DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2014.4918

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۷۳-۱۶۳ (۱۳۹۲)

تعیین محیط کشت و ترکیب هورمونی مناسب جهت القای کالوس و استقرار کشت تعلیقی سلولی زیره سیاه *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.

سارا خسروی‌نیا[۱]، سید مهدی زیارت‌نیا[۲*]، عبدالرضا باقری[۳] و سید حسن مرعشی[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، پست‌الکترونیک: m.ziaratnia@rifst.ac.ir
۳- استاد، بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد
٤- دانشیار، بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۰٦ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۵

چکیده

امروزه استفاده از قابلیت‌های کشت سلولی برای تولید مواد مؤثره دارویی بسیار مورد توجه است. در این پژوهش القاء و رشد کالوس زیره سیاه به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم در دو محیط کشت جامد MS و B_5 که هر یک دارای ۲ mg/l 2,4-D و ۲ mg/l Kin و ۰/۵ و ۲mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA بودند، مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش دیگر، رشد کالوس در محیط کشت MS مایع حاوی ٤ ترکیب هورمونی متفاوت، 2,4-D (۲ mg/l و ۰/۵) به همراه ۰/۵ mg/l Kin و NAA (۲ mg/l و ۰/۵) به همراه ۰/۵ mg/l BA مورد بررسی قرار گرفت. سپس استقرار کشت سلولی این گیاه و بررسی روند رشدی آن در محیط کشت MS مایع حاوی دو ترکیب مختلف هورمونی اشاره شده در قسمت القاء کالوس انجام شد. بیشترین وزن خشک و درصد کالوس‌زایی در محیط کشت‌های جامد و بالاترین مقدار وزن تر کالوس و وزن تر و خشک سلول در محیط کشت MS مایع در تیمار حاوی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA مشاهده شد. لازم به ذکر است که از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن خشک در هر دو محیط کشت MS و B_5 جامد حاوی این تیمار هورمونی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. البته منحنی رشدی سلول‌ها در تیمار حاوی ۲ mg/l 2,4-D و ۰/۵ mg/l Kin پس از ۳ هفته و در تیمار حاوی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ BA mg/l پس از ٤ هفته به حداکثر مقدار رسید.

واژه‌های کلیدی: زیره سیاه، کالوس، کشت تعلیقی سلولی.

مقدمه

زیره سیاه *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. ازجمله گیاهان دارویی و ادویه‌ای است، که بومی خاورمیانه و به‌ویژه جنوب شرقی ایران است. این گیاه به صورت وحشی در مناطق مختلف کرمان، خراسان شمالی، شرق زاگرس تا بندرعباس و جنوب البرز می‌روید (Zargari, 1990). این گیاه در دهه ۷۰ هجری شمسی در ایران زراعی شده و در حال حاضر در بعضی از نقاط کشور به‌ویژه استان خراسان به‌صورت زراعی کشت می‌گردد (Khosravi, 1994). طبق اسناد موجود از گذشته‌های دور، از بذر این گیاه در میان ایرانیان به‌عنوان اشتهاآور، خلط‌آور، ضدگرفتگی عضلات، تقویت‌کننده

معده و کاهش‌دهنده قند خون استفاده شده‌است (Zargari, 1990). از عصاره این گیاه علاوه بر صنعت غذا و دارو، در برخی صنایع آرایشی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Salehi-Sormaghi *et al*., 2002).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی دارای فعالیت‌های بیولوژیکی جالب توجهی بوده و علاوه بر کاربردهای پزشکی و داروسازی، از آنها به‌عنوان حشره‌کش، رنگیزه، چاشنی و خوشبوکننده نیز استفاده می‌شود (Goossens *et al*., 2003). ترکیب‌های با ارزش موجود در بذر زیره سیاه نیز توسط محققان مختلفی در داخل و خارج از کشور مورد بررسی قرار گرفته است و بالغ بر ۲٦ ترکیب تاکنون شناسایی شده است که ازجمله مهمترین آنها می‌توان به آلفا–پینن (α-Pinene)، کومین آلدئید (Cuminic Aldehyde)، بتا–پینن (β-Pinene)، میرسن (Myrcene)، گاما–ترپینن (γ-Terpinene)، پارا–سیمن (p-Cymene) و لیمونن (Limonene) اشاره کرد (Dehghan Kouhestani *et al*., 2009؛ Moghtader *et al*., 2009؛ Takayuki *et al*., 2007؛ Shahsavari *et al*., 2008). به‌طوری‌که تا سالیان اخیر این مواد با ارزش عمدتاً از طریق استخراج عصاره مواد گیاهی تولید شده در مزارع یا زیستگاه‌های وحشی تهیه می‌شده، اما به دلایل متعددی تولید درون شیشه‌ای آنها به‌عنوان یک روش جایگزین مورد توجه قرار گرفته‌است (Vanisree *et al*., 2004). به‌طوری‌که با استفاده از کشت سلولی تعلیقی، امکان تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیب‌های آلکالوئیدی ضدسرطان، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، طعم‌دهنده‌ها، رنگدانه‌ها، محرک‌ها و حشره‌کش‌ها که از نظر صنعتی بسیار مورد توجه می‌باشند، فراهم شده‌است. امروزه کشت سلول‌های گیاهی به‌عنوان یک ابزار مهم در تحقیقات کشت سلولی تلقی می‌شود (Chalabian & Ourmazdi, 2007). به‌عنوان نمونه می‌توان از کشت تعلیقی در تولید متابولیت‌های با ارزشی نظیر آجمالیسین (Ajmalicine)، آزادیراکتین (Azadirachtin) و ایزوفلاونوئیدها استفاده کرد (Gueven & Knorr, 2011؛ Prakash & Srivastava, 2008؛ Lee-Parsons & Shuler, 2005). حتی در برخی موارد در شرایط کشت سلولی ترکیب‌های جدیدی تولید شده‌اند که در شرایط معمولی در گیاه اصلی وجود ندارند (Ziaratnia *et al*., 2009). این مثال‌ها نشان می‌دهند که می‌توان در محیط کشت تعلیقی متابولیت‌های ثانویه مهم گیاهی را تولید کرد.

