مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 2، تابستان 1392)

بررسی کال زایی و جنین زایی سوماتیکی در زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.)

سیداحمد سادات نوری*[1]، سیدمحمدمهدی مرتضویان[1]، عباس قمری زارع[2]، منصور امیدی[3]، مریم حوری[4]

[1] بترتیب استاد و استادیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.

[2] استادیار گروه تحقیقات و زیست فناوری، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

[3] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کرج، دانشگاه تهران.

[4] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: 1390/12/23، تاریخ پذیرش: 1391/4/17

چکیده

زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.) گیاهی از خانواده چتریان است که علی‌رغم اهمیت دارویی فراوان، به خاطر مشکلات ناشی از جوانه‌زنی و طول دوره رویش طولانی، تاکنون در کشورمان اهلی نشده است و در طبیعت به‌صورت وحشی می‌روید. تکنیک‌هایی نظیر کشت بافت، می‌تواند جهت کاهش طول دوره رویش در این گیاه بسیار مؤثر باشد. در این تحقیق بهینه سازی رشد جنین های سوماتیک، در جهت تولید و تجاری شدن این گیاه دارویی و تولید بذر مصنوعی مورد مطالعه قرار گرفت. از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی اکوتیپ منطقه اصفهان و محیط کشت MS با 14 تیمار هورمونی مختلف جهت بررسی میزان تولید کالوس و جنین های سوماتیکی استفاده گردید. آزمایش بصورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای و در 4 تکرار اجرا گردید. بهترین ریزنمونه جهت تولید جنین سوماتیکی، هیپوکوتیل و بهترین تیمار هورمونی جهت کالوس زایی، ترکیب هورمونی 0/5mg/l Kin mg/l +1NAA و 1mg/l NAA و جهت باززایی جنین رویشی 0/2mg/l 2ip + 0/01mg/l IBA + MS1/2 می باشد. جنین های تولیدی در محیط کشت MS حاوی سیتوکینین 2ip و اکسین IBA رشد طبیعی نشان دادند. با توجه به مشکلات ناشی از جوانه زنی بذور در زیره سیاه، تولید بذر مصنوعی در آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با توجه به موفقیت تولید جنین های سوماتیکی در این پژوهش، تولید بذر مصنوعی در زیره سیاه می تواند مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *زیره سیاه، هیپوکوتیل، برگ لپه ای، کالوس، جنین زایی سوماتیک.*

* نویسنده مسئول: سید احمد سادات نوری تلفن: 02136040615 Email: sasnoori@ut.ac.ir

مقدمه

زیرهٔ سیاه گیاهی با 2n =2x =14 از خانواده چتریان (*Umbelliferae*) است که از پرسابقه‌ترین گیاهان دارویی در جهان محسوب می‌شود. این گیاه در مرکز، شمال شرق، شرق و جنوب ایران می‌روید (Ranjbarian *et al.*, 2004) و اسانس بذر آن در رفع ناراحتی‌های سیستم گوارش از جمله نفخ و دردهای ناشی از گوارش و مسمومیت‌ها و نیز بیماری‌های آسم و دیابت بسیار مؤثر است (Boskabady *et al.*, 2004). اسانس زیره سیاه دارای تأثیرات مطلوب بر فعالیت آنزیم‌های خون، کبد، پانکراس و روند متابولیسم آنهاست (Agrawal *et al.*, 1979). ماده مؤثره اسانس در این گیاه، «کومین‌آلدهید» و «پاراسیمن» می‌باشد که دارای تأثیر ضدّ قارچی هستند (Ranjbarian *et al.*, 2004). اگر چه زیره سیاه غالباً در مزرعه‌های کوچک و به‌صورت محدود در نقاطی از کشورمان کشت و کار می‌گردد ولی تاکنون اهلی‌سازی این گیاه دارویی ارزشمند در ایران صورت نگرفته است و به‌جز در چند کشور جهان، هیچ رقم زراعی از آن معرفی نشده است (Sasani *et al.*, 2006). طولانی بودن طول دوره رویش، وجود خواب بذر و نیاز به پیش‌تیمار سرما جهت جوانه‌زنی، از اهلی‌شدن این گیاه جلوگیری کرده است (Sharifi *et al.*,2003). یکی از راههای کوتاه کردن طول دوره رشد و تولید گیاهان دارویی در مقیاس وسیع و تجاری تولید و توسعهٔ جنین‌های سوماتیکی یا غیر جنسی از طریق کشت بافت است. در جنین‌زایی سوماتیک، مجموعه ای از سلول های غیرجنسی، تشکیل جنین می‌دهند. این جنین‌ها شبیه جنین‌های زیگوتی بوده و در محیط کشت مناسب می‌توانند به نهال تبدیل شوند. باززایی گیاهان با استفاده از جنین‌زایی سوماتیک از یک سلول، در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی به اثبات رسیده است (Ebrahimie *et al.*, 2003; Valizadeh *et al.*, 2009).

ولی زاده و همکاران (Valizadeh *et al.*, 2008) برای ایجاد کالوس های جنین زای زیره پارسی از غلظت های مختلف هورمون های 2,4-D و NAA بطور جداگانه در ترکیب با kin استفاده کردند. در تحقیق وی بهترین کالوس مربوط به تیمارهای با غلظت بالای اکسین و سیتوکینین بود. در این تحقیق برای رشد جنین های سوماتیکی بدست آمده از محیط کشت پایه MS در غلظت های مختلف کینتین استفاده شد که بهترین عکس العمل مشاهده شده مربوط به تیمار 1 میلی گرم در لیتر کینتین بود. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimie *et al.*, 2003) از محور جنینی (جنین برش یافته) در کشت بافت زیره سبز استفاده کردند و در زمان کوتاه و بدون هیچ گونه واکشتی، به باززایی مناسب دست یافتند. بهترین محیط کشت، B5 با ترکیب هورمونی 0/2 میلی گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و 1 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) یا ترکیب هورمونی 0/2 میلی گرم در لیتر NAA و 0/2 میلی گرم در لیتر BAP بود. واخلو (Wakhlu *et al.*,1990) از کشت مریکارپ های

