Crop Biotech.
Vol. 2, No. 3, Autumn and Winter 2012-2013

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره سوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۱ (۵۷-۴۹)

استخراج و شناسایی اسکوپولتین از کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه (*Bunium persicum*)

سارا خسروی‌نیا[۱]، سیدمهدی زیارت‌نیا[۲]، عبدالرضا باقری[۳] و سیدحسن مرعشی[۴]

۱، ۳، ۴، کارشناس ارشد، استاد و دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲، استادیار گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

(تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۵- تاریخ تصویب: ۹۱/۲/۲۰)

Isolation and Identification of Scopoletin from Cell Suspension Cultures of Black Zira (*Bunium persicum*)

S. KHOSRAVINIA[1], S. M. ZIARATNIA[2], A. R. BAGHERI[3] AND S. H. MARASHI[4]

1, 3, 4, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. 2, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

(Received: April. 24, 2012 - Accepted: May. 9, 2012)

Abstract

Nowadays plant cell suspension cultures have become an attractive source for secondary metabolites production. The fluorescent compounds are highly valuable in a variety of fields including environmental chemistry and medical and food industries. In this study the cell suspension cultures of black zira, an important medicinal plant in Iran, was established in MS liquid medium supplemented with 2 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA. For isolation and identification of fluorescent compound in cell suspension culture samples, 100 gr dried cell with 100 mL dichloromethane was extracted followed by subjecting on a column chromatography and then preparative TLC. The mobile phase was selected as dichloromethane-methanol; 9:1. The TLC comparison of extracts from different parts of the plant (seed, stem, leaf and root) as well as cell suspension culture samples showed that under UV light 365, a blue fluorescent component is present in cell samples whereas nothing was found in the extracts of arial parts of the plant. It is also found that a little fluorescent component has been released into the medium. Results of this study demonstrated the fluorescent component content in callus is less than cell samples under the same conditions. This compound was identified by Nuclear Magnetic Resonance analysis as one of the coumarin derivatives (6-methoxy 7-hydroxy coumarin). Substitutions a methyl group or hydroxyl on the coumarin structure shifted the fluorescent band.

Keywords: *Bunium persicum*, Cell Suspension Culture, Fluorescent Compound, Secondary Metabolite

چکیده

امروزه استفاده از قابلیت‌های کشت سلولی برای تولید مواد مؤثره دارویی بسیار مورد توجه است. ترکیبات فلورسانس در بسیاری از زمینه‌ها مانند محیط زیست، صنایع غذایی و پزشکی ارزشمند می‌باشند. در این پژوهش کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه، به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم در ایران، در محیط کشت MS مایع حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA استقرار یافت. برای جداسازی و خالص‌سازی ترکیب فلورسانس موجود در سلول‌های کشت سوسپانسیون، مقدار ۱۰۰ گرم سلول خشک را با ۱۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان عصاره‌گیری کرده و سپس از ستون کروماتوگرافی و روش Preparative TLC برای خالص‌سازی آن استفاده شد. از مخلوط دو حلال دی‌کلرومتان و متانول با نسبت ۱:۹ به‌عنوان فاز متحرک استفاده گردید. نتایج TLC عصاره‌های تهیه‌شده از اندام‌های مختلف گیاه (بذر، ساقه، برگ، ریشه و بذر) و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر نشان داد که یک ترکیب فلورسانس آبی‌رنگ در اندام ریشه و سلول‌های کشت سوسپانسیون وجود دارد که در اندام‌های هوایی گیاه دیده نمی‌شود. همچنین در شرایط کاملا یکسان مقدار این ترکیب در بافت کالوس کمتر از سلول می‌باشد و مقداری از این ترکیب فلورسانس به درون محیط کشت مایع آزاد می‌شود. به‌منظور شناسایی این ترکیب از روش رزونانس مغناطیسی هسته استفاده گردید و نتایج آن نشان داد که این ترکیب یکی از مشتقات کومارین (۶- متوکسی ۷- هیدروکسی کومارین) است. افزوده‌شدن گروه‌های متیل و هیدروکسی به ساختار کومارین سبب ایجاد ویژگی فلورسانسی در آن می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Bunium persicum*، ترکیب فلورسانس، کشت سوسپانسیون سلولی، متابولیت‌های ثانویه