در ارتباط با کشت درون شیشه‌ای زیره سیاه اطلاعات محدودی وجود دارد. در یک مقاله از کشت مریکارپ آن در محیط کشت MS جامد حاوی ۲ mg/l 2,4-D و mg/l ٤ Kin، کالوس بدست آمده‌است (Wakhlu *et al*., 1990). در مطالعه دیگری از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای زیره سیاه در محیط کشت B_5 جامد حاوی ۲ mg/l NAA و ۲ mg/l Kin برای القاء و رشد کالوس استفاده شده‌است (Sharifi, 1995). همچنین در تحقیق دیگری که توسط Ziaratnia (2000) انجام شد، برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا از غلظت‌های مختلف 2,4-D و NAA به‌طور جداگانه در ترکیب با Kin استفاده شد. در این آزمایش بهترین کالوس در تیمارهایی با غلظت بالای اکسین و سیتوکنین بدست آمد. در بررسی Valizadeh و همکاران (۲۰۰۸) از ریزنمونه محور جنینی در محیط کشت B_5 جامد حاوی غلظت‌های مختلف NAA، 2,4-D به تنهایی یا همراه با Kin کالوس بدست آمده است. در این بررسی بیشترین تعداد ریزنمونه تولیدکننده کالوس مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ mg/l 2,4-D و

۲ mg/l Kin یا ۱ mg/l NAA و ۲ mg/l Kin بود. همچنین از ریزنمونه هیپوکوتیل زیره سیاه در محیط کشت MS حاوی NAA (۰ mg/l، ۰/۱، ۱ و ۲) و 2,4-D (۰ mg/l، ۰/۱، ۱ و ۲) به تنهایی یا همراه با Kin (۰ mg/l، ۰/۵، ۱، ۲ و ٤) کالوس بدست آمد (Valizadeh *et al*., 2006). برای القاء و رشد کالوس در محیط کشت جامد و استقرار کشت تعلیقی *Centella asiatica* از ریزنمونه‌های برگ این گیاه در محیط کشت MS جامد و مایع حاوی BA (۰/۵ mg/l، ۱ و ۱/۵)، NAA (۱ mg/l) و 2,4-D (۱ و ۱/۵) استفاده کردند (Nath & Buragohain, 2005).

با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه مهم در زیره سیاه و همچنین با در نظر گرفتن تجارب موفق بدست آمده در تولید متابولیت‌های ثانویه از روش سیستم کشت سلولی در گیاهان دیگر، انجام این مهم در زیره سیاه را ممکن می‌کند. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین محیط کشت و ترکیب هورمونی مناسب جهت القاء کالوس و استقرار سیستم کشت سلولی در زیره سیاه انجام شده‌است.

مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه

بذر استفاده شده در این پژوهش توده زراعی شده‌ای است که از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. به‌منظور القاء کالوس، پس از شستشو بذرها به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و بعد به مدت ۲۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی شدند و پس از آن سه مرتبه (هر مرتبه ۱۰ تا ۱۵ دقیقه) با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت ساده جوانه‌زنی دارای ۰/۵ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت و در دمای ۱±٤°C نگهداری شدند. پس از گذشت ۸ هفته بذرهای جوانه زده به‌عنوان مواد اولیه به‌منظور القاء کالوس مورد استفاده قرار گرفتند.

بهینه‌سازی شرایط برای القاء و رشد کالوس

به‌منظور القاء کالوس، قطعات بذرهای جوانه‌زده در محیط کشت‌های MS و B_5 جامد حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و دو ترکیب هورمونی متفاوت طبق جدول ۱ کشت شدند. pH محیط کشت‌ها روی ۵/۸ تنظیم و بعد در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. به‌منظور القاء کالوس، نمونه‌های کشت شده در دمای ۱ ± ۲۵°C و در تاریکی قرار گرفتند.