زیره پارسی در محیط کشت MS حاوی 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D و 4 میلی گرم در لیتر Kin، کالوس بدست آورد. جنین های سوماتیکی بدست آمده در محیط کشت پایه و یا حاوی 1 میلی گرم در لیتر کینتین جنین های بالغ و ریشه دار ایجاد نمودند. شریفی (Sharifi *et al.*, 2003) از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ لپه ای در کشت بافت زیره پارسی استفاده کرد. کالوس حاصل از هیپوکوتیل زیره پارسی در محیط B5 حاوی 2 میلی گرم در لیتر NAA و 2 میلی گرم در لیتر Kin رشد سریع تری داشت. تشکیل جوانه و ساقه در هیپوکوتیل، در 0/1 میلی گرم در لیتر NAA و 2 میلی گرم در لیتر Kin و تشکیل جنین های سوماتیکی در محیط MS حاوی 0/5 میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشتر بود. Valizadeh *et al.* (2009) از محور جنینی و محیط کشت B5 حاوی غلظت های مختلف NAA و 2,4-D به تنهایی یا همراه با Kin برای باززایی زیره پارسی استفاده کردند. بیشترین تعداد کالوس از ترکیب هورمونی 0/1 میلی گرم در لیتر 2,4-D و 2 میلی گرم در لیتر Kin یا 1 میلی گرم در لیتر NAA و 2 میلی گرم در لیتر Kin بدست آمد. براساس این تحقیق وجود هورمون سیتوکینین برای باززایی زیره پارسی الزامی نیست. بیشترین فراوانی القای جنین سوماتیکی نیز از ترکیب هورمونی 2 میلی گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد.

در آزمایشات باززایی مختلف، استفاده از اندامهای هوایی بخصوص قطعات هیپوکوتیل بدلیل رشد سریع جهت تولید شاخساره های نابجا رایج تر و با نتایج مطلوب تری همراه بوده است. در اکثر مطالعات، تشکیل مریستم های شاخساره از طریق تشکیل کالوس و برروی آن صورت می گیرد (Dixon & Gonzales, 1994)؛ بنابراین میزان کالوس زایی ریزنمونه حایز اهمیت است. از سوی دیگر، در هر روش ریزازدیادی، غالباً مرحله تکثیر مفید بودن آن روش را تعیین می‌کند. جنین‌زایی سوماتیکی ثانویه دارای پتانسیل بالائی برای تکثیر انبوه گیاه می‌باشد. بعلاوه جنین‌زایی سوماتیکی ثانویه به عنوان راهکاری مناسب و مهم جهت تولید متابولیت‌های جنینی از قبیل چربی‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای پیشنهاد شده است (Raemakers *et al.*, 1995).

تا کنون مطالعه ای درخصوص جنین زایی سوماتیکی با استفاده از ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط کشت MS صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت تولید جنین های سوماتیکی این پژوهش با هدف بررسی میزان تولید کالوس و جنین های سوماتیکی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط کشت MS با 14 تیمار هورمونی مختلف جهت شناسایی بهترین ریزنمونه و تیمار، اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مرحله القا و تولید کالوس

بذور زیره سیاه متعلق به اکوتیپ منطقه حسین آباد خنج خور و بیابانک اصفهان بعنوان ژنوتیپ های مورد تحقیق مورد استفاده قرار

گرفت. به‌منظور تولید برگ لپه‌ای، بذور به گلدان‌های حاوی ماسه استریل شده انتقال یافتند و به‌صورت سطحی کشت شده و به مدت 8 هفته در سرمای 4- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این دوره سرمادهی جهت رشد جنین و امکان پذیر شدن خروج آن از داخل بذر ضروری است (Valizadeh *et al.*, 2009). جهت تسریع در شکستن خواب بذور، علاوه بر سرمای محیط، از محلول جیبرلیک اسید 50 ppm در سه نوبت و با فاصله زمانی هر 3 هفته یکبار به‌همراه آب آبیاری استفاده گردید. پس از جوانه‌زدن بذور، قطعات برگ کوتیلدونی و هیپوکوتیل به عنوان ریزنمونه انتخاب و با کلرومرکوریک 0/1 درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند و سپس با آب اتوکلاو شده، آبکشی گردیدند. ریزنمونه ها به قطعاتی به طول 0/5 سانتیمتر تقسیم شده و در ظروف حاوی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با 14 تیمار هورمونی مختلف قرار گرفتند (جدول 1).

جدول 1- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در کشت هیپوکوتیل و برگ کوتیلدنی در محیط کشت MS، جهت تولید جنین سوماتیکی.

Table 1- Hormone treatments in hypocotyl and cotyledon leaf in MS medium to produce somatic embryos.

کد تیمار Treatment Code	تیمار هورمونی(mg/l) Hormones	کد تیمار Treatment Code	تیمار هورمونی(mg/l) Hormones
A	1mg/l NAA +0.5mg/l Kin	H	4mg/l 2,4 -D
B	1mg/l NAA	I	2mg/l Kin +2mg/l 2,4 -D
C	2mg/l NAA	J	2mg/l Kin + 2mg/l NAA
D	0.5mg/l Kin +0.5mg/l 2,4 -D	K	1mg/l Kin + 2mg/l NAA
E	1mg/l 2,4 -D	L	1mg/l Kin +2mg/l 2,4 -D
F	2mg/l 2,4 -D	M	0.5mg/l 2ip + 1mg/l IBA
G	0.2mg/l BA	N	0.05mg/l TDZ +0.5mg/l IBA

آزمایش بصورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای در 4 تکرار انجام گرفت. کشت ها در شرایط 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی به‌ترتیب در دمای 25 و 19 درجه سانتی‌گراد و به‌مدت 4 هفته در اتاقک رشد نگه‌داری شدند. یادداشت‌برداری از تولید کالوس از برگ‌های کوتیلدونی و هیپوکوتیل نیز پس از 4 هفته انجام گردید و صفات وزن، حجم، تراکم

بافت کالوس، درصد کالوس‌زایی و درصد جنین‌زایی یادداشت‌برداری گردیدند. طول، عرض و ارتفاع کالوس به‌کمک کاغذ میلی‌متری اندازه‌گیری شد و حجم آن محاسبه گردید. وزن کالوس نیز با ترازو اندازه‌گیری شد. از مراحل تکامل جنین‌های تولید شده، توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی 100 عکس گرفته شد. با توجه به نرمال نبودن داده‌ها پس از آزمون، داده‌های حاصل از صفات وزن، حجم و تراکم بافت کالوس، جهت نرمال شدن به توان 0/1 رسانده شدند. این تبدیل به‌کمک فرمان Box-Cox در نرم افزار Minitab انتخاب شد و مناسب‌ترین روش جهت نرمال شدن داده‌ها ارزیابی گردید. جهت آنالیز داده‌های حاصل از درصد جنین‌زایی و درصد کالوس‌زایی نیز ابتدا درصد آنها در هر تکرار محاسبه گردید و پس از تبدیل معکوس، با نرم‌افزار SAS ارزیابی شدند.

