DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2016.109413

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۲، صفحه ۲۴۲-۲۳۲ (۱۳۹۵)

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)

ساریسا حسین پناهی[۱]، محمد مجدی[۲*] و قادر میرزاقادری[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

پست الکترونیک: m.majdi@uok.ac.ir

۳- استادیار، عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۴

چکیده

سیاهدانه (Nigella sativa L.) یکی از مهمترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده آلاله‌هاست. با وجود اهمیت بالای این گیاه دارویی، تاکنون گزارش‌های زیادی در زمینه کشت کالوس و ریزازدیادی آن در شرایط درون شیشه‌ای، ارائه نشده است. بنابراین با توجه به این موضوع در این مطالعه میزان کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه برگ سیاهدانه بررسی شد. ریزنمونه‌های برگ به‌دست آمده از گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای، روی محیط کشت MS حاوی ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد مختلف NAA و BAP در سه سطح به‌ترتیب (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. به‌منظور ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های باززایی شده از محیط ۱/۲MS با سه سطح (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) از هورمون‌های NAA و IBA استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد و از بین تیمارهای هورمونی به‌کار گرفته شده، شاخه‌زایی فقط در محیط MS حاوی تیمار BAP با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و ریشه‌زایی نیز در محیط ۱/۲MS حاوی NAA با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی سیاهدانه در محیط درون‌شیشه‌ای حساسیت بالایی را نسبت به سطوح مختلف ترکیبات هورمونی نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باززایی، سیاهدانه، سیتوکنین، کالوس‌زایی، کشت بافت.

مقدمه

سیاهدانه (*Nigella sativa*) گیاهی متعلق به خانواده آلاله‌ها (Ranunculaceae) و بومی جنوب‌غربی آسیا می‌باشد(Alemi *et al*., 2013). ولی در بخش‌هایی از خاورمیانه ازجمله ایران، شرق اروپا و غرب آسیا نیز پراکنده شده است (Venkatachallam *et al*., 2010). سیاهدانه از لحاظ سطح کروموزومی دیپلوییید ($2n = 2x = 12$) می‌باشد(Iqbal *et al*., 2011). سیاهدانه یکی از باارزش‌ترین گیاهان دارویی است که در صنایع داروسازی و پزشکی کاربردهای فراوانی دارد. از دانه این گیاه به‌عنوان چاشنی و در طب سنتی در طول تاریخ و در فرهنگ‌های مختلف استفاده شده است (Botnick *et al*., 2012) و حاوی

مواد شیمیایی مفید و با ارزش درمانی بسیار بالایی است (Bourgou *et al*., 2010). در کتاب صحیح بخاری به‌نقل از پیامبر اکرم ذکر شده است که"سیاهدانه درمان هر دردی به‌جز مرگ می‌باشد" (Botnick *et al*., 2012). داروهای گیاهی استخراج شده از این گیاه به‌قدری زیاد می‌باشد که از آن به‌عنوان یک گیاه معجزه‌آسا یاد می‌شود. ازجمله خواص دارویی این گیاه که در بسیاری از مطالعات ذکر شده، این است که روغن‌های فرار سیاهدانه دارای خاصیت ضدقارچی (Ozmen *et al*., 2007)، ضدانگل (Ali & Blunden, 2003 ; Zaoui *et al*., 2002)، کاهش‌دهنده چربی، قند و فشارخون (Ferdouse *et al*.,1992) می‌باشد. تیمول، تایموکینون و تایموهیدروکینون از مواد مؤثره مهم عصاره دانه سیاهدانه بوده که جزء گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه یعنی ترپن‌ها می‌باشند (Morikawa *et al*., 2004). تایموکینون از ترکیبات اصلی بذر گیاه سیاهدانه است و اثرات درمانی بسیار زیادی دارد (Al-Majed *et al*., 2006). با وجود ارزش دارویی بسیار بالای این گیاه و اهمیت آن در صنایع داروسازی تاکنون مطالعات بسیار محدودی در زمینه کشت بافت این گیاه در دنیا انجام شده است.

اولین مشاهدات در زمینه باززایی سیاهدانه در کشت‌های آزمایشگاهی مربوط به ریخت‌زایی از بافت‌های مختلف سیاهدانه بود که برای تولید کالوس از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ سیاهدانه کشت شده در محیط وایت (White) حاوی NAA و شیر نارگیل استفاده شد (Banerjee & Gupta, 1975). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۷۶ انجام شد مشاهده شد که جنین‌زایی در بافت کالوس برگی سیاهدانه زمانی رخ می‌دهد که شیر نارگیل موجود در محیط MS با کازیین‌هیدرولیزات جایگزین شود (Banerjee & Gupta, 1976). در محیط کشت MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و کازیین هیدرولیزات (۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ریزنمونه‌های مورد استفاده قابلیت تولید جنین‌های فعال و قابل رشد را برای یک دوره کشت طولانی مدت داشتند اما در غلظت ۱/۰ گرم در لیتر کازیین‌هیدرولیزات، قابلیت تمایز بعد از ۵ واکشت از بین رفت. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که محیط کشت حاوی کازیین‌هیدرولیزات و توفوردی یا کینتین اثرات بازدارنده بر ریخت‌زایی دارد. واکنش اندام‌زایی از کالوس‌های حاصل از اندام‌های مختلف سیاهدانه نشان داد که کالوس‌های برگی مناسب‌ترین ریزنمونه گیاهی برای باززایی می‌باشند (Banerjee & Gupta, 1975).