جدول ۱- محیط کشت، ترکیب و غلظت هورمون‌های مورد استفاده در القاء و رشد کالوس زیره سیاه در محیط کشت جامد

محیط کشت	ترکیبات هورمونی مورد استفاده در کالوس‌زایی
MS	۰/۵ mg/l Kin+ ۲ mg/l 2,4-D
MS	۰/۵ BA mg/l + ۲ mg/l NAA
B_5	۰/۵ mg/l Kin+ ۲ mg/l 2,4-D
B_5	۰/۵BA mg/l + ۲ mg/l NAA

به‌منظور بررسی روند تغییرات وزن تر، خشک و درصد کالوس‌زایی در ٤ تیمار مورد بررسی (۲ محیط کشت MS و B_5 که هر یک دارای دو ترکیب هورمونی بودند)، ٤ پتری‌دیش از هر تیمار که هر پتری‌دیش حاوی ٦ نمونه بود، تهیه شد و هر ماه یک پتری از هر تیمار را به طور تصادفی انتخاب کرده و پارامترهای مورد نظر بررسی شد. کالوس‌ها هر ۳ هفته یکبار واکشت شدند. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، کالوس‌ها تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ٤۰°C نگهداری شدند.

آزمون ترکیب‌های هورمونی مختلف بر رشد کالوس در محیط کشت مایع

به‌منظور بررسی اثر ترکیب‌های هورمونی مختلف در محیط کشت MS مایع بر سرعت رشدی کالوس‌ها، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام شد. در این آزمایش ٤ تیمار هورمونی مطابق با تیمارهای ذکر شده در جدول ۲ مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت مقدار معینی کالوس در هر تیمار، ظروف کشت در شرایط تاریکی دائم و دمای ۱°C± ۲۵ و بر روی همزن با سرعت ۱۲۰rpm نگهداری شدند. وزن تر آنها هر هفته و در طی یک دوره رشدی ۲ ماه با تخلیه محیط کشت مایع اندازه‌گیری شد.

جدول ۲- ترکیب و غلظت هورمون‌های مورد استفاده در رشد کالوس زیره سیاه در محیط کشت مایع MS

تیمار	ترکیب هورمونی مورد استفاده
۱	۰/۵ mg/l Kin + ۰/۵ mg/l 2,4-D
۲	۰/۵ mg/l Kin + ۲ mg/l 2,4-D
۳	۰/۵ BA mg/l + ۰/۵ mg/l NAA
٤	۰/۵ BA mg/l + ۲ mg/l NAA

استقرار کشت تعلیقی سلولی

برای استقرار کشت تعلیقی سلولی در حدود mg ۳۰۰–۲۰۰ از کالوس‌های شفاف و ترد حاصل از محیط کشت مایع، به ml ۱۵ محیط کشت MS دارای دو ترکیب هورمونی مورد اشاره، منتقل و در شرایط تاریکی دائم و دمای ۱°C±۲۵ و بر روی همزن با سرعت ۱۲۰rpm نگهداری شدند. پس از گذشت ۳ هفته سلول‌ها از صافی سترون (شماره ۳۰) عبور داده شدند و به محیط کشت‌های جدید واکشت شدند؛ به‌منظور بررسی روند تغییرات وزن تر و خشک سلول‌ها در دو تیمار هورمونی بکار رفته، پس از جداسازی و کشت سلول‌ها در محیط کشت‌های جدید، به مدت ۵ هفته و هر هفته ۳ تکرار از هر تیمار را به‌طور تصادفی برداشت و پارامترهای مورد نظر اندازه‌گیری گردید. لازم به ذکر است که در طی این مدت هیچ گونه واکشتی انجام نشد. برای اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها از قیف بوخنر استفاده شد و به‌منظور تعیین وزن خشک آنها تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ٤۰°C نگهداری شدند.

تحلیل آماری

برای آنالیز داده‌های مربوط به درصد کالوس‌زایی ابتدا داده‌ها به آرک سینوس تبدیل شد و بعد تجزیه گردید. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به القاء کالوس و روند رشد آنها در محیط کشت‌های جامد و مایع با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد و رسم شکل‌ها از طریق نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

بهینه‌سازی شرایط برای القاء و رشد کالوس

نتایج درصد کالوس‌زایی (یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها) در دو محیط کشت MS و B_5 جامد و در دو تیمار مختلف هورمونی نشان داد که بالاترین درصد کالوس‌زایی (۸۳ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA حاصل شد که با میانگین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت B_5 حاوی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA معنی‌دار نبود. در مجموع رنگ کالوس در محیط کشت MS، زرد و شفاف‌تر از محیط کشت B_5 بود و هیچ‌گونه اندام‌زایی در آن مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر نوع محیط کشت و تیمارهای مختلف هورمونی بر درصد کالوس‌زایی، رنگ کالوس و اندام‌زایی زیره سیاه پس از گذشت یک ماه