مرحله تولید و تکثیر جنین های ثانویه

به‌منظور تولید جنین ثانویه، جنین‌های حاصل از هیپوکوتیل، به سه محیط برتر جنین‌زایی منتقل گردیدند و به‌عنوان ریزنمونه کشت شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای و در 4 تکرار انجام شد. نمونه‌ها در شرایط 16 ساعت نور و 8 ساعت تاریکی به‌ترتیب در دمای 25 و 19 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از 4 هفته یادداشت برداری گردیدند. تعداد جنین‌های ثانویه، وزن، حجم و تراکم بافت کالوس اندازه‌گیری شد و بهترین محیط برای تولید جنین ثانویه معرفی گردید.

مرحله باززایی جنین های رویشی

به‌منظور یافتن محیط رشد مناسب جهت تبدیل جنین‌های رویشی به گیاهچه، جنین‌های تولیدی به محیط کشت MS با 17 تیمار هورمونی مختلف انتقال یافتند (جدول 2) و در شرایط 16 ساعت نور و 8 ساعت تاریکی به ترتیب در دمای 25 و 19 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای (در هر محیط کشت، 4 ریز نمونه) و در 3 تکرار انجام گرفت. پس از 8 هفته، صفات رنگ برگ، طبیعی بودن شکل برگ، رنگ ساقه، و کیفیت ریشه یادداشت‌برداری گردیدند (جدول 3). با توجه به کیفی بودن صفات، جهت ارزیابی داده‌ها از روش‌های آماری غیرپارامتری استفاده گردید و نتایج با آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitneyتوسط نرم‌افزار SPSS ارزیابی شدند.

مرحله سازگاری با شرایط برون شیشه ای

گیاهچه‌های رشد یافته جهت سازگاری با محیط، به گلدان‌های حاوی خاک ضدعفونی شده با ترکیب (1 پیت: 1/2 ورمی‌کولایت و 1 پیت: 1/2 پرلیت) انتقال یافتند و با پوشش پلاستیکی احاطه شدند. این پوشش بتدریج و پس از یک هفته از روی گلدان‌ها برداشته شد.

جدول 2- تیمارهای هورمونی مختلف جهت بهینه‌سازی محیط کشت جنین برای باززایی گیاه از جنین.

Table 2- Different hormone treatments to make an optimized medium for regeneration plantlets from embryos.

کد تیمار Treatment Code	تیمار هورمونی(mg/l) Hormones
B1	MS
B2	MS1/2
B3	MS1/2 +0.01mg/l IBA
B4	MS1/2 +0.01mg/l IBA +0.2 mg/l BA
B5	MS1/2 +0.01 mg/l IBA + 0.2 mg/l 2ip
B6	MS1/2 +0.01mg/l IBA + 0.1mg/l BA +0.1 mg/l 2ip
B7	MS1/2 +0.01 mg/l IBA +0.5 mg/l 2ip
B8	MS1/2 +0.01mg/l IBA + 0.1mg/l BA +0.1 mg/l Kin
B9	MS1/3
B10	MS1/3 +0.01 mg/l IBA
B11	MS1/3 +0.01mg/l IBA + 50ppm Asparagin + 50ppm Glutamine + 50ppm Arjenin
B12	MS1/3 +0.01 mg/l NAA
B13	MS1/3+ 0.01 mg/l NAA + 50ppm Asparagin + 50ppm Glutamine + 50ppm Arjenin
B14	MS1/3+ 0.1 mg/l NAA + 50ppm Asparagin + 50ppm Glutamine + 50ppm Arjenin
B15	MS1/3 (0.5 Nitrate) +0.01 mg/l NAA
B16	MS1/3 (0.5 Nitrate) +0.01 mg/l NAA + 50ppm Asparagin + 50ppm Glutamine + 50ppm Arjenin
B17	MS1/4

جدول3- کدبندی صفات حاصل از گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین در محیط‌های بهینه سازی رشد جنین.

Table 3- Traits coding of plantlets produced from embryos in optimized medium.

کد Code	نوع برگ Leaf type	کد Code	کیفیت ریشه Root quality	کد Code	شکل برگ Leaf shape	کد Code	رنگ ساقه Stem color	کد Code	رنگ برگ Leaf color
1	مرکب	3	طبیعی	3	طبیعی	5	سبز طبیعی	7	سبز طبیعی سبز با نوک
2	کوتیلدونی	2	پفکی	2	کمی غیر طبیعی	4	سبز-بنفش	6	سوخته سبز با نوک
		1	عدم ریشه	1	غیر طبیعی و دفرمه	3	بنفش	5	آلبینو
						2	سیاه	4	بنفش
						1	آلبینو	3	بنفش-آلبینو
								2	آلبینو
								1	نکروزه

نتایج

مرحله القا و تولید کالوس

از 14 تیمار به‌کار رفته جهت کالوس‌زایی، 10 تیمار تولید کالوس نمودند که بیشترین وزن، حجم و تراکم بافت کالوس مربوط به تیمار حاوی 1mg/l NAA بود. در ارتباط با وزن کالوس، تفاوت تیمار حاوی 1mg/l NAA با تیمارهای 1mg/l NAA+0/5 mg/l Kin و mg/l 2NAA معنی‌دار بود (شکل1 و). از نظر حجم کالوس تفاوت تیمار حاوی 1mg/l NAA با تیمار 1mg/l NAA+0/5mg/l Kin معنی‌دار نبود (شکل 1 د) و در مورد صفت تراکم بافت کالوس، تفاوت تیمار حاوی 1mg/l NAA با تیمارهای 1mg/l NAA +0/5mg/l Kin و mg/l 2NAA معنی‌دار نبود (شکل 1 ی). ارزیابی داده‌ها نشان داد که تفاوت بین وزن، حجم و تراکم بافت کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ‌های کوتیلدونی کاملاً معنی‌دار است و ریزنمونه هیپوکوتیل جهت تولید کالوس مناسب‌تر است (شکل های 1 الف-ج). درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل 81% و در برگ‌های کوتیلدونی، 75% ارزیابی شد که با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری داشتند (جدول 4). بیشترین درصد کالوس‌زایی (93%) مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی mg/l 0/5mg/l Kin +1NAA می باشد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار است (شکل 2 الف). تولید جنین رویشی تنها در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل مشاهده شد.