نویسنده مسئول: سیدمهدی زیارت‌نیا
E-mail: m.ziaratnia@rifst.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

زیره سیاه [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.] از گیاهان دارویی ارزشمند و بومی ایران است که در نواحی شمالی خراسان، کرمان و شرق زاگرس رشد می‌کند و از بذر آن در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود (Ghahraman, 1993). اسانس حاصل از بذر آن حاوی ترکیبات ارزشمندی نظیر کومین‌آلدئید، گاما- ترپینن، پارا-سیمن، بتا-پینن، آلفا-پینن، میرسن و لیمونن است (Moghtader *et al*. 2009)، که از گذشته‌های دور در میان ایرانیان برای درمان بسیاری از بیماری‌های گوارشی و همچنین به‌عنوان یک داروی ضدحشره و ضدآسم استفاده شده است. حتی امروزه از آن علاوه بر صنعت غذا و دارو در برخی صنایع آرایشی نیز استفاده می‌شود (Salehi *et al*. 2008).

گیاهان دارویی یکی از منابع عمده تولید متابولیت‌های ثانویه هستند، لیکن برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از رویشگاه‌های طبیعی جهت استحصال ترکیبات مؤثره دارویی سبب شده برخی از این گیاهان در معرض انقراض قرار گیرند و به همین دلیل محصولات دارویی به‌دست‌آمده از گیاهان اغلب خیلی گران هستند (Hasanloo *et al*. 2008).

یکی از موارد استفاده از فن‌آوری کشت‌بافت گیاهی در کشاورزی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی است. غالباً مطالعات بسیاری بر روی تولید آن‌ها از طریق کشت سلول‌های گیاهی انجام شده است. در سال‌های اخیر تولید این فرآورده‌ها از طریق کشت سلول‌های گیاهی به صورت یک رویکرد مهم در تحقیقات کشت سلولی درآمده است، به‌طوری که در بعضی موارد میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در سلول‌های کشت‌شده از بافت، خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است و یا گاهی سلول‌های کشت‌شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود (Mewis *et al*. 2011; Ziaratnia *et al*. 2009; Xiao *et al*. 2005).

یکی از این مواد که کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، پزشکی و محیط زیست دارد، ترکیبات فلورسانس می‌باشد. از این ترکیبات به‌منظور شناسایی یون‌های فلزات سنگین در خاک، شناسایی آمین‌ها، آمینواسیدها، آنیون‌ها و آنزیم‌ها در ترکیبات آلی، شناسایی تومورهای سرطانی در بدن، شناسایی جواهرات، سنگ‌های قیمتی و برخی موادمعدنی استفاده می‌شود. همچنین در انگشت‌نگاری و تکنیک FISH نیز کاربرد دارند (Li *et al*. 2012).

به‌طورکلی در ارتباط با کشت درون‌شیشه‌ای زیره سیاه اطلاعات محدودی وجود دارد. Sharifi (1995) از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای *B. persicum* استفاده کرد و مشاهده نمود که در محیط کشت B_5 حاوی NAA و Kin در مقایسه با 2,4-D و Kin کالوس بیشتری تشکیل می‌شود. همچنین Ziaratnia (2000) برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا از بافت مریستمی نوک ریشه‌چه و از غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D و NAA به‌طور جداگانه و یا به‌صورت ترکیب با Kin استفاده کرد. نتایج نشان داد که بهترین ترکیب هورمونی مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D یا NAA بود. در تحقیقی که توسط Valizadeh *et al*. (2006) بر روی ریزنمونه‌های محور جنینی زیره سیاه انجام شد، اولین کالوس‌ها یک هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت B_5 مشاهده شدند. بیشترین میزان کالوس‌دهی مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin یا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. Wakhlu *et al*. (1990) از کشت مریکارپ‌های زیره سیاه در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin، کالوس به‌دست آوردند. در بررسی Valizadeh