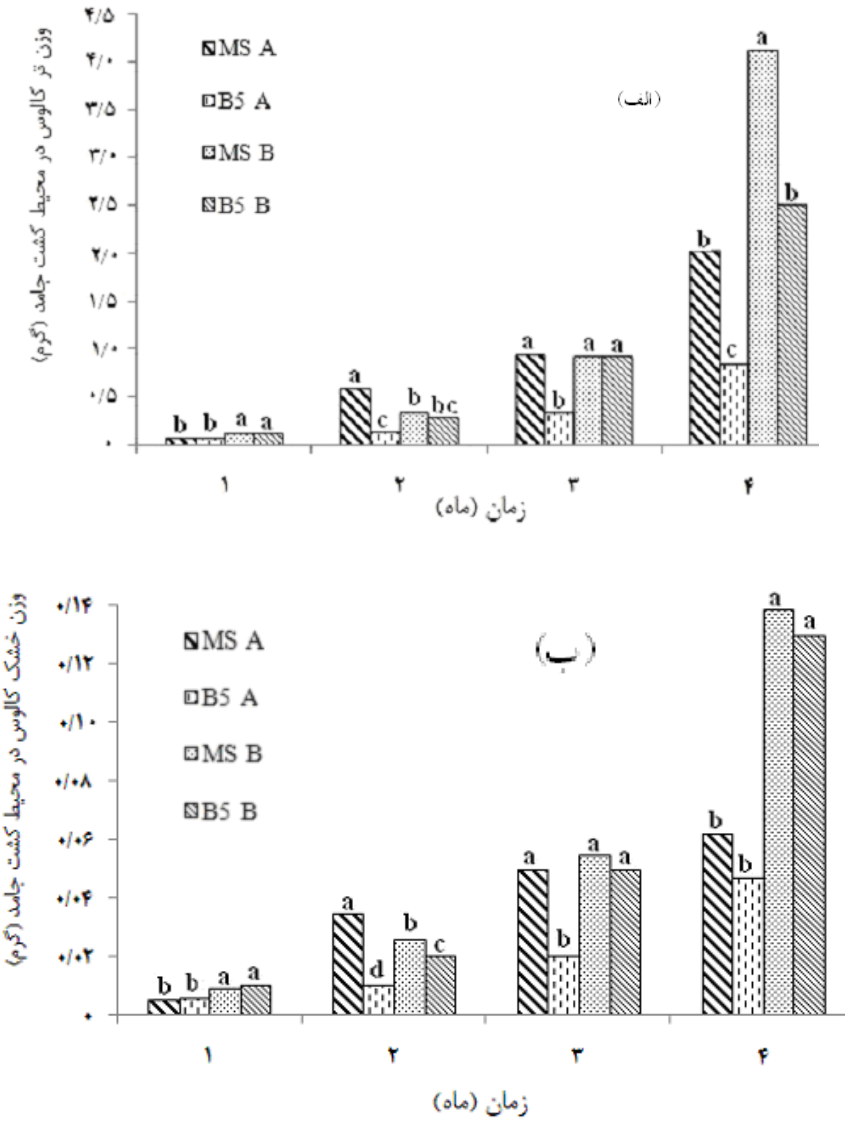
تیمار	درصد کالوس‌زایی	رنگ کالوس	اندام‌زایی
MS B	۸۳/۰ a	کاملا زرد و شفاف	-
B_5 B	۷۱/٤ ab	زرد مایل به قهوه‌ای	کم
MS A	٦۷/۰ b	نسبتاً زرد و شفاف	-
B_5 A	۵۰/۰ c	زرد مایل به قهوه‌ای	کم

MS B: محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l BA؛ B_5 B: محیط کشت B_5 حاوی ۲ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l BA؛ MS A: محیط کشت MS حاوی ۲ mg/l 2,4-D + ۰/۵ mg/l Kin؛ B_5 A: محیط کشت B_5 حاوی ۲ mg/l 2,4-D + ۰/۵ mg/l Kin. میانگین‌های دارای حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری نیستند (p >۰/۰۵)

همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس، پس از گذشت ۱ ماه از کشت ریزنمونه‌ها تا پایان ماه چهارم نشان داد که بهترین محیط کشت و ترکیب هورمونی از نظر افزایش وزن تر و خشک، محیط کشت MS جامد حاوی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA بود (وزن تر و خشک کالوس در این تیمار و در طی این مدت، به‌ترتیب ۳۷ برابر و ۱۵ برابر شد) (شکل۱، الف). در ماه چهارم اختلاف بین میانگین وزن تر کالوس در این تیمار با بقیه تیمارها معنی دار بود، درحالی‌که در ماه سوم این اختلاف فقط در مورد محیط کشت B_5 جامد حاوی ۲ mg/l 2,4-D و ۰/۵ mg/l Kin، معنی‌دار شد. اما در مورد وزن خشک نتایج به گونه دیگری بود، به‌طوری‌که در ماه چهارم اختلاف بین میانگین وزن خشک کالوس در بهترین تیمار مشاهده شده با محیط کشت B_5 جامد حاوی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA، معنی‌دار نبود، ولی با بقیه تیمارهای دیگر معنی دار گردید. اما در ماه سوم نیز همانند وزن تر، این اختلاف فقط در مورد محیط کشت B_5 جامد حاوی ۲ mg/l 2,4-D و ۰/۵ mg/l Kin معنی‌دار شد (شکل ۲).