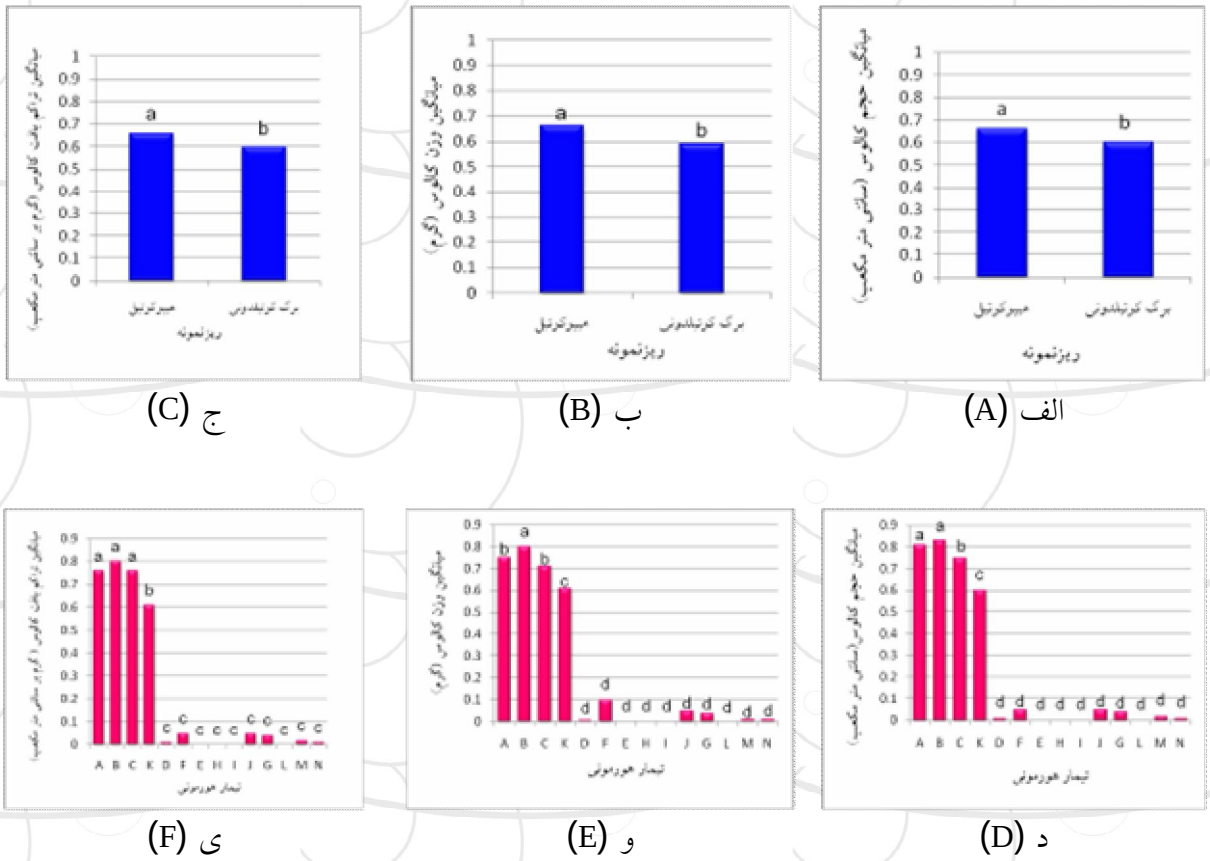
مرحله تولید و تکثیر جنین های ثانویه

تیمارهای 1mg/l NAA، 2mg/l NAA و 1mg/l NAA+0/5 mg/l Kin (تیمارهای برتر تولید جنین از هیپوکوتیل)، جهت تولید جنین ثانویه استفاده شدند و پس از دوهفته تولید جنین رویشی نمودند. بیشترین تعداد جنین ثانویه در تیمار 1mg/l NAA+0.5 Kin مشاهده شد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (شکل 3 د). بیشترین وزن و بیشترین حجم کالوس نیز در تیمار 1mg/l NAA مشاهده شد. در وزن کالوس، تیمار 1mg/l NAA با تیمار mg/l 0/5 mg/l Kin +1NAA تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل 3) اما در حجم کالوس، تیمار 1mg/l NAA با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل 3). بیشترین تراکم بافت کالوس در تیمار mg/l Kin 1mg/l NAA+0/5 مشاهده شد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (شکل 3) مطالعات میکروسکوپی نشان داد که جنین‌ها از لحاظ تکامل، هر سه مرحله کروی، قلبی و اژدری را کاملاً طبیعی به پایان رساندند (شکل4).

مرحله باززایی جنین های رویشی

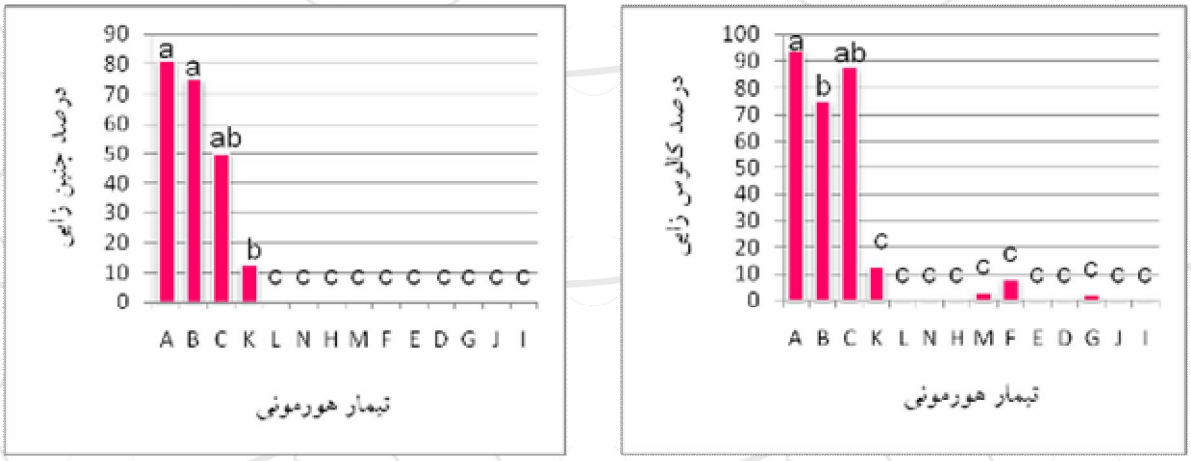
نتایج مربوط به بهینه سازی باززایی و رشد جنین نشان داد که بهترین تیمار از لحاظ رنگ برگ، طبیعی بودن شکل برگ، رنگ ساقه و کیفیت ریشه گیاهچه، تیمار B5 (2ip mg/l 0/2 + IBA mg/l 0/01 +MS1/2) می‌باشد (شکل5). نتایج آزمونKruskal-Wallis و Mann-Whitney جهت تعیین تیمار برتر و مقایسه آن با سایر

تیمارها نشان داد که از 17 تیمار بررسی شده، تیمار مذکور، بهترین محیط جهت بهینه‌سازی رشد جنین و تبدیل آنها با گیاهچه می‌باشد (جداول 5 و 6 و شکل5). ضمناً اثر نوع برگ (برگ مرکب و برگ کوتیلدونی) نیز روی صفات حاصل از تیمارهای هورمونی محیط رشد جنین، اثر معنی‌داری نشان نداد.