Archive of SID

www.SID.ir

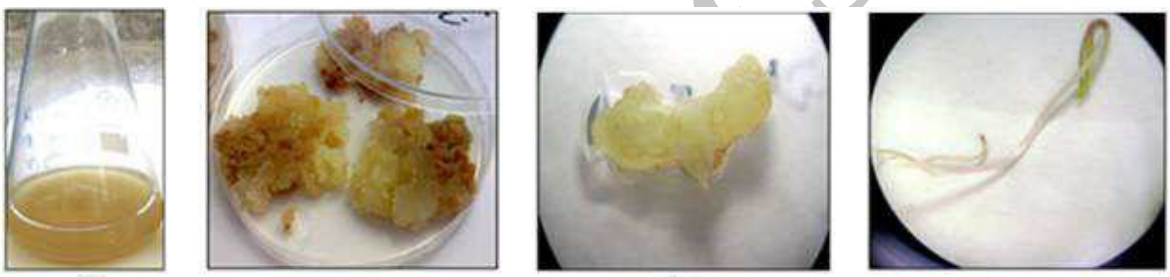
et al. (2007) از ریزنمونه هیپوکوتیل به‌منظور القای کالوس استفاده شد. بیشترین فراوانی کالوس‌زایی در محیط کشت MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D گزارش شده است. همچنین Otroshy *et al.* (2011) موفق به افزایش تولید کارون با اعمال محرک امواج فراصوت به‌مدت ۳۵ ثانیه به کشت کالوس *B. persicum* شدند.

بنابراین با توجه به اهمیت دارویی زیره سیاه و وجود ترکیبات ارزشمند در آن و عدم‌توجه به سیستم کشت سلولی این گیاه برای بررسی خصوصیات متابولیت‌های ثانویه آن، این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی ترکیب فلورسانس موجود در سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه به‌عنوان یکی از متابولیت‌های ثانویه آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

القای کالوس و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

بذر استفاده‌شده در این پژوهش توده زراعی شده‌ای است که از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. مراحل طی‌شده از جوانه‌زنی بذر تا استقرار کشت سوسپانسیون سلولی در شکل۱ نشان داده شده است.



(الف) (ب) (ج) (د)

شکل ۱- بذر جوانه‌زده زیره سیاه در محیط کشت ساده پس از گذشت ۲ ماه (الف)، شروع تشکیل کالوس از بذر جوانه‌زده در محیط کشت MS جامد حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAپس از گذشت ۱۰ روز (ب)، تشکیل کالوس کامل پس از ۳ ماه (ج) و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت MS مایع (د).

پس از ضدعفونی بذر و کشت آن در محیط کشت ساده جوانه‌زنی دارای ۰/۵ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار، در دمای ۱ ± ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۸ هفته بذرهای جوانه‌زده به‌عنوان مواد اولیه به‌منظور القای کالوس مورد استفاده قرار گرفتند. برای القای کالوس، قطعات بذرهای جوانه‌زده در محیط کشت MS جامد حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۷ درصد آگار و ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA کشت شده و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند.

برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی در حدود ۳۰۰ میلی‌گرم از کالوس‌های شفاف و با رشد مناسب حاصل از محیط کشت MS جامد، به شیشه‌های کشت دارای ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA منتقل شده و بر روی شیکر با سرعت rpm ۱۲۰ نگهداری شدند. نمونه‌ها در شرایط تاریکی دائم و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۴ هفته، سلول‌ها از صافی استریل (شماره ۳۰) عبور داده شدند و به داخل محیط کشت‌های جدید واکشت گردیدند. pH تمام محیط کشت‌ها روی ۵/۸ تنظیم و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه ترکیبات سلول‌های کشت سوسپانسیون و نمونه‌های گیاهی با استفاده از TLC

برای بررسی ترکیبات موجود در سلول‌ها و مقایسه آن‌ها با نمونه شاهد (اندام‌های مختلف گیاه زیره سیاه) از صفحات TLC استفاده گردید.