بهینه‌سازی فرایند کشت بافت و باززایی سیاهدانه با استفاده از روش‌های مختلف مانند باززایی غیرمستقیم، می‌تواند برای انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی ازجمله دست‌ورزی‌های ژنتیکی مانند تراریختی، تغییر سطوح پلوییدی، مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی انواع متابولیت‌های ثانویه مهم در سیاهدانه مفید باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش دستیابی به یک دستورالعمل مناسب برای باززایی این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای و تعیین نوع و میزان تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب برای کالوس‌دهی، باززایی و ریشه‌زایی این گونه گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذر سیاه‌دانه از بوته‌های کشت شده در سنندج، برای تهیه ریزنمونه و انجام آزمایش جمع‌آوری شد. بذرها ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه غوطه‌ور و بعد با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از این مرحله بذرها در هیپوکلریدسدیم ۰/۳ درصد به‌مدت پنج دقیقه قرار داده شدند و در نهایت با آب مقطر استریل سه بار و هر بار به‌مدت پنج دقیقه به‌منظور حذف اثرات محلول ضدعفونی‌کننده شستشو داده شدند. ضدعفونی در شرایط استریل و زیر هود انجام شد. بذرها بطور مستقیم برای جوانه‌زنی به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) منتقل شدند و ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های به‌دست آمده برای بررسی کالوس‌زایی استفاده شدند.

پس از رشد گیاهچه‌ها به‌منظور القاء کالوس از ریزنمونه‌های برگی به‌قطر ۰/۵ سانتی‌متر استفاده شد.

ریزنمونه‌های مذکور روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA (۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲، ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. ریزنمونه‌های کشت شده در دمای ۲°C± ۲۶، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. نمونه‌های کشت شده درون شیشه‌ای به‌صورت منظم و مدوام بازبینی شدند و تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس کردند، شمارش شد. درصد کالوس‌زایی بعد از یک ماه برای هر تیمار و هر ریزنمونه به‌طور جداگانه محاسبه شد. این آزمایش در سه تکرار (هر شیشه به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد) انجام شد و در هر تکرار نیز چهار ریزنمونه کشت شد.

به‌منظور انجام مقایسات مربوط به کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. همچنین درصد کالوس‌زایی و ریشه‌زایی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Ahmadi *et al*., 2012).

$$\text{درصد کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوسهای تولید شده}}{\text{تعداد برگ کشت شده}} \times 100$$

$$\text{درصد ریشه زایی} = \frac{\text{تعدادنوشاخه ریشه‌دار شده}}{\text{تعداد نوشاخه کشت شده}} \times 100$$

کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه‌های مختلف بعد از حدود ۳ بار واکشت و بعد از گذشت مدت زمان حدود دو ماه به‌منظور تکثیر به محیط کشت‌های باززایی حاوی سطوح مختلف هورمونی منتقل شدند. کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ برای باززایی در محیط کشت پایه‌ای MS همراه با سطوح مختلف هورمون‌های BAP، NAA و 2,4-D کشت گردیدند (جدول ۱). بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، نمونه‌ها در دمای ۲°C± ۲۶، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی به‌کار گرفته شده در محیط کشت MS برای باززایی کالوس‌ها

تیمار	ترکیبات هورمونی مختلف
۱	BAP (0.5 mg/l)
۲	BAP (1 mg/l)
۳	BAP (2 mg/l)
۴	BAP (0.7 mg/l)+ NAA(0.3 mg/l)
۵	BAP (0.7 mg/l)+ NAA(0.5 mg/l)
۶	BAP (1 mg/l)+ NAA(0.3 mg/l)
۷	BAP (1 mg/l)+ NAA(0.5 mg/l)
۸	BAP (2 mg/l)+ NAA(0.3 mg/l)
۹	BAP (2 mg/l)+ NAA(0.5 mg/l)
۱۰	BAP (1 mg/l)+ 2,4-D (0.5 mg/l)
۱۱	BAP (1mg/l)+ 2,4-D (1 mg/l)
۱۲	BAP (1mg/l)+ 2,4-D (1.5 mg/l)
۱۳	BAP (2mg/l)+ 2,4-D (0.5 mg/l)
۱۴	BAP (2mg/l)+ 2,4-D (1 mg/l)
۱۵	BAP (2mg/l)+ 2,4-D (1.5 mg/l)