شکل ۱- کالوس (الف و ب) و کشت سلولی

(ج) حاصل از قطعات بذر جوانه زده زیره سیاه در محیط کشت جامد و مایع MS.

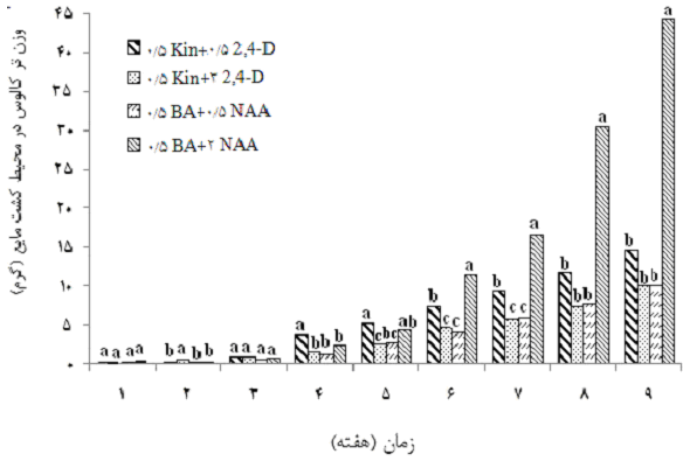


شکل ۲- روند تغییرات وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) کالوس‌های زیره سیاه در دو محیط کشت MS و B_5 جامد با دو ترکیب هورمونی متفاوت

MS A: محیط کشت MS حاوی ۰/۵mg/l Kin + ۲ 2,4-D mg/l؛ B_5 A: محیط کشت B_5 حاوی ۰/۵ mg/l Kin + ۲ mg/l 2,4-D؛ MS B: محیط کشت MS حاوی ۰/۵ BA mg/l + ۲ mg/l NAA؛ B_5 B: محیط کشت B_5 حاوی ۰/۵ mg/l BA + ۲ mg/l NAA. میانگین‌های دارای حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری نیستند (p >۰/۰۵).

اثر ترکیب‌های مختلف هورمونی بر رشد کالوس در محیط کشت مایع

نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر کالوس در طی ۹ هفته بررسی در محیط کشت MS مایع و در ٤ تیمار مختلف هورمونی و با میانگین ٤ تکرار نشان داد که بهترین تیمار از نظر افزایش وزن تر، تیمار ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA بود (وزن تر کالوس در این تیمار و در طی این مدت، ۲۹۵ برابر شد) (شکل۱، ب). همچنین از هفته پنجم به بعد، بین میانگین وزن تر کالوس در این تیمار با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۳).



شکل ۳- روند تغییرات وزن تر کالوس‌های زیره سیاه در محیط کشت MS مایع با ٤ تیمار هورمونی متفاوت

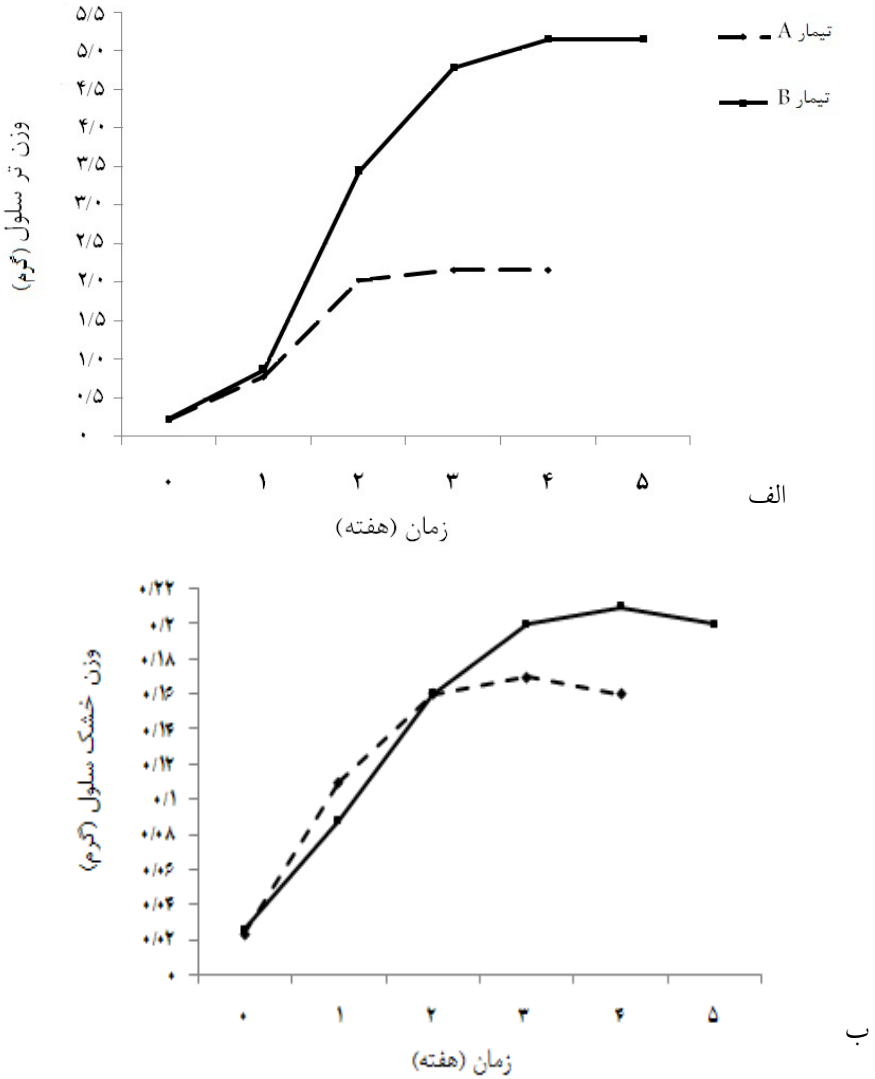
تیمار ۱: ۰/۵ mg/l 2,4-D + ۰/۵ mg/l Kin؛ تیمار ۲: ۰/۵ mg/l Kin + ۲ mg/l 2,4-D؛ تیمار ۳: ۰/۵ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l BA و تیمار ٤: ۰/۵ mg/l BA + ۲ NAA. میانگین‌های دارای حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری نیستند (p >۰/۰۵).