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای انجام TLC، مقدار ۲۵ گرم سلول، ۲/۵ گرم بذر و ۱۰ گرم از قطعات ریشه، ساقه و برگ به ۵ قسمت تقریباً مساوی و مجزا تقسیم گردید. سپس در هاون چینی به همراه ۳۰ میلی‌لیتر متانول، اتانول، دی‌کلرومتان، استون و اتیل‌استات کاملاً خرد شدند. عصاره‌های حاصل جداگانه از کاغذ صافی عبور و از آن‌ها نمونه‌هایی بر روی ورقه‌های TLC قرار گرفت. به‌منظور جداسازی مواد از دو حلال دی‌کلرومتان و متانول با نسبت ۹ :۱ به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد.

کروماتوگرافی بر روی ورقه‌هایی از جنس سیلیکاژل 60F254 (مرک آلمان به شماره ۱/۰۵۵۵۴/۰۰۰۱) به ابعاد ۲/۵×۵ سانتی‌متر مربع که بر روی صفحات آلومینیومی قرار داشتند، انجام شد. مشاهده باندهای مختلف در طول موج‌های ۳۶۵ و ۴۶۶ نانومتر انجام گردید و از محلول وانیلین + اسید سولفوریک + اتانول برای رنگ آمیزی باندها استفاده شد.

جداسازی و خالص‌سازی ترکیب فلورسانس.

پس از بررسی صفحاتTLC نمونه‌های مختلف، ترکیب فلورسانس آبی رنگی در برخی از عصاره‌های سلولی و ریشه مشاهده گردید که در اندام‌های هوایی گیاه دیده نشد. به‌منظور شناسایی این ترکیب از رزونانس مغناطیسی هسته موجود در دپارتمان علوم مواد و شیمی انسیتو تکنولوژی توکیو استفاده شد. در ابتدا این ترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی از سایر مواد موجود در عصاره سلولی تا حدودی جداسازی شد، که برای این منظور ۱۰۰ گرم سلول در ۱۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به کمک التراسوند با بسامد ۲۸ تا ۳۴ کیلو هرتز خرد شده و عصاره حاصل با روتاری کاملاً خشک گردید و سپس در ستون کروماتوگرافی حاوی سیلیکا ژل قرار گرفت. حلال‌های مورد استفاده برای ستون شامل نسبت‌های مختلفی از دو حلال هگزان و اتیل استات بود (۱۰۰ میلی‌لیتر هگزان، ۸۰ میلی‌لیتر هگزان و ۲۰ میلی‌لیتر اتیل استات، ۶۰ میلی‌لیتر هگزان و ۴۰ میلی‌لیتر اتیل استات، ۴۰ میلی‌لیتر هگزان و ۶۰ میلی‌لیتر اتیل استات، ۲۰ میلی‌لیتر هگزان و ۸۰ میلی‌لیتر اتیل استات) که به‌ترتیب به آن افزوده شدند. پس از جداسازی و خروج ترکیب فلورسانس از ستون، از روش Preparative TLC به‌منظور خلوص بیشتر آن استفاده گردید. ترکیب بر روی یک صفحه TLC کامل قرار گرفت و برای جداسازی ترکیبات مختلف از دو حلال دی‌کلرومتان و متانول با نسبت ۹ :۱ استفاده شد. پس از جداسازی باند مربوط به ترکیب فلورسانس آبی، آن را تراشیده و درون ظرف جداگانه‌ای قرار گرفت و به‌منظور جداسازی آن از سیلیکا ژل، چندین مرتبه با دی‌کلرومتان شستشو و سانتریفوژ گردید.