نوساقه‌های حاصل از باززایی غیرمستقیم گیاه سیاهدانه برای ریشه‌زایی به محیط ۱/۲MS (محیط MS که غلظت کلیه مواد تشکیل‌دهنده آن به‌نصف کاهش یافته است) با غلظت‌های ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های NAAو IBA به‌طور جداگانه منتقل شدند. به این منظور اغلب ساقه‌هایی که رشد مناسبی داشتند برای القای ریشه‌دهی به محیط حاوی اکسین منتقل شدند. تعداد ریشه‌های تولید شده بعد از گذشت ۳ هفته از کشت در محیط ریشه‌زایی شمارش شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به‌وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

کالوس‌زایی

بعد از گذشت هفت تا هشت روز از کشت ریزنمونه‌های برگی روی محیط کشت حاوی هورمون، ریزنمونه‌ها شروع به تولید کالوس کردند و بعد از گذشت حدود یک ماه کالوس‌ها به‌طور کامل رشد کرده و توسعه یافتند (شکل ۳ـ۱). تأثیر ترکیبات هورمونی متفاوت بر تولید کالوس در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین مقادیر درصد تشکیل کالوس در تیمارهای هورمونی نشان داد که اثر تیمارهای متفاوت بر میزان کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

کالوس‌های تولید شده در مقادیر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA کالوس‌های سبز رنگ و با ساختار کروی سفت بودند (شکل ۳ـ۱). کالوس‌های تولید شده در این محیط نسبت به کالوس‌های تولید شده در سایر ترکیبات هورمونی از مقدار بیشتری برخوردار بودند. کالوس‌های تولید شده در محیط حاوی NAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تولید ریشه کردند (شکل ۳ـ۲). در حالی‌که در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA هیچ کالوسی مشاهده نشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف بر کالوس‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ترکیبات هورمونی	۸	۰/۳۱۱**
خطای آزمایش	۱۸	۰/۰۱۶

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ (CV = ۲/۱۳)

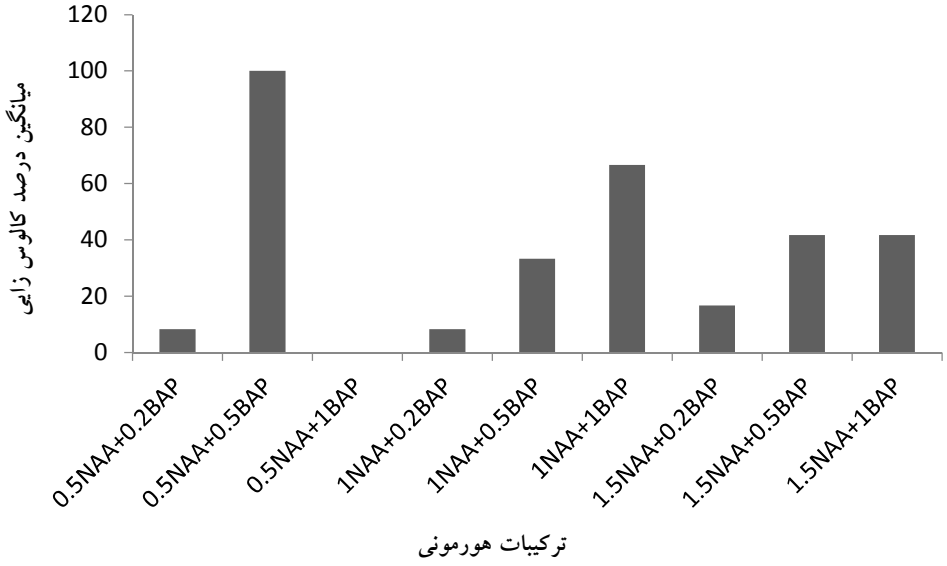
نتایج مقایسه میانگین‌های مربوط به کالوس‌زایی به‌وسیله آزمون دانکن نشان داد که از بین ترکیب‌های هورمونی به‌کار برده شده محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد بهترین محیط کشت برای تولید بیشترین مقدار کالوس بود (شکل ۱)، در مقابل در محیط کشت MS حاوی ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA کالوس‌زایی مشاهده نشد (شکل ۱). مقایسه محیط حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی نشان داد که در بین تیمارهای آزمایشی، محیط کشت‌های حاوی ۱/۰ میلی‌گرم در لیترBAP و۱/۰میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین کالوس‌زایی ۶۶/۶۷ درصد دارای بیشترین مقادیر کالوس‌زایی بعد از محیط BAP و NAA با غلظت‌های ذکرشده بودند (شکل ۱).

باززایی

در تمام آزمایش‌های انجام شده غیر از محیط MS همراه با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP باززایی در کالوس‌های تولید شده در محیط‌های ذکرشده در جدول ۱ مشاهده نشد (شکل ۳-۳ و ۳-۴). البته به‌تدریج و در طی چندین بار واکشت تعداد نوساقه‌های باززایی شده افزایش یافت (شکل ۳-۵) و با گذشت حدود ۴ ماه از کشت در محیط باززایی بیشترین تعداد نوشاخه و پرآوری گیاهچه مشاهده شد (شکل ۳-۶ و ۳-۷).