استقرار کشت تعلیقی سلولی

روند تغییرات وزن تر و خشک سلول‌ها در محیط کشت MS مایع و در دو تیمار مختلف هورمونی و با میانگین ۳ تکرار نشان داد که از زمان جداسازی سلول‌ها و کشت آنها در محیط کشت‌های جدید تا پایان هفته چهارم و پنجم، وزن تر و خشک سلول‌ها در تیمار mg/l 2,4-D ۲ و mg/l Kin ۰/۵، به‌ترتیب ۱۰ برابر و ۷ برابر و در تیمار mg/l NAA ۲ و mg/l BA ۰/۵، به‌ترتیب ۲۳ برابر و ۸ برابر گردید. روند رشدی سلول‌ها در دو تیمار مختلف هورمونی متفاوت بود، به نحوی که منحنی رشد در تیمار mg/l 2,4-D ۲ و mg/l Kin ۰/۵، پس از گذشت ۳ هفته و در تیمار mg/l NAA ۲ و mg/l BA ۰/۵، پس از گذشت ٤ هفته به حداکثر مقدار وزن تر و خشک رسیدند. سرعت افزایش رشد سلول‌ها در این دو تیمار کاهشی بود، به نحوی که وزن تر و خشک سلول‌ها در تیمار mg/l 2,4-D ۲ و mg/l Kin ۰/۵ به‌ترتیب از زمان کشت تا هفته اول، ۳/٦ برابر و ٤/۸ برابر، از هفته اول تا دوم ۲/٦ برابر و ۱/٤ برابر و از هفته دوم تا سوم ۱/۰٦ برابر و ۱/۰٦ برابر گردید. در تیمار mg/l NAA ۲ و mg/l BA ۰/۵ نیز به‌ترتیب وزن تر و خشک سلول‌ها از زمان واکشت تا هفته اول ٤ برابر و ۳/۵ برابر، از هفته اول تا دوم ۳/۷ برابر و ۱/۸ برابر، از هفته دوم تا سوم ۱/٤ برابر و ۱/۲۵ برابر و از هفته سوم تا چهارم ۱/۰۱ برابر و ۱/۰۵ برابر گردید (شکل۱، ج و شکل ٤).

بحث

از اواخر دهه ٦۰ میلادی، تکنولوژی کشت بافت و سلول به‌عنوان ابزاری برای مطالعه و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی معرفی شده‌است. با استفاده از سیستم کشت تعلیقی سلولی می‌توان سلول‌های گیاهی را در مقیاس وسیع کشت داد و متابولیت‌های ثانویه آنها را استخراج نمود (Vanisree *et al.*, 2004).



شکل ٤- روند تغییرات وزن تر (الف) و وزن خشک (ب) سلول‌های زیره سیاه در محیط کشت MS مایع با دو تیمار متفاوت هورمونی