نتایج و بحث

بررسی صفحات TLC

نتایج TLC نمونه‌ها (ریشه، ساقه، برگ، بذر و سلول‌های کشت سوسپانسیون) در حلال‌های مختلف (متانول، اتانول، دی‌کلرومتان، استون و اتیل‌استات) نشان داد که در عصاره دی‌کلرومتان تهیه شده از اندام ریشه و سلول‌های کشت سوسپانسیون ترکیب فلورسانس آبی‌رنگی وجود دارد که در اندام‌های هوایی گیاه مشاهده نشد (شکل ۲). استفاده از سیستم کشت سلولی به‌خاطر اعمال تنش به سلول‌ها گاهی منجر به افزایش یا تولید ترکیبات جدیدی نسبت به اندام‌های هوایی گیاه مادری می‌شود (Hasanloo *et*

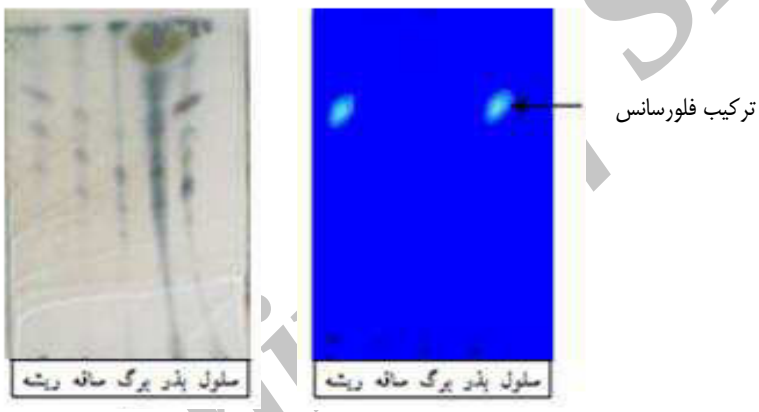
Archive of SID

www.SID.ir

al. 2008) به‌عنوان مثال Yazaki and Okuda (1990) توانستند تانن خاصی را از کشت سوسپانسیون سلولی *Cornus officinalis* استخراج کنند که مقدار آن ۳۶ برابر بیشتر از میوه درخت بود.

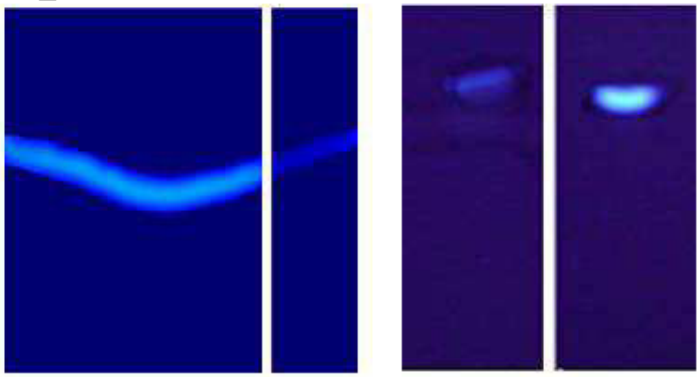
با توجه به وجود این ترکیب فلورسانس آبی‌رنگ در عصاره سلول‌های رشدیافته در تاریکی و ریشه، احتمالاً ایجاد شرایط تاریکی می‌تواند بر تولید آن مؤثر باشد (Bourgaud *et al.* 2006). در مطالعه‌ای با استقرار کشت سلولی *Helichrysum aureonitens* در شرایط تاریکی، ترکیب جدیدی از گروه کلروفنول‌ها به نام 4-chloro-2-(hepta-1,3,5-triyn-1-yl)–phenol تولید شد که تولید این ماده در اندام ریشه نیز گزارش شده است (Ziaratnia *et al.* 2009).

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، در عصاره دی‌کلرومتان تهیه‌شده از محیط کشت مقدار کمی ترکیب فلورسانس آبی‌رنگ دیده می‌شود که نشان‌دهنده آزادسازی این ماده از سلول به محیط کشت است.



(ب) (الف)

شکل ۲- مقایسه ترکیبات در عصاره دی‌کلرومتان نمونه‌های ریشه، ساقه، برگ، بذر و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه قبل از رنگ‌آمیزی و زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر (الف) و بعد از رنگ‌آمیزی با محلول وانیلین (ب).