شکل 1- مقایسه اثر تیمارهای هورمونی مختلف و نوع ریزنمونه بر میانگین حجم کالوس (الف، د)، میانگین وزن کالوس (ب، و) و میانگین تراکم بافت کالوس (ج، ی).

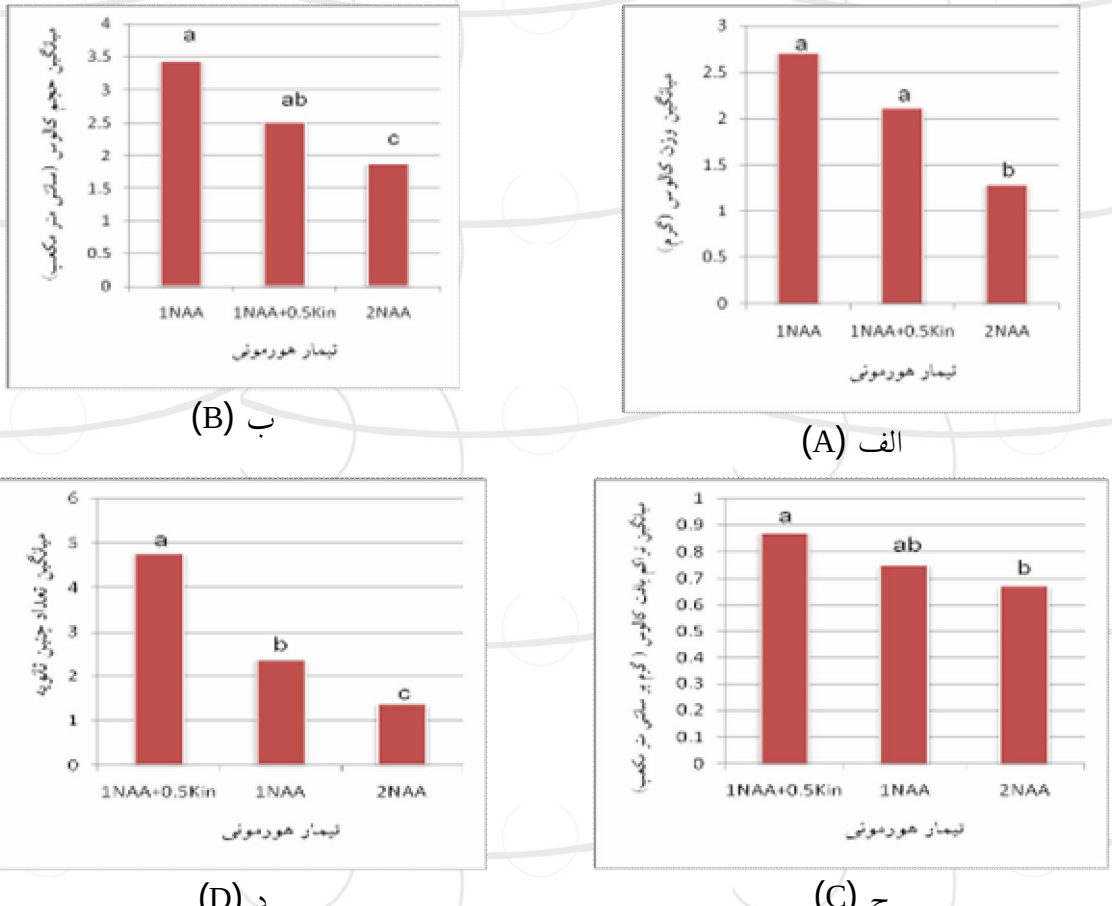
Figure 1- Comparison of different hormone treatments and explant type on volume (A,D), fresh weight (B,E) and tissue density (C,F) of callus.



الف (A) ب (B)

شکل 2- مقایسه درصد کالوس‌زایی (الف) و درصد جنین‌زایی (ب) در تیمارهای هورمونی مختلف.

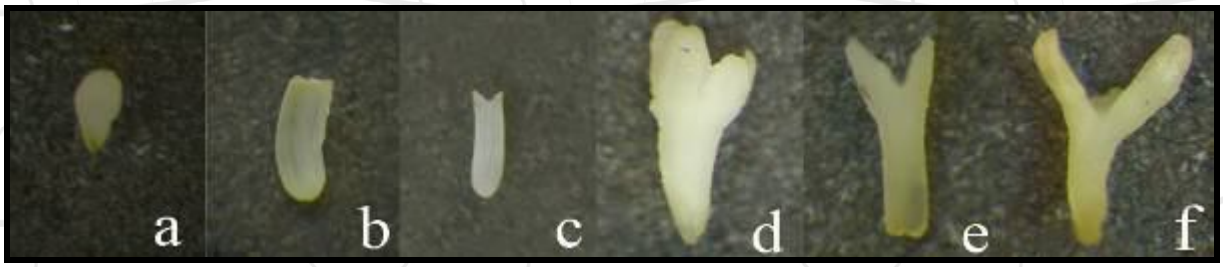
Figure 2 Comparison of callogenesis (A) and embryogenesis (B) percentage under different hormone treatments



الف (A) ب (B) ج (C) د (D)