ریشه‌زایی

از دو نوع تیمار اعمال شده، نوساقه‌های باززایی شده فقط در محیط کشت ۱/۲MS حاوی هورمون NAA ریشه تولید کردند (شکل۳-۹) و در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف IBA ریشه‌زایی مشاهده نشد. تأثیر غلظت‌های متفاوت هورمون NAA بر تولید ریشه در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین مقادیر میانگین تعداد ریشه تولید شده در غلظت‌های مختلف هورمون NAA نشان داد که اثر غلظت‌های متفاوت بر میزان ریشه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین مربوط به ریشه‌زایی به‌وسیله آزمون دانکن نشان داد که در میان سه غلظت مختلف هورمون NAA استفاده شده، بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل ۲). در غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر نیز ریشه تولید شد اما میزان ریشه‌زایی در این دو غلظت کمتر بود.

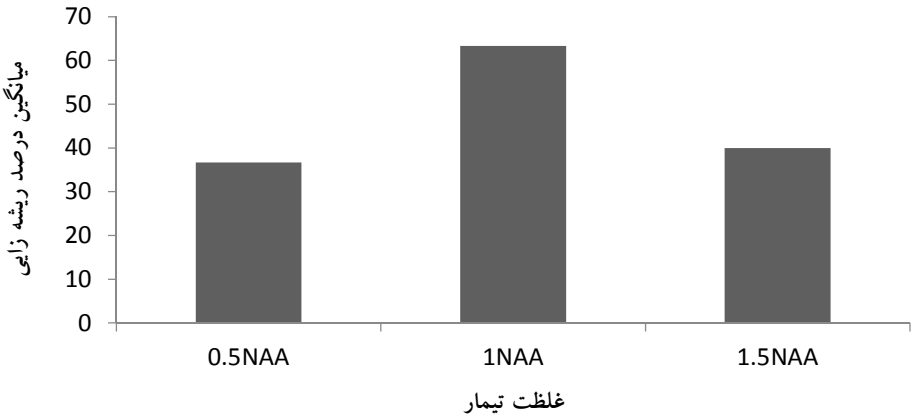


شکل ۱- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در ترکیبات هورمونی مختلف

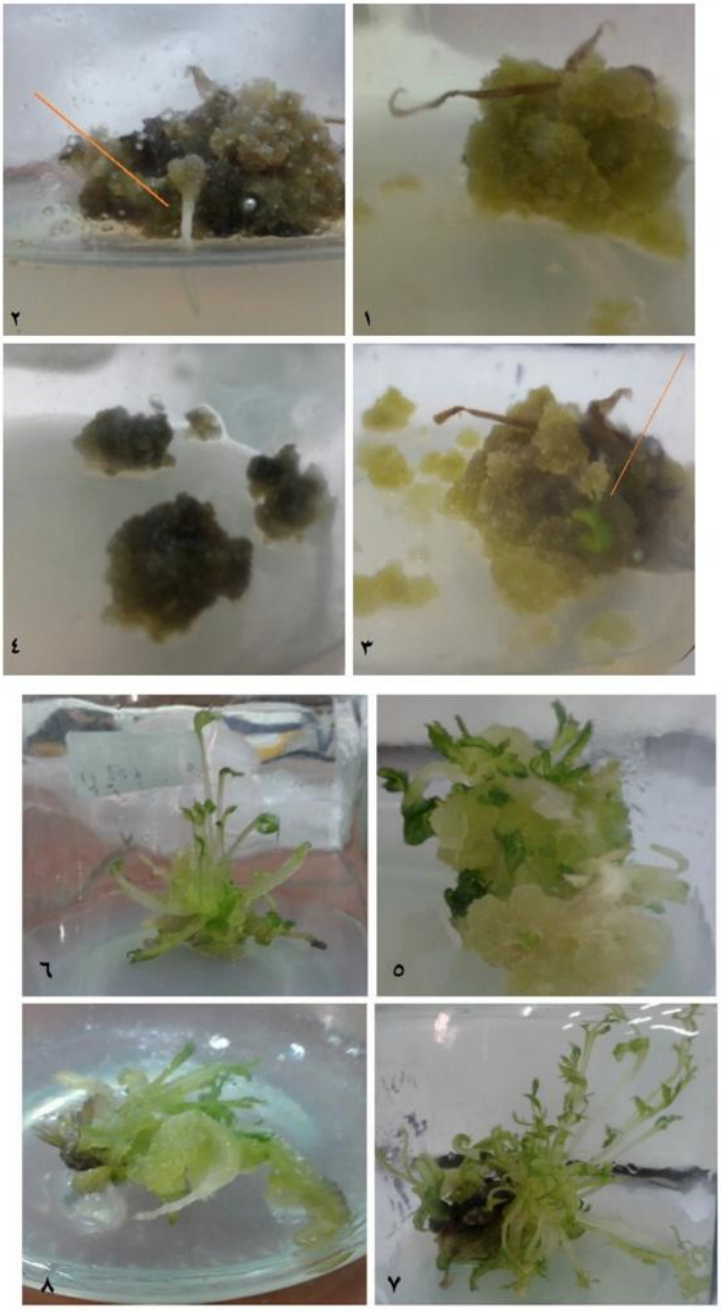
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های هورمونی مختلف NAA بر ریشه‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سطوح هورمونی	۲	۰/۰۶۳**
خطای آزمایش	۶	۰/۰۰۶