سلول محیط کشت کالوس سلول

شکل ۳- آزادسازی ترکیب فلورسانس به محیط کشت (الف)
افزایش تولید این ترکیب با استقرار کشت سوسپانسیون سلولی (ب)

Archive of SID

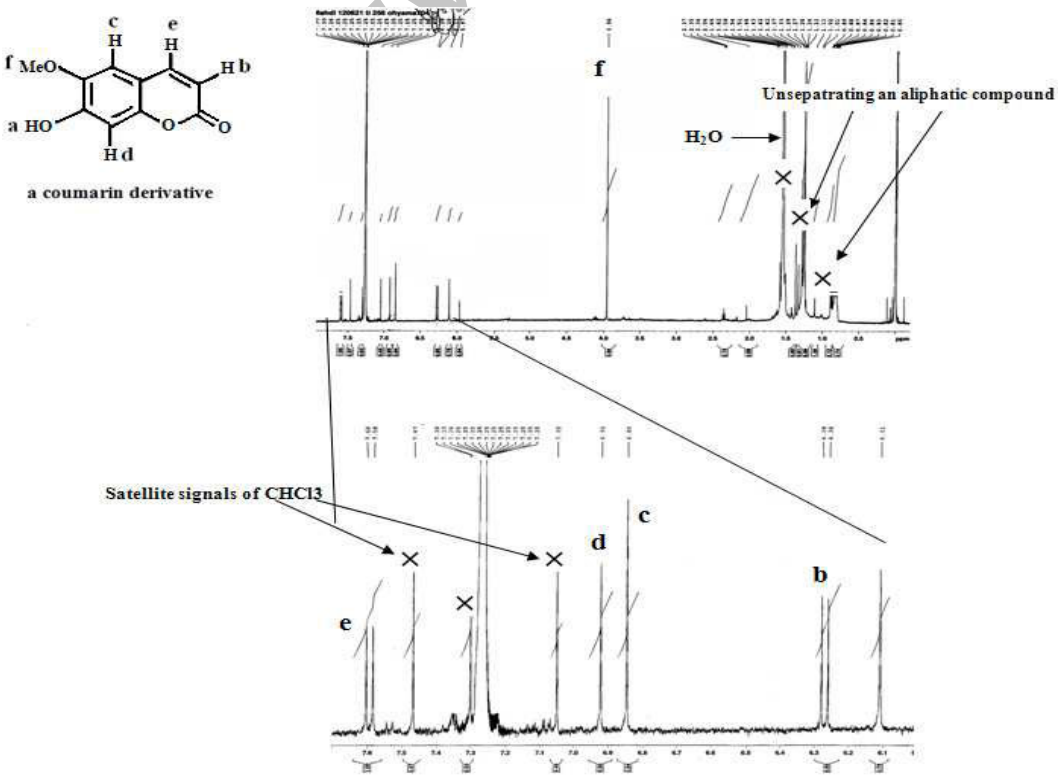
www.SID.ir

وقتی که متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، آن‌ها یا به محیط اطراف ترشح می‌شوند یا در داخل سلول ذخیره می‌شوند. در موارد محدودی در برخی از گونه‌های گیاهی، مکانیسم ترشح از سلول‌ها به‌صورت طبیعی انجام می‌گیرد، مانند آزادسازی paniculide B، protopine و کپسای‌سین به‌ترتیب از کشت‌های سوسپانسیون سلولی *Andrographis paniculata*، *Macleaya microcarpa* و *Capsicum frutescens* (Shilpa *et al*. 2010). آزادسازی طبیعی متابولیت‌های ثانویه از سلول‌ها سبب افزایش بازده تولید، عدم‌تخریب دیواره سلولی و در نتیجه بقای بیشتر سلول‌ها می‌شود و همچنین به‌خاطر استفاده مکرر از سلول‌ها و عدم‌استفاده از مواد و ترکیبات خاص به‌منظور آزادسازی این متابولیت‌ها، منجر به کاهش هزینه‌های تولید می‌گردد (Zhang *et al*. 2002).