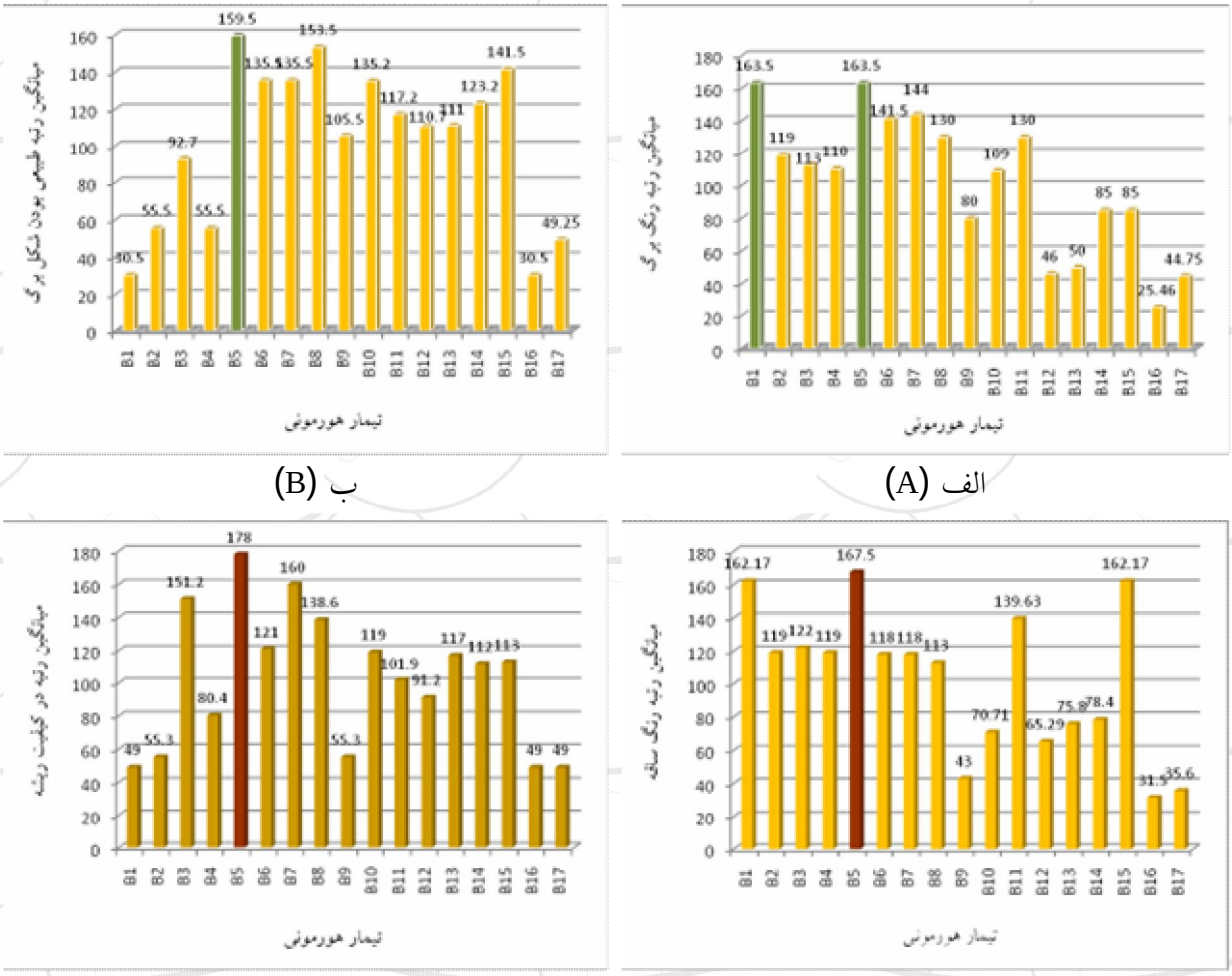
شکل 3- مقایسه میانگین وزن(الف)، حجم(ب)، تراکم بافت کالوس(ج) و تعداد جنین های ثانویه(د) حاصل از کشت جنین‌های هیپوکوتیل.

Figure 3. Comparison of weight (A), volume (B), density (C) and secondary embryos (D) produced from hypocotyl explant



شکل4- مراحل تکامل جنین تولید شده از هیپوکوتیل در زیره سیاه. **a** و**b-** مرحله کروی، **c-** شروع مرحله قلبی، **d-** مرحله قلبی، **e** و **f-** مرحله اژدری.

Figure 4- Evolutionary process of embryo from hypocotyl in black cumin. a,b-globular stage, c-heart inititation, d-heart stage and e,f-torpedo stage



الف (A) ب (B)

ج (C) د (D)

شکل 5- مقایسه میانگین رتبه رنگ برگ**(الف)**، طبیعی بودن گیاهچه‌ها**(ب)**، رنگ ساقه**(ج)** و کیفیت ریشه**(د)** حاصل از گیاهچه‌ها درتیمارهای مختلف در آزمون کروسکال والیس.

Figure 5- Mean comparison of leaf color (A), normality of plantlets (B), stem color (C) and root quality (D) rank of different treatments using Kruskal-Wallis test.

جدول 4- خلاصه تجزیه واریانس صفات درصد کالوس‌زایی و درصد جنین‌زایی در دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی.

Table 4- ANOVA results for callogenesis and embryogenesis percentage in two explants -hypocotyl and cotyledon leaf.

R^2	%CV.	MS	df	منابع تغییرات Source of Variations
0/75	12/62	10607**	1	درصد کالوس زایی Callogenesis percentage
0/77	11/01	79497064**	1	درصد جنین زایی Embryogenesis percentage

ns: عدم اختلاف معنی دار *: اختلاف معنی دار در سطح احتمال 5% و **: اختلاف معنی دار در سطح احتمال 1%

ns,*, **: non-significant, significant and highly significant (P<0.05 and P<0.01), respectively

مرحله سازگاری با شرایط برون شیشه ای

در مرحله سازگاری، گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان، 72% رشد طبیعی نشان دادند که 45% آنها وارد مرحله نمو شده و پس از 35 روز، برگ مرکب فرعی تولید نمودند (شکل 6). گیاهچه‌ها مرحله رویشی را کاملاً طبیعی به پایان رساندند.

الف (A) ب (B) ج (C)

شکل 6- گیاهچه طبیعی حاصل آزمایش بهینه سازی رشد جنین (الف) و مراحل سازگاری و انتقال گیاهچه‌ها به گلدان شامل برداشتن پوشش پس از 10 روز (ب) و مشاهده نمو، تشکیل برگ مرکب جدید پس از 35 روز از آغاز کشت در گلدان (ج).

Figure 6- Normal plantlet produced from optimized embryo culture (A), acclimatization and transfer of plantlets into the pots and discard cover after 10 days (B) and development and adult leaf production, 35 days after transfer into pots (C).

جدول 5- آزمون مان وایتنی جهت مقایسه تیمار برتر (MS 1/2+ 0/01mg/l IBA + 0/2mg/l 2ip یا (B5) با سایر تیمارها.

Table 5- Mann-Whitney test to comparison of the best treatment (B5) with other treatments.