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ (CV = ۱/۱۳)



شکل ۲- مقایسه میانگین تعداد ریشه در غلظت‌های مختلف هورمون NAA



شکل ۳- (۱) کالوس‌های متراکم حاصل از ریزنمونه برگ، (۲) ریشه تولید شده توسط ریزنمونه برگ کشت شده در محیط MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، (۳) عدم باززایی از کالوس سه هفته پس از گذشت کشت در محیط MS حاوی BAP (1 mg/l) + 2,4-D (1.5 mg/l)، (۴) آغازه لپه حاصل از کالوس جنینی طی سه هفته پس از گذشت کشت کالوس در محیط MS حاوی(1 mg/l) BAP ، (۵) القا و باززایی نوساقه از کالوس طی ۶ هفته پس از کشت در محیط MS حاوی 1) BAP mg/l)، (۶ و ۷) پرآوری گیاهچه‌ها به‌ترتیب طی ۱۲ و ۱۵ هفته در محیط MS حاوی (1 mg/l) BAP، (۸) ریشه‌زایی نوساقه‌ها بعد از کشت در محیط MS حاوی ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA

بحث

یکی از مراحل اساسی در استفاده موفق از روش‌های مدرن در اصلاح ژنتیکی محصولات، تولید کالوس‌های با کیفیت (کالوس‌های سبز رنگ با ساختار کروی و سفت) و باززایی مناسب گیاهان می‌باشد (Khalafalla *et al.*, 2010). در این تحقیق از ریزنمونه برگ برای تولید کالوس استفاده شد که بر اساس مطالعات قبلی نیز نشان داده شد که برای تولید کالوس با هدف انجام باززایی در سیاهدانه، ریزنمونه برگ مناسب است (Meiners *et al.*, 2007). در گیاه سیاهدانه ریزنمونه‌های برگی دارای سرعت کالوس‌زایی بیشتری نسبت به سایر قسمت‌های گیاهچه می‌باشند (Chand & Roy, 1980). تولید کالوس و تکثیر آن را می‌توان در سیاهدانه در یک دوره زمانی کوتاه و در شرایط کنترل شده به‌دست آورد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ‌های جوان گیاه اغلب دارای میزان رشد مناسب و قابل قبولی می‌باشند (Alemi *et al.*, 2013). بر اساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق از بین غلظت‌های مختلف استفاده شده دو هورمون BAP و NAA، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برای هر دو هورمون غلظت مناسب برای کالوس‌زایی می‌باشد که این نتایج با نتایج مطالعه‌ای که توسط Gupta و Banerjee (۱۹۷۵) روی سیاهدانه انجام شده است، مطابقت دارد. به‌طوری‌که بهترین کالوس‌زایی در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAAمشاهده شد. همچنین مشاهده شد که اگرچه رشد مناسب کالوس در محیط کشت MS همراه با 2,4-D نیز علاوه بر NAA رخ می‌دهد، اما با وجود رشد مناسب، کالوس‌ها بعد از مدتی سیاه و شکننده می‌شدند و توانایی باززایی گیاه را نداشتند. در این تحقیق کالوس‌های به‌دست آمده از تمام غلظت‌های مختلف هورمونی سبز رنگ و با ساختار کروی و سفت بودند، البته در برخی از محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های پایین BAP ازجمله محیط حاوی غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP گاهی کالوس‌های نرم و آبدار مشاهده شد. همچنین در محیط‌های واجد غلظت بالای NAA ازجمله محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در مواردی تولید ریشه از کالوس مشاهده شد. چنین نتایجی با مطالعات قبلی که نشان می‌دهد میزان بالای اکسین نسبت به سیتوکینین سبب القاء ریشه‌زایی می‌شود، مطابقت دارد (Skoog & Miller,1957 ; Gordon *et al.*, 2007). طبق مطالعات انجام شده مهمترین سیتوکینین در القاء کالوس BAP می‌باشد که اغلب غلظت‌های ۰/۵ تا ۱/۰ میکرومولار آن برای تولید کالوس استفاده می‌شود (Omidi & Seyed-Tabatabaie, 2009). در این پژوهش نیز غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (برابر ۲/۲۲ میکرومولار) BAP برای تولید کالوس همراه با NAA دارای کارایی بالایی بود. کالوس‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف از هورمون‌ها، پاسخ‌های مورفولوژیکی مختلفی نشان دادند، به‌طوری‌که در مطالعاتی که در گذشته نیز انجام شده است بیان شده که سلول‌های بافت کالوس به‌دست آمده از بافت‌های مختلف تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی دارای کارایی متفاوتی برای باززایی می‌باشند اما انتخاب یک محیط کشت مناسب واجد غلظت‌های هورمونی خاص برای حفظ این ظرفیت از بافتی به بافت دیگر متفاوت است (Banerjee & Gupta, 1975).