همچنین با استقرار کشت سوسپانسیون سلولی مقدار ترکیب فلورسانس نسبت به بافت کالوس محیط کشت جامد افزایش یافته است. در گزارش Shuangxiu *et al*. (2003) نیز بازده تولید salidroside در کشت سوسپانسیون سلولی *Rhodiola sachalinensis* بیشتر از بافت کالوس آن بود.

شناسایی ترکیب فلورسانس با روش رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)

برای شناسایی این ماده از 1H-NMR استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، ۶ ناحیه a، b، c، d، e و f به‌ترتیب در ppm ۶/۱۱، ۶/۲۸، ۶/۸۵، ۶/۹۲، ۷/۶۰ و ۳/۹۶ مشخص‌شده‌است.



Archive of SID

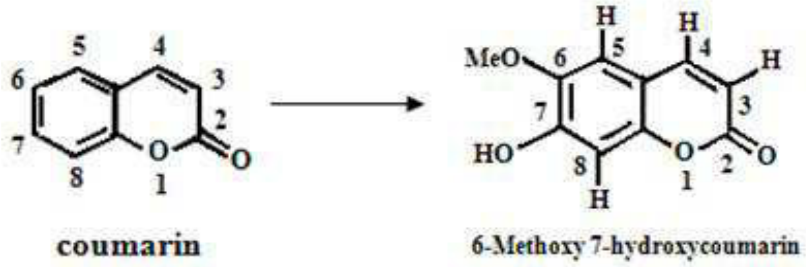
www.SID.ir

شکل ۴- 1H-NMR ترکیب فلورسانس استخراج‌شده از سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه

NMR هنگامی ایجاد می‌شود که یک هسته اسپین‌دار با جذب تابش الکترومغناطیسی به‌مقدار کافی، در حضور یک میدان آهن‌ربایی از یک جهت‌گیری با انرژی پایین‌تر به یک جهت‌گیری با انرژی بالاتر برانگیخته شود. طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته شامل اندازه‌گیری میزان انرژی لازم برای تغییر هسته‌های اسپین‌دار از یک جهت‌گیری پایدار به جهت‌گیری ناپایدارتر در یک میدان مغناطیسی است. از آن‌جا که هسته‌های اسپین‌دار در میدان مغناطیسی در فرکانس‌های مختلف تغییر جهت می‌دهند، فرکانس متفاوتی از تابش جذبی برای عوض‌کردن جهت‌گیری هسته‌های اسپین‌دار نیاز می‌باشد. فرکانسی که در آن جذب صورت می‌گیرد برای تجزیه و طیف‌سنجی به‌کار برده می‌شود (Balaban, 1984).

با افزایش قدرت میدان مغناطیسی، از سمت راست به چپ، پروتونی که محیط شیمیایی آن فرق می‌کند به رزونانس در می‌آید و آن پروتون به‌صورت یک قله بر روی کاغذ ثبت می‌گردد. قله‌ای که در δ=۰ ظاهر می‌گردد مربوط به ترکیب شاهد داخلی (TMS) است. پروتون‌هایی که شدیداً پوشیده شده‌اند (از طرف الکترون‌های اطرافشان شدیدا محافظت شده‌اند) با سرعت کمتری نسبت به پروتون‌های ناپوشیده می‌چرخند، بنابراین این پروتون‌ها در طرف راست کاغذ و پروتون‌های ناپوشیده در سمت چپ کاغذ ظاهر می‌شوند (Pavia *et al*. 2008).