تیمار A: ۰/۵ mg/l Kin + ۲mg/l 2,4-D و تیمار B: ۰/۵mg/l BA + ۲mg/l NAA

به همین دلیل در این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی شرایط برای القاء و رشد کالوس زیره سیاه در محیط کشت جامد و بررسی روند رشدی کالوس‌ها در محیط کشت‌های جامد و مایع و همچنین استقرار سیستم کشت تعلیقی آن، از محیط کشت‌ها و ترکیب‌های مختلف هورمونی استفاده گردید. در میان تیمارهای به‌کار گرفته شده به‌منظور القاء و رشد کالوس در محیط کشت جامد، تیمار هورمونی ۲ mg/l NAA و ۰/۵ mg/l BA به‌عنوان بهترین تیمار برای این منظور شناخته شد. در گزارش Sharifi (1995) نیز استفاده از هورمون NAA منجر به تولید کالوس بیشتری نسبت به 2,4-D گردید. هر چند که استفاده از 2,4-D به‌عنوان یک هورمون مؤثر در القاء و رشد کالوس در دیگر اعضای خانواده Apiaceae گزارش شده است (Nath & Buragohain, 2005). با وجود آنکه در دو

محیط کشت MS و B_5 جامد حاوی این ترکیب هورمونی از نظر درصد کالوس‌زایی و وزن خشک کالوس اختلاف معنی‌داری نداشتند، ولی از لحاظ رنگ و شفافیت کالوس و میزان باززایی و همچنین وزن تر به‌ویژه در ماه چهارم اختلاف شدید و معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که در محیط کشت MS بر خلاف محیط کشت B_5 حاوی این ترکیب هورمونی رنگ کالوس کاملا زرد و شفاف بود و میزان وزن تر کالوس در ماه چهارم ۱/۷ برابر بیشتر رشد نشان داد و همچنین هیچ گونه باززایی مشاهده نشد. محیط کشت MS به‌عنوان محیطی مناسب برای القاء و رشد کالوس توسط دیگر محققان (Narayan *et al.*, 2005؛ Valizadeh *et al.*, 2007) نیز پیشنهاد شده است. اختلاف این تیمار هورمونی با دیگر تیمارها بر روی رشد کالوس در محیط مایع بیشتر مشخص است، به‌طوری‌که این اختلاف به بیش از ٤ برابر می‌رسد. اثر محیط کشت MS مایع و تیمار هورمونی ۲ mg/l NAA و BA mg/l ۰/۵ بر رشد کالوس بیش از ۱۰ برابر محیط MS جامد بود. در محیط کشت MS مایع با کاهش غلظت 2,4-D در سطح ثابتی از غلظت Kin رشد کالوس افزایش یافت که با نتایج Valizadeh و همکاران (۲۰۰۸) همسویی دارد. براساس نتایج حاصل از پژوهش Watts و همکاران (۱۹۸٤) هورمون‌های 2,4-D و NAA مناسب‌ترین هورمون‌های گروه اکسین برای افزایش رشد سلولی در کشت تعلیقی کرفس هستند. استفاده از ترکیب هورمونی NAA و BA به‌طور مؤثری سبب افزایش وزن تر و خشک سلول‌ها در محیط MS گردید. استفاده از این ترکیب هورمونی برای استقرار کشت تعلیقی سلولی توسط محققان دیگر نیز تأیید شده است (Krolicka *et al.*, 2006؛ Wang *et al.*, 2001). در مجموع نتایج این آزمایش نشان داد که برای افزایش درصد کالوس‌زایی و تسریع در رشد کالوس و سلول‌ها، محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلفی از NAA و BA می‌تواند بسیار مؤثر باشد، که این امر توسط Toliat و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش شده است.

سپاسگزاری

از مسئولان پژوهشکده علوم و صنایع غذایی که حمایت مالی این پژوهش را بر عهده گرفتند و امکانات لازم را در جهت پیشبرد این تحقیق فراهم نمودند، کمال تشکر را داریم.

منابع مورد استفاده

–Dehghan Kouhestani, S., Baghizadeh, A., Ranjbar, Gh.A. and Babaiyan Jelodar, N.A., 2009. Investigation of genetic diversity in Persian Cumin [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.] germplasm from Kerman province using RAPD molecular markers. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24: 414-427.

–Goossens, A., Hakkinen, S., Laakso, I., Seppanen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Soderlund, H., Zabeau, M., Inze, D. and Oksman-Caldentey, K.M., 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. The National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 8595-8600.

–Gueven, A. and Knorr, D., 2011. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. Journal of Food Engineering, 103: 237-243.

–Khosravi, M., 1994. Black zira (*Bunium persicum*) botany, ecology and potential as a cultivated plant. M.Sc. thesis, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. 27-30.

–Krolicka, A., Kartanowicz, R., Wosinski, S.A., Szpitter, A., Kaminski, M. and Lojkowska, E., 2006. Induction of secondary metabolite production in transformed callus of *Ammi majus* L. grown after electromagnetic treatment of the culture medium. Journal of Enzyme and Microbial Technology, 39: 1386-1391.

–Lee-Parsons, C.W.T. and Shuler, M.L., 2005. Sparge gas composition affects biomass and ajmalicine

–Valizadeh, M., Safarnejad, A., Nematzadeh, G.A. and Kazemitabar, S.K., 2006. Regeneration of plantlets from embryo explants of *Bunium* persicum (Boiss.) B. Fedtsch. Indian Journal of Crop Science, 1: 93-96.