در این مطالعه کالوس‌های تولید شده روی محیط کشت‌های با سطوح مختلف هورمونی کشت شدند، اما فقط روی محیط حاوی BAP با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر باززایی مشاهده شد. البته قبلا نیز گزارش شده است که سیتوکینین‌ها یک نقش محوری در آغاز شاخه‌زایی ایفا می‌کنند (Ebinuma *et al.*, 1997 ;Skoog & ۲۰۰۱ ,Miller,1957 ;Mok & Mok,در مطالعات پیشین مشخص شده است که هورمون BAP نقش اساسی در باززایی نوساقه در شرایط درون شیشه‌ای در گونه‌های گیاهی مختلف ایفا می‌کند (Xu *et al.*, 2008 ; Rout & Das, 1997). چنانچه در این پژوهش نیز چنین نتایجی مشاهده شد. BAP می‌تواند غالبیت انتهایی را به‌سمت جوانه جانبی هدایت کند، که این پدیده منجر به تقسیم سلولی در سلول‌های مریستمی در جوانه و افزایش تعداد نوساقه شده و سرعت تقسیم سلولی را در جوانه‌های جانبی افزایش می‌دهد

(Gomez *et al*., 2008). در مطالعه‌ای که توسط Gupta و Banerjee (۱۹۷۵) روی سیاهدانه انجام شد، مشاهده شد که با انتقال کالوس از محیط کالوس‌زایی حاوی NAA و شیرنارگیل به محیط حاوی IAA به‌میزان ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر و شیر نارگیل و یا محیط حاوی NAA به‌میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر برخی از کالوس‌ها سبز رنگ شده و تولید نوساقه می‌کنند و برخی از کالوس‌ها تولید شکلهای میله مانند کرده و برخی بدون تغییر باقی می‌مانند و ایجاد ساختارهای برگ مانند فقط از کالوس‌های برگی و شاخه‌ها هم از کالوس برگی و هم از کالوس ساقه گزارش شد و حدود ۵٪ از کالوس‌های برگی نیز تولید گیاهچه کردند (Banerjee & Gupta, 1975).

در مطالعه‌ای نشان داده شده که تمایز اندام‌های گیاهی از کالوس‌های ریشه، ساقه و برگ با اولین واکشت شروع شده و بعد از هشتمین واکشت به‌جز در کالوس برگی که هنوز هم دارای ظرفیت لازم برای باززایی می‌باشد به‌طور کامل متوقف می‌شود (Banerjee& Gupta, 1975). این نتایج با مشاهدات موجود مبنی بر وجود ظرفیت کالوس برگی برای باززایی بعد از چندین بار واکشت مطابقت دارد. در پژوهشی که توسط Chand و Roy (۱۹۸۰) روی سیاهدانه انجام شد، مشاهده شد که باززایی از کالوس و تمایز ریشه و اندام‌های هوایی پس از حذف اکسین و کینین از محیط کشت رخ می‌دهد، اما قرار گرفتن در معرض اکسین برای چند روز قبل از انتقال کالوس‌ها به محیط عاری از اکسین برای اندام‌زایی پس از آن ضروریست (Schmauder & Doebel, 1991). این نتایج با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق متفاوت بود و می‌تواند ناشی از تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف سیاهدانه باشد. در این تحقیق مشاهده شد که کالوس‌ها بعد از قرارگیری در محیط حاوی سیتوکینین BAP، بعد از چندین بار واکشت شروع به باززایی کرده و نیازی به محیط حاوی اکسین و بعد عاری از هورمون برای القاء باززایی نبود، به‌طوری‌که در سایر مطالعات انجام شده روی دیگر گیاهان، برای القاء باززایی چنین فرایندی مشاهده نشده است. در تحقیق انجام شده روی گیاه بامبو رسمی *Bambusa vulgaris*، برای القاء باززایی، کالوس‌ها به محیط حاوی مقادیر بالای سیتوکینین BAP نسبت به اکسین IBA منتقل شدند. به‌عبارت دیگر برای اندام‌زایی پس از آن فرایند قرار گرفتن در معرض اکسین برای چند روز قبل از انتقال کالوس‌ها به محیط عاری از اکسین ضروری نبود (Rout & Das, 1997).