رنگ برگ Leaf color		طبیعی بودن شکل برگ Leaf shape		رنگ ساقه Stem color		کیفیت ریشه Root quality		مقایسه تیمارها
Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	
1 ns	72	0**	0	0/317 ns	66	0**	0	B5,B1
0/002**	30	0**	6	0**	18	0**	0	B5,B2
0/002**	30	0/001**	19/5	0/002**	30	0/006**	36	B5,B3
0/002**	30	0**	6	0/006**	36	0**	0	B5,B4
0/07*	48	0/105 ns	48	0/002**	30	0/002**	30	B5,B6
0/006**	54	0/105 ns	48	0/002**	30	0/032*	48	B5,B7
0**	36	0/66**	66	0/001**	24	0/006**	36	B5,B8
0/015*	6	0**	18	0**	0	0**	0	B5,B9
0/006**	42	0/185 ns	52	0**	12	0**	18	B5,B10
0**	36	0/028*	34/5	0/07*	54	0**	12	B5,B11
0**	0	0/026*	37/5	0**	0	0**	6	B5,B12
0**	0	0/012*	33	0**	0	0/001**	24	B5,B13
0**	18	0/038*	45/5	0**	6	0**	18	B5,B14
0**	18	0/216 ns	54	0/317 ns	66	0**	18	B5,B15
0**	0	0**	0	0**	0	0**	0	B5,B16
0**	0	0**	4/5	0**	0	0**	0	B5,B17

ns : عدم اختلاف معنی دار *: اختلاف معنی دار در سطح احتمال 5% و **: اختلاف معنی دار در سطح احتمال 1%

ns,*, **: non-significant, significant and highly significant (P<0.05 and P<0.01), respectively

جدول 6- آزمون مان وایتنی جهت مقایسه تأثیر برگ مرکب و کوتیلدونی در نتیجه حاصل از بهینه‌سازی رشد جنین.

Table 6- Mann-Whitney test to comparison of leaf types on embryo growth.

	کیفیت ریشه Root quality		رنگ ساقه Stem color		طبیعی بودن شکل برگ Leaf shape		رنگ برگ Leaf color	
	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.
مقایسه برگ مرکب و برگ کوتیلدونی Comparison of leaf type	4912	0/646 ns	5027	0/876 ns	4915/5	0/655 ns	72	0/919 ns

ns : عدم اختلاف معنی دار

ns : Non significant

بحث

در برخی از گونه‌ها مانند هویج و یونجه، تمام اندام‌های گیاهچه قادر به تولید جنین می‌باشند که نشان‌دهنده بیان گسترده توانایی جنین‌زایی در این گیاهان است اما در اغلب گونه‌ها، تولید جنین محدود به بافت‌های مشخصی از گیاه می‌شود (Neumann, 2006). در میان بافت‌های مختلف گیاهی، شیبی از پاسخ به جنین‌زایی وجود دارد، به‌طوری که در بافت‌های با منشاء جنینی این پاسخ بیشتر بوده و به سمت لپه، هیپوکوتیل، برگ و ریشه کاهش می‌یابد (Neumann, 2006). در پژوهش حاضر نیز تولید جنین در ریزنمونه هیپوکوتیل صورت گرفت. القاء جنین سوماتیکی از قطعات هیپوکوتیل در محیط کشت B5 گزارش شده است (Sharifi *et al.*, 2003; Valizadeh *et al.*,2009). اما از تولید جنین از هیپوکوتیل در محیط کشت MS، گزارشی صورت نگرفته است. القاء جنین سوماتیک از مریکارپ زیره سیاه نیز در محیط کشت MS گزارش شده است (Wakhlu *et al.*, 1990) که طی آن جنین‌ها قادر نبودند در حضور 2,4-D، از مرحله کروی وارد مرحله قلبی‌شکل و سپس جنین کامل شوند. این اثر بازدارندگی هورمون 2,4-D در مورد سایر گیاهان خانواده چتریان همچون هویج و کرفس معمولی نیز گزارش شده است (Ammirato *et al.*, 1971). در بین گروه‌های تنظیم‌کننده رشد، اکسین‌ها بیشترین کاربرد را در انتقال سلول‌ها از فرم رویشی به جنینی دارند (Victor *et al.*, 1999). در بیش از 80% از 124 پروتکل اخیر منتشر شده، القاء جنین‌های سوماتیکی در حضور اکسین به‌تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین‌ها گزارش شده است (Gaj, 2004). در بعضی موارد نیز سیتوکینین‌ها به‌عنوان تنها منبع القاء جنین گزارش شده‌اند (Bronner *et al.*, 1994). از مجموع 65 گونه دولپه‌ای مرور شده، جنین‌زایی سوماتیکی در 17 گونه در محیط بدون هورمون، در 29 گونه روی محیط حاوی اکسین و در 25 گونه روی محیط حاوی سیتوکینین گزارش شده است (Raemakers *et al.*, 1995). در میان اکسین‌ها، بیشترین گزارشات تولید جنین سوماتیک، مربوط به هورمون 2,4-D بوده است (49%). هرچند مشاهده شده است که اسیدی کردن محیط در حضور غلظت مناسب از 2,4-D برای جنین‌زایی (10mμ)، سبب ممانعت از جنین‌زایی می‌گردد اما اسیدی کردن محیط در شرایطی که غلظت 2,4-D برای جنین‌زایی مناسب نیست (1mμ)، تحریک جنین‌زایی را سبب می‌شود (Pasternak *et al.*, 2002). پس از 2,4-D، هورمون‌های NAA (27%)، IAA (6%)، IBA (6%)، پیکلورام[1] (5%) و دیکامبا[2] (5%)، در مراتب بعد قرار دارند. در تحقیق حاضر نیز بیشترین میزان جنین‌زایی در محیط کشت MS و در حضور تیمارهای حاوی NAA به تنهایی و یا در ترکیب با کینتین صورت گرفت. در سیتوکینین‌ها،

[1]-Picloram

[2]- Dicamba

3-In vitrification

بیشتر گزارشات تولید جنین، مربوط به هورمون BAP بوده است (57%). پس از آن هورمون‌های کینتین (37%)، زآتین (3%) و TDZ (3%) قرار دارند. سیتوکینین‌ها در واقع تشکیل سلول‌های جنین‌زا را تحریک می‌کنند (Pasternak *et al.*, 2002; Nishiwaki *et al.*, 2000; Kamada *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 2003).