نتایج 1H-NMR نشان داد که این ترکیب یکی از مشتقات کومارین به‌نام ۶- متوکسی ۷- هیدروکسی کومارین (اسکوپولتین) است که فرمول مولکولی آن $C_9H_5O_4Me$ می‌باشد (شکل ۵). در اواخر دهه ۱۹۵۰ مشخص شد که قرارگیری گروه‌هایی بر روی ساختار کومارین منجر به ایجاد باندهای فلورسانسی می‌شود. برای مثال، افزوده‌شدن گروه متیل به کربن شماره ۴ ترکیب ۷- هیدروکسی یا ۷- متوکسی کومارین، منجر به ایجاد طیف‌های فلورسانس می‌شود. افزودن گروه‌های دافعه الکترونی به کربن شماره ۴، ۶ یا ۷ یا افزوده‌شدن گروه‌های جاذبه الکترونی به کربن شماره ۳ سبب تغییر باندهای فلورسانسی به طول موج‌های بلندتر می‌شود (Li *et al*. 2012).



شکل ۵- ساختار کومارین و ترکیب فلورسانس استخراج شده از سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه

سپاسگزاری

از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی که حمایت مالی این پژوهش را برعهده گرفتند و امکانات لازم در جهت پیشبرد این تحقیق را فراهم نمودند، تشکر می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

Atrashi M, Tavakoli dinani E, Darzi M, Hashemi G, Roozbeh S, Masoumi A (2011) Effect of ultrasound on carvone in callus from tissue culture of black zira (*Bunium persicum*). Herbal Drugs, 2, 129-135.

Balaban RS (1984) The application of Nuelear Magnetic Resonance to the Study of cellular physiology. American Physiological Society, 15, 10-19.

Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, Matern U (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem. Rev., 5, 293-308.

Ghahraman A (1993) Medicinal Plants Systematic. Tehran.

Hasanloo T, Rezazadeh S, Rahnama H (2008) Hairy root source for the production of valuable pharmaceutical compounds. Medicinal Plants, 29, 1-17.

Li H, Cai L, Chen Z (2012) Coumarin-derived fluorescent chemosensors. Advances in Chemical Sensors, 6, 121-150.

Mewis I, Smetanska IM, Muller CT, Ulrichs C (2011) Specific poly-phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl Biochem Biotechnol, 2, 148-161.

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

Pavia D, Lampman G, Kriz G (2008) Introduction to Spectroscopy. Blackwell, London.

Salehi P, Mohammadi F, Asghari B (2008) Seed essential oil analysis of *Bunium persicum* by hydro distillation-headspace solvent micro extraction. Chemistry of Natural Compounds, 44, 111-113.

Sharifi M (1995) Comparitive investigation of essences of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* seed and explants fragments. Dissertation, University of Tehran.

Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS (2010) An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. Plant Sciences, 5, 222-247.

Shuangxiu W, Yuangang Z, Madeline W (2003) High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis.* Biotechnology, 106, 33-43.

Valizadeh M, Safarnejad A, Nematzadeh GA, Kazemitabar SK (2006) Regeneration of plantlets from embryo explants of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Crop Science. 1: 93-96.

Valizadeh M, Tabar SKK, Nematzadeh GA (2007) Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Research Medicinal Plant, 1, 48-53.

Wakhlu AK, Nagari S, Barna KS (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Bunium persicum* Bioss. Plant Cell Rep. 9: 137-139.

Xiao CM, Li JW, De AG (2005) A New Sesquiterpene from Transformation of Curdione by Cell Suspension Culture of *Platycodon Grandiflorum.* Chinese Chemical Letters, 16, 1487-1488.

Yazaki K, OKuda T (1990) Gallotin production in cell cultures of *Cornus officinalis* Sieb. Plant Cell Rep., 8, 346-349.

Zhang W, Curtin C, Franco C (2002) Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology,

Archive of SID

www.SID.ir

30, 688-696.
Ziaratnia SM (2000) Somatic embryogenesis in black zira (*Bunium persicum*). Iranian Research Organization for Science and Technology- Khorasan Branch.
Ziaratnia SM, Ohyama K, Fattah Hussein AA, Muranaka T, Lall N, Kunert KJ, Meyer JJM (2009) Isolation and Identification of a Novel Chlorophenol from a Cell Suspension Culture of *Helichrysum aureonitens*. Chem. Pharm. Bull., 11, 1282-1283.

Archive of SID

www.SID.ir