–Valizadeh, M., Kazemi Tabar, S.K. and Nematzadeh, G.A., 2007. Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of Bunium persicum. (Boiss.) B. Fedtsch. Research Journal of Medicinal Plant, 1: 48-53.

–Valizadeh, M., Safarnejad, A., Nematzadeh, G.A. and Kazemitabar, S.K., 2008. Regeneration of plantlets from embryo explants of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Iranian Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources, 11: 33-38.

–Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.N., Lin, C.Y. and Tsay, H.S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture. Journal of Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 1-22.

–Wakhlu, A.K., Nagari, S. and Barna, K.S., 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Bunium persicum* Bioss. Journal of Plant Cell Reports, 9: 137-138.

–Wang, C., Wu, J. and Mei, X., 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 404-410.

–Watts, M.J., Galpin, I.J. and Collin, H.A., 1984. The effect of growth regulators, light and temperature on flavour production in celery tissue cultures. Journal of New Phytologist, 98: 583-591.

–Zargari, A., 1990. The Medicinal Plants. Tehran University Publishers, Tehran, 940 pp.

–Ziaratnia, S.M., 2000. Somatic embryogenesis in Black zira (*Bunium persicum*). Iranian Research Organization for Science and Technology- Khorasan Branch. 47-49.

–Ziaratnia, S.M., Ohyama, K., Hussein, A.A.F., Muranaka, T., Lall, N., Kunert, K.J. and Meyer, J.J.M., 2009. Isolation and identification of a novel chlorophenol from a cell suspension culture of *Helichrysum aureonitens*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 57: 1282-1283.

production from immobilized cell cultures of *Catharanthus roseus*. Journal of Enzyme and Microbial Technology, 37: 424-434.

–Moghtader, M., Iraj Mansori, A., Salari, H. and Farahmand, A., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Bunium persicum* Boiss. seed. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25: 20-28.

–Narayan, M.S., Thimmaraju, R., and Bhagyalakshmi, N., 2005. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. Journal of Process Biochemistry, 40: 351-358.

–Nath, S. and Buragohain, A.K., 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. Journal of Biologia Plantarum, 49: 411-413.

–Ourmazdi, P. and Chalabian, F., 2007. Tissue culture and organogenesis of *Salvia nemorosa.* Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14: 69-79.

–Prakash, G. and Srivastava, A.K., 2008. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. Journal of Biochemical Engineering Journal, 40: 218-226.

–Salehi-Sormaghi, M.H., Amin, G. and Kaveh, S., 2002. *Bunium persicum*. Ministry of Health and Medical Education Tehran, 2: 426-432.

–Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Naghdibadi, H., 2008. Antioxidant activity and chemical characterization of essential oil of *Bunium persicum*. Journal of Plant Foods for Human Nutrition, 63: 183-188.

–Sharifi, M., 1995. Comparitive investigation of essences of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* seed and explant fragments. M.Sc. thesis, Agricultural College, Tehran University. 32-34.

–Takayuki, S., Mami, S., Azizi, M. and Yoshiharu, F., 2007. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. Journal of Chemical Ecology, 33: 2123-2132.

–Toliat, S.M., Abdoli, M., Ghorbani Moshgin, M., Khalighi Sigaroodi, F. and Omidi, M., 2008. Propagation of *Ginkgo biloba* L. through tissue culture of various plant parts. Iranian Journal of Medicinal plants, 29: 156-163.

Optimization of suitable culture medium and hormone combinations for callus induction and cell suspension culture establishment of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.

S. Khosravinia[1], S.M. Ziaratnia[2*], A. Bagheri[3] and S.H. Marashi[4]

1- M.Sc., Collage of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R.Iran
2*- Corresponding Author, Assoc. Prof., Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, I.R.Iran, E-mail: m.ziaratnia@rifst.ac.ir
3- Prof., Collage of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R.Iran
4- Assoc. Prof., Collage of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, I.R.Iran

Received: 12.27.2012 Accepted: 03.06.2013

Abstract

Nowadays production of secondary metabolites from plant cell suspension cultures has become an attractive subject. In this study, callus induction of black zira, an important medicinal plant, was investigated in two MS and B_5 solid media, supplemented with 2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA, and 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin. Another experiment was also carried out for callus culture in MS liquid medium with four different combinations of plant growth regulators, 2,4-D (2 and 0.5 mg/l) + 0.5 mg/l Kin, and NAA (2 and 0.5 mg/l) + 0.5 mg/l BA. For the cell suspension cultures, the hormonal combinations, as above mentioned in callus induction, were used in liquid MS medium. Results showed that the best response for the callus induction percentage and callus dry weight in solid medium as well as callus fresh weight in liquid medium was obtained from MS medium supplemented with 2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA. It was also found that liquid MS medium with 2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA was suitable for the cell suspension cultures of black zira due to the higher cell dry weight in this stage compared to other treatments. The stationary phase in growth course was observed in MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kin and 2 mg/l NAA + 0.5 mg/l BA after three and four weeks, respectively.

Key words: *Bunium persicum*, Callus, Cell suspension culture.