بهینه‌سازی رشد جنین‌های سوماتیک، در گیاهانی که از لحاظ جوانه‌زنی با مشکل مواجه‌اند و یا دوره رشد طولانی دارند، در راستای تولید بذر مصنوعی بسیار حائز اهمیت است. چراکه اولین قدم در تولید بذر مصنوعی، داشتن جنین‌هایی است که از لحاظ رشدی، فرآیند کاملاً طبیعی داشته باشند. در این بررسی، جنین‌های تولید شده در محیط کشت MS حاوی سیتوکینین 2ip و اکسین IBA رشد طبیعی نشان دادند. هر چند غلظت زیاد عناصر در محیط MS سبب ظهور پدیده شیشه‌ای شدن[3] گردید اما این مشکل با کاهش عناصر ماکرو به میزان نصف، برطرف گردید. این پدیده در رشد سایر گیاهان نیز مشاهده شده است (Ghamari Zare, 2007). همچنین حضور اسید آمینه‌های آسپارژین، آرژنین و گلوتامین در رنگ برگ و رنگ ساقه تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد اما در کیفیت ریشه‌زایی و طبیعی بودن شکل برگ تأثیر معنی‌داری نشان داد (جدول 1-3). گیاهچه‌ها در تیمارهای حاوی IBA نسبت به NAA ، رشد طبیعی‌تری داشتند که نشان می‌دهد رشد گیاهچه‌ها در زیره، به اکسین IBA پاسخ بهتری می‌دهد. با توجه به موفقیت تولید جنین های سوماتیکی در این پژوهش، نتایج این تحقیق می تواند نویدبخش امکان تولید بذر مصنوعی در زیره سیاه باشد.

منابع

Agrawal SG, Thappa RK, Dbar KLб Atal CK (1979). Essential oils of the seeds of Bunium bulbocastanum Linn., Carum gracile Lindle and Cuminum cyminum Linn. Indian Perfumer 23: 34-37.

Ammirato Pб Steward F (1971). Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. Botanical Gazette 132: 149-158.

Boskabady MH, Moghaddas A (2004). Antihistaminic effect of Bunium persicum on Guinea Pig tracheal chains. Iranian Biomedical Journal 8: 149-155.

Bronner R, Jeannin G, Hahne G (1994). Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (Helianthus annuus). Canadian journal of botany 72: 239-248.

Dixon RA, Gonzales RA (1994). Plant cell culture: a practical approach, Oxford University Press, USA.

Ebrahimie E, Habashi A, Ghareyazie B, Ghannadha M, Mohammadie M (2003). A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (Cuminum cyminum). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 19-25.

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

Ghamari Zare A (2007). In vitro micropropagation of Denderostellera lessertii Van Tiegh. Pajouhesh And Sazandegi (In Farsi).

Ikeda Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003). Stress induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal 34: 107-114.

Kamada H, Ishikawa K, Saga H, Harada H (1993). Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. Plant Tissue Culture Letters 10: 38-44.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology of plant 15: 473-497.

Neumann K (2006). Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology. Plant biotechnology & its applications in tissue culture 1.

Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y (2000). Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (Daucus carota L.) seedlings in culture. Planta 211: 756-759.

Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. Plant physiology 129: 1807.

Raemakers C, Jacobsen E, Visser R(1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81: 93-107.

Ranjbarian P, Sadeghian S, Shirazi M, SarafNejad A, Fazeli M, Amini G, Majlesi O, Kashani KM, Kooraki M (2004). Evaluation of antibacterial effect of 4 plant extract on heliobacterpilori with Difusion disk and focitometery methods. Scientific journal of Hamedan University of medical sciences 3: 42-47.

Sasani S, Afshar RT, Poustini K, Sharifzadeh F (2006). Evaluation of humidity vernalization, Hormone treatment and storing period on dormancy breakage and germination induction of Bunium persicum. Iranian Journal of Field Crop Science 38: 287-294.

Sharifi M, Pouresmael M (2003). Effects of some chemical substances on dormancy breaking and induction of seed germination in Bunium persicum (Boiss.) Fedtsch. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 2: 33-42.

Valizadeh M, Tabar SKK (2009). Investigation of Plant Growth Regulators Effects on Callus Induction and Shoot Regeneration of Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch. Journal of Agricultural Science and Technology 11: 481-486.

Valizadeh M, Safarnejad A, Nematzadeh G, Kazemitabar S, Hamidi H (2008). Regeneration of Plantlets from Fragmented Embryo Explant of Parsi Zira (*Bunium persicum* Boiss.). Seed and Plant Improvment Journal 24(3):389-397.

Victor J, Murch S, KrishnaRaj S, Saxena P (1999). Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. Plant Growth Regulation 28: 9-15.

Wakhlu A, Nagari S, Barna K (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of Bunium persicum Boiss. Plant cell reports 9: 137-138.

Evaluation of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Black Cumin (*Bunium persicum* Boiss)

Sadatnoori S.A.[1], Mortazavian S.M.M.[1], Ghamari Zare A.[2], Omidi M.[3], Hoori M.[1]

[1]Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran, Iran.

[2]Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran.

[3]Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

Introduction: Black cumin (*Bunium persicum* Boiss.) belongs to *Apiaceae* family. Despite the importance of this medicinal plant in pharmacognesis, due to problems of germination and growth over long periods, yet in the country has not been domesticated and grown in nature wildly. Techniques such as tissue culture can reduce the period of growth in this plant effectively. The aim of the research: optimization of somatic embryogenesis toward production and commercialization of this plant for the pharmaceutical usage and artificial seed production were studied. Hypocotyl and cotyledon leaves of Esfahan ecotype were used as explants. MS medium supplemented with 14 different hormonal treatments for the production of callus and somatic embryogenesis were applied. To optimize the growth culture for conversion of somatic embryos to seedlings MS medium supplemented with 17 different hormonal treatments were used. Experiment was conducted in completely randomized design factorial layout based on multi-observations and 4 replications. Hypocotyl identified as the best explant for somatic embryogenesis. Hormonal treatment of 0.5 mg/l Kin + 1 mg/l NAA and 1 mg/l NAA revealed the highest efficiency for callus formation while medium containing 0.2 mg/l 2ip + 0.01 mg/l IBA + 1/2 MS showed the highest regeneration amount of somatic embryos. Produced embryos in MS medium containing auxin IBA and Cytokinin 2ip showed the normal growth. Due to problems in the caraway seed germination, production of artificial seeds is very important. Considering the successful production of somatic embryos in this research, synthetic seed production of black cumin can be followed in future.

Keywords: *Caraway, Hypocotyl, Cotyledon leaf, Callus, Somatic embryogenesis.*