products*, vol. 44, pp. 437–445, 2013.

24.A. Ghorbani, “Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran (part 1): general results,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 102, no. 1, pp. 58–68, 2015.

25.A. Jabbar, M. A. Raza, Z. Iqbal, and M. N. Khan, “An inventory of the ethnobotanicals used as anthelmintics in the Southern Punjab (Pakistan),” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 108, no. 1, pp. 152–154, 2016.

26.A. Jain, S. S. Katewa, P. K. Galav, and A. Nag, “Unrecorded ethnomedicinal uses of biodiversity from Tadgarh-Raoli wildlife sanctuary,” *Acta Botanica Yunnanica*, vol. 29, no. 3, pp. 337–344, 2017.

27.V. B. E. Wyk, “A review of Khoi-San and Cape Dutch medical ethnobotany,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no. 3, pp. 331–341, 2018.

28.J. M. Neves, C. Matos, C. Moutinho, G. Queiroz, and L. R. Gomes, “Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal),” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 124, no. 2, pp.

270–283, 2019.

29. G. Benítez, M. R. Gonzalez-Tejero, and J. Molero-Mesa, “Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 129, no. 1, pp. 87–105, 2010.

30. V. Savo, C. Giulia, G. P. Maria, and R. David, “Folk phytotherapy of the Amalfi Coast (Campania, Southern Italy),” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 2, pp. 376–392, 2011.

31. S. G. D. Oliveira, F. R. R. de Moura, F. F. Demarco, P. D. S. Nascente, F. A. B. D. Pino, and R. G. Lund, “An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 140, no. 2, pp. 428–437, 2012.

32. P. M. Guarrera and V. Savo, “Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local and popular traditions of Italy: a review,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146, no. 3, pp. 659–680, 2013.

33. P. M. Guarrera, G. Forti, and S. Marignoli, “Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy),” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 96, no. 3, pp. 429–444, 2015.

34. M. J. Macia, E. Garcia, and P. J. Vidaurre, “An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 97, no. 2, pp. 337–350, 2010.

35. S. Jaric, Z. Popovic, M. Macukanovic-Jocic et al., “An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia),” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 1, pp. 160–175, 2017.

36. M. Kumar, Y. Paul, and V. K. Anand, “An ethnobotanical study of medicinal plants used by the locals in Kishtwar, Jammu and Kashmir, India,” *Ethnobotanical Leaflets*, vol. 13, no. 10, pp. 1240–1256, 2019.

37. F. B. Lewu and A. J. Afolayan, “Ethnomedicine in South Africa: the role of weedy species,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 6, pp. 929–934, 2019.

38. S. Mitra and S. K. Mukherjee, "Ethnomedicinal usages of some wild plants of North Bengal plain for gastro-intestinal problems," *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 9, no. 4, pp. 705–712, 2010.

39. M. Alzweiri, A. A. Sarhan, K. Mansi, M. Hudaib, and T. Aburjai, "Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia region," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 137, no. 1, pp. 27–35, 2011.

40. M. I. Calvo, S. Akerreta, and R. Y. Cavero, "Pharmaceutical ethnobotany in the Riverside of Navarra (Iberian Peninsula)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 135, no. 1, pp. 22–33, 2011.

41. A. Mesfin, M. Giday, A. Animut, and T. Teklehaymanot, "Ethnobotanical study of antimalarial plants in Shinile District, Somali Region, Ethiopia, and in vivo evaluation of selected ones against *Plasmodium berghei*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 139, no. 1, pp. 221–227, 2012.

42. R. A. Halberstein, "Botanical medicines for diuresis: crosscultural comparisons," *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 37, pp. 1–41, 2012.

43. G. Bulut and E. Tuzlaci, "An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa-Turkey)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 149, no. 3, pp. 633–647, 2013.

44. M. D. C. Juárez-Vázquez, C. Carranza-Alvarez, A. J. Alonso-Castro et al., "Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, Mexico," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 148, no. 2, pp. 521–527, 2013.

45. L. Cornara, A. La Rocca, S. Marsili, and M. G. Mariotti, "Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 125, no. 1, pp. 16–30, 2019.

46. R. Sharma, R. K. Manhas, and R. Magotra, "Ethnoveterinary remedies of diseases among milk yielding animals in Kathua, Jammu and Kashmir, India," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 141, no. 1, pp. 265–272, 2012.

47. E. Carrió and J. Valles, "Ethnobotany of medicinal plants used in Eastern Mallorca (Balearic Islands, Mediterranean Sea)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 141, no. 3, pp. 1021–1040, 2012.

48.K. R. Kirtikar and B. D. Basu, *Indian Medicinal Plants*, Vol. IIV, Bishen Singh Mahendra Singh, International Book Distributors, Dehra Dun, India.

49.I. Grae, *Nature's Colors—Dyes from Plants*, MacMillan, New York, NY, USA, 2004.

50.A. Rasul, N. Akhtar, B. A. Khan, T. Mahmood, S. Uz Zaman, and H. M. Shoaib Khan, "Formulation development of a cream containing fennel extract: in vivo evaluation for anti-aging effects," *Pharmazie*, vol. 67, no. 1, pp. 54–58, 2012.

51.A. Akgul and A. Bayrak, "Comparative volatile oil composition of various parts from Turkish bitter fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*)," *Food Chemistry*, vol. 30, no. 4, pp. 319–323, 2008.

52.B. Damjanovic, Z. Lepojevic, V. Zivkovic, and A. Tolic, "Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: comparison with hydrodistillation," *Food Chemistry*, vol. 92, no. 1, pp. 143–149, 2015.

53.L. Fang, M. Qi, T. Li, Q. Shao, and R. Fu, "Headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 3, pp. 791–797, 2016.

54.G. Singh, S. Maurya, M. P. de Lampasona, and C. Catalan, "Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract," *Food Control*, vol. 17, no. 9, pp. 745–752, 2016.

55.M. Tognolini, V. Ballabeni, S. Bertoni, R. Bruni, M. Impicciatore, and E. Barocelli, "Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis," *Pharmacological Research*, vol. 56, no. 3, pp. 254–260, 2017.

56.I. Telci, I. Demirtas, and A. Sahin, "Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity," *Industrial Crops and Products*, vol. 30, no. 1, pp. 126–130, 2019.

57.S. Zoubiri, A. Baaliouamer, N. Seba, and N. Chameuni, "Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil," *Arabian Journal of Chemistry*, 2020.

58. M. C. Diaz-Maroto, M. S. Perez-Coello, J. Esteban, and J. Sanz, "Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 18, pp. 6814–6818, 2016.

59. M. Gross, E. Lewinsohn, Y. Tadmor et al., "The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*, Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 37, no. 4, pp. 308–316, 2009.

60. M. D. Guillen and M. J. Manzanos, "A study of several parts of the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interest," *Food Research International*, vol. 29, no. 1, pp. 85–88, 2016.

61. N. N. Zhaoa, L. Zhou, Z. L. Ljua, S. S. Duc, and Z. W. Dengd, "Evaluation of the toxicity of the essential oils of some common Chinese spices against *bostrychophila*," *Food Control*, vol. 26, no. 2, pp. 486–490, 2012.