برای القاء ریشه‌زایی در نوساقه‌های باززایی شده سیاهدانه از دو هورمون NAA و IBA در سه غلظت ۰/۵، ۱/۰ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. اغلب ساقه‌هایی که رشد مناسبی دارند برای القاء ریشه‌دهی به محیط حاوی اکسین منتقل می‌شوند که از بین انواع هورمون‌های اکسین، NAAدر القای ریشه‌دهی بسیار موفق بوده است (Maliti *et al*., 2005). همچنین در مطالعه انجام شده بر روی گیاه پیرتروم Tanacetum cinerariifolium مشاهده شد که هورمون NAA دارای کارایی بالایی برای ریشه‌زایی می‌باشد (Hedayat *et al*., 2009). در این مطالعه بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در صورتی‌که در غلظت‌های کمتر از این مقدار (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و بیشتر از این مقدار (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) کاهش ریشه‌زایی را به‌همراه داشت و در محیط‌های حاوی IBA ریشه‌زایی مشاهده نشد. به‌نحوی‌که کاهش مقدار نمک‌های معدنی موجود در محیط کشت، مرحله انتقال به‌خاک و سازگاری ریشه را راحت‌تر می‌کند (Dalal & Rai, 2004). البته تأثیر کاهش نمک و ساکارز در مرحله ریشه‌زایی در گزارش‌های متعددی بیان شده است (Nagori & Purohit, 2004). بر همین اساس، در این تحقیق نیز از محیط کشت ۱/۲MS به‌منظور ریشه‌زایی استفاده شد و نتایج مطلوبی به‌دست آمد.

به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که هورمون‌های مناسب در مرحله کالوس‌زایی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP می‌باشند، در مرحله باززایی، فقط در محیط MS حاوی BAP با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر باززایی مشاهده شد و بیشترین میزان ریشه‌زایی نیز در محیط MS ۱/۲ حاوی ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده

شد. با توجه به ارزش بالای گیاه سیاهدانه در زمینه پزشکی و داروسازی می‌توان از کشت بافت برای تولید بیشتر این گیاه بهره برد. القاء کالوس در سیاهدانه به یک دوره زمانی کوتاه نیاز دارد و از آنجا که با توجه به نتایج به‌دست آمده از سایر مطالعات ظرفیت کالوس برای تولید ماده مؤثره تایموکینون بسیار بالاست، بنابراین استفاده از تکنیک کشت بافت برای تولید بیشتر این ماده از لحاظ اقتصادی و زمانی بسیار مقرون به‌صرفه می‌باشد. به‌طوری‌که با استفاده از کشت درون‌شیشه‌ای این گیاه، علاوه بر دسترسی به منبع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات نسبت به گیاه و تولید ترکیبات جدید نیز امکان‌پذیر می‌گردد و پیشنهاد می‌شود که با به‌کارگیری مهندسی ژنتیک به شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ژن‌های دخیل در این مسیرها پرداخت، و افزایش بیان این ژن‌ها را با دست‌ورزی آنها و انتقال آنها از موجودی به موجود دیگر فراهم کرد. شناسایی مسیرهای مؤثر در تولید ماده مورد نظر، افزایش بیان ژن‌های مورد نظر و خاموشی یا کنترل میزان بیان ژن‌های دیگر از مواردی است که به‌نظر می‌رسد می‌توانند نقش مهمی را در افزایش تولید مواد ارزشمند در سیاهدانه ایفا کنند که لازمه این فرایند دستیابی به یک پروتکل مناسب باززایی و پرآوری در سیاهدانه می‌باشد.

منابع مورد استفاده

–Ahmadi, E., Hosseini, N.S., Jalilvand, H. and Salehian, A.H., 2012. *In vitro* somatic propagation of *Ziziphus spina christti* (L.) Willd via indirect regeneration from leaf explants. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 20: 111-123

–Alemi, M., Sabouni, F., Sanjarian, F., Haghbeen, K. and Ansari, S., 2013. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. AAPS PharmSciTech, 14: 160-167.

–Ali, B.H. and Blunden, G. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. Phytotheraphy Research, 17: 299-305.

–Al-Majed, A.A., Al-Omar, F.A. and Nagi, M.N. 2006. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. European Journal of Pharmacology, 543: 40-47.

–Banerjee, S. and Gupta, S., 1975. Morphogenesis in tissue cultures of different organs of *Nigella sativa*. Physiologia Plantarum, 33: 185-187.

–Banerjee, S. and Gupta, S., 1976. Embryogenesis and differentiation in *Nigella sativa* leaf callus *in vitro*. Physiologia Plantarum, 38: 115-120.

–Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D.M., Lev, E., Fait, A. and Lewinsohn, E., 2012. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. Molecules, 17: 10159-10177.

–Bourgou, S., Bettaieb, I., Saidani, M. and Marzouk, B., 2010. Fatty acids, essential oil, and phenolics modifications of black cumin fruit under naclstress conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 12399–12406

–Chand, S. and Roy, S.C., 1980. Study of callus tissues from different parts of*Nigella sativa(Ranunculaceae)*. Experientia, 36: 305-306.

–Dalal, N.V. and Rai, V.R., 2004. *In vitro* propagationof *Oroxylum indicum* Vent. a medicinally importantforest tree. Journal of Forest Research, 9: 61–65.

–Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. and Yamakado, M., 1997. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 2117–2121

–Ferdous, A.J., Islam, S.N., Ahsan, M., Hasan, C.M. and Ahmed, Z.U., 1992. *In vitro* antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug-resistant isolates of *Shigella* spp. and isolates of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. Phytotherapy Research, 6:137-140

–Gomez-Leyva, J.F., Martinez-Acosta, L.A., Lopez-Muraira, I.G., Silos-Espino, H., Ramirez-Cervantes, F. and Andrade-Gonzalez, I., 2008. Multiple shootregeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) froma shoot apex culture system. International Journal of Botany, 4: 326–330.

–Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P. and Meyerowitz, E. M. 2007. Pattern formation during de novo assembly of the Arabidopsis shoot meristem. Development, 134: 3539–3548.

–Hedayat, M., Abdi, G. and Khosh-Khui, M., 2009. Regeneration via direct organogenesis from leaf and petiole segments of pyrethrum [*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Schultz-Bip.]. Am Eurasian J Agric Environ Sci., 6: 81-87.

directshoot bud differentiation on hypocotyl segments. Scientia Horticulturae, 99: 89–98.
–Özmen, A., Basbulbul, G. and Aydin, T., 2007. Antimitotic and antibacterial effects of the *Nigella sativa* L. seed. Caryologia, 60: 270-272.
–Omidi, M. and Seyed-Tabatabaie, B.A., 2009. Plant Cell and Tissue Culture, Tehran University Press, Tehran, 376pp.
–Rout, G.R. and Das, P., 1997. *In vitro* plant regeneration via callogenesis and organogenesis in *Bambusa vulgaris*. Biologia plantarum, 39: 515-522.
–Schmauder, H.P. and Doebel, P., 1991. *Nigella* spp.: *in vitro* culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites. In Medicinal and Aromatic Plants III, 15: 311-338
–Skoog, F. and Miller, C.O., 1957. Chemical regularion of growth and organ formation in plant tissue cultured. *In vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 54: 118–131
–Venkatachallam, S.K.T., Pattekhan, H., Divakar, S. and Kadimi, U.S., 2010. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seed extracts obtained by supercritical carbon dioxide. Journal of Food Science and Technology, 47: 598-605.
–Xu, Z., Um, Y.C., Kim, C.H., Lu, G., Guo, D.P., Liu, H.L., Bah, A.A. and Mao, A., 2008. Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. Acta Physiologiae Plantarum, 30: 521-528.
–Zaoui, A., Cherrah, Y., Mahassini, N., Alaoui, K., Amarouch, H. and Hassar, M. 2002. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. Phytomedicine, 9: 69-74.
–Iqbal, M.S., Nadeem, S., Mehboob, S., Ghafoor, A., Rajoka, M.I., Qureshi, A.S. and Niaz, B., 2011. Exploration of genotype specific fingerprinting of *Nigella sativa* L. using RAPD markers. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 35: 569-578.
–Khalafalla, M.M., Elaleem, K.G. and Modawi, R.S., 2010. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Almera. Journal of Phytology, 2:40–46.
–Maliti, C.M., Basile, D.V. and Corpe, W.A., 2005.Effects of Methylobacterium spp. Strains on rice (*Oryza sativa* L.) callus induction, plantlet regeneration, and seedings growth *In vitro*.The Journal of the Torrey Botanical Society, 132: 355–367
–Meiners, J., Schwab, M. and Szankowski, I., 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium species*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 89: 169–176.
–Mok, D. W. S. and Mok, M. C., 2001 Cytokinin metabolism and action. Annual Review ofPlant Physiologyand Plant Molecular Biology, 52:89–118.
–Morikawa, T., Xu, F., Ninomiya, K., Matsuda, H. and Yoshikawa, M., 2004. Nigellamines A3, A4, A5, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 52: 494-497.
–Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
–Nagori, R. and Purohit, S.D., 2004. *In vitro* plantletregeneration in *Annona squamosa* through

Effects of growth regulators on *in vitro* callogenesis and regeneration of black cumin (*Nigella sativa*)

S. Hoseinpanahi[1], M. Majdi[2]* and Gh. Mirzaghaderi[3]

1- M.Sc., Agricultural Biotechnology, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran
2*- Corresponding auther, Assist. Prof., Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran, Email: m.majdi@uok.ac.ir
3- Assist. Prof., Department of Plant Breeding, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R.Iran

Received: 19.01.2016 Accepted: 02.04.2016

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa*) is one of the most important medicinal plants belongs to Ranunculaceae. In spite of its significance in pharmaceutical industry, tissue culture and micropropagation of the species is not well studied yet. Hence, based on the issue we aimed to study its callogenesis and regeneration on leave explants of the species. *In vitro* provided explants of leave were cultured on MS medium supplemented with NAA (0.5, 1, 1.5 mgL^{-1}) and BAP (0.2, 0.5, 1 mgL^{-1}). Half MS medium supplemented with 0.5, 1 and 1.5 mgL^{-1}NAA and IBA were used for rooting the regenerated shoots. Results showed that higher percentage of callogenesis was observed on MS medium supplemented with 0.5 mgL^{-1}NAA and 0.5 mgL^{-1} BAP. Shooting was observed on MS medium (1mgL^{-1}BAP) and rooting on half MS (1 mgL^{-1}NAA), respectively. Results indicated that callogenesis, shooting and rooting of black cumin are highly affected by hormonal combination levels.

Keywords: Auxin, black cumin, callogenesis, cytokinin, regeneration, tissue culture.