

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

سیداحمد سادات نوری^{۱*}، سیدمحمد مهدی مرتضویان^۱، عباس قمری زارع^۲، منصور امیدی^۳، مریم حوری^۴

^۱ بترتیب استاد و استادیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.

^۲ استادیار گروه تحقیقات و زیست فناوری، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

^۳ استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کرج، دانشگاه تهران.

^۴ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۱۷

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 به صورت وحشی می‌روید. تکنیک‌هایی نظیر کشت بافت، می‌تواند جهت کاهش طول دوره رویش در این گیاه بسیار مؤثر باشد. در این تحقیق بهینه‌سازی رشد جنین‌های 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 ۱۴ تیمار هورمونی مختلف جهت بررسی میزان تولید کالوس و جنین‌های سوماتیکی استفاده گردید. آزمایش بصورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای و در ۴ تکرار اجرا گردید. بهترین ریزنمونه جهت تولید جنین سوماتیکی، هیپوکوتیل و بهترین تیمار هورمونی جهت کالوس زایی، ترکیب هورمونی $0.5 \text{ mg/l Kin} + 0.1 \text{ mg/l IBA} + 0.2 \text{ mg/l 2ip}$ و جهت باززایی جنین رویشی $1 \text{ mg/l NAA} + 1 \text{ mg/l NAA} + 0.1 \text{ mg/l IBA} + 0.2 \text{ mg/l 2ip}$ و اکسین IBA رشد طبیعی نشان دادند. جنین‌های 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 ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به موفقیت تولید جنین‌های سوماتیکی در این پژوهش، تولید بذر مصنوعی در زیره سیاه می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: زیره سیاه، هیپوکوتیل، برگ لپه‌ای، کالوس، جنین زایی سوماتیک.

است. در جنین‌زایی سوماتیک، مجموعه ای از سلول‌های 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 کالوس‌های جنین‌زای زیره پاریسی از غلظت‌های مختلف هورمون‌های 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 جنین‌های سوماتیکی بدست آمده از محیط کشت پایه MS در غلظت‌های مختلف کیتین استفاده شد که بهترین عکس‌العمل مشاهده شده مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر کیتین 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 واكشتی، به باززایی مناسب دست یافتند. بهترین محیط کشت، B5 با ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) یا ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. واخلو (Wakhlu et al., 1990) از کشت مریکارپ‌های

زیره 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 ضد قارچی هستند (Ranjbarian et al., 2004). اگر چه زیره سیاه غالباً در مزرعه‌های کوچک و به صورت محدود در نقاطی از کشورمان کشت و کار می‌گردد ولی تاکنون اهلی‌سازی این گیاه دارویی ارزشمند در ایران صورت نگرفته است و به جز 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 توسعه جنین‌های سوماتیکی یا غیر جنسی از طریق کشت بافت

نابجا رایج تر و با نتایج مطلوب تری همراه بوده است. در اکثر مطالعات، تشکیل مریستم های شاخساره از طریق تشکیل کالوس و بروی 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 می کند. جنین زایی سوماتیکی ثانویه دارای پتانسیل بالایی برای تکثیر انبوه گیاه می باشد. بعلاوه جنین زایی سوماتیکی ثانویه به عنوان راهکاری مناسب و مهم جهت تولید متابولیت های جنینی از قبیل چربی ها و پروتئین های ذخیره ای 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 ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط کشت MS با ۱۴ تیمار هورمونی مختلف جهت شناسایی بهترین ریزنمونه و تیمار، اجرا گردید.

مواد و روش ها

مرحله القا و تولید کالوس

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

زیره پاریسی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۴ میلی گرم در لیتر Kin، کالوس بدست آورد. جنین های سوماتیکی بدست آمده در محیط کشت پایه و یا حاوی ۱ میلی گرم در لیتر کیتین جنین های بالغ و ریشه دار ایجاد نمودند. شریفی (Sharifi et al., 2003) از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ لپه ای در کشت بافت زیره پاریسی استفاده کرد. کالوس حاصل از هیپوکوتیل زیره پاریسی در محیط B5 حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر Kin رشد سریع تری داشت. تشکیل جوانه و ساقه در هیپوکوتیل، در ۱/۰ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر Kin و تشکیل جنین های سوماتیکی در محیط MS حاوی ۰/۵ 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 پاریسی استفاده کردند. بیشترین تعداد کالوس از ترکیب هورمونی ۱/۰ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر Kin یا ۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر Kin بدست آمد. براساس این تحقیق وجود هورمون سیتوکینین برای باززایی زیره پاریسی الزامی نیست. بیشترین فراوانی القای جنین سوماتیکی نیز از ترکیب هورمونی ۲ 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

آبیاری استفاده گردید. پس از جوانه زدن بذور، قطعات برگ کوتیلدوننی و هیپوکوتیل به عنوان ریزنمونه انتخاب و با کلرومرکوریک ۰/۱ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند و سپس با آب اتوکلاو شده، آبکشی گردیدند. ریزنمونه ها به قطعاتی به طول ۰/۵ سانتیمتر تقسیم شده و در ظروف حاوی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با ۱۴ تیمار هورمونی مختلف قرار گرفتند (جدول ۱).

گرفت. به منظور تولید برگ لپه‌ای، بذور به گلدان های حاوی ماسه استریل شده انتقال یافتند و به صورت سطحی کشت شده و به مدت ۸ هفته در سرمای ۴- 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 ۵۰ ppm در سه نوبت و با فاصله زمانی هر ۳ هفته یکبار به همراه آب

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در کشت هیپوکوتیل و برگ کوتیلدوننی 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	تیمار هورمونی (mg/l)	کد تیمار	تیمار هورمونی (mg/l)
Treatment Code	Hormones	Treatment Code	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

درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ هفته در اتاقک رشد نگهداری شدند. یادداشت برداری از تولید کالوس از برگ‌های کوتیلدوننی و هیپوکوتیل نیز پس از ۴ هفته انجام گردید و صفات وزن، حجم، تراکم

آزمایش بصورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای در ۴ تکرار انجام گرفت. کشت ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به ترتیب در دمای ۲۵ و ۱۹

بهترین محیط برای تولید جنین ثانویه معرفی گردید.

مرحله باززایی جنین های رویشی

به منظور یافتن محیط رشد مناسب جهت تبدیل جنین های رویشی به گیاهچه، جنین های تولیدی به محیط کشت MS با ۱۷ تیمار هورمونی مختلف انتقال یافتند (جدول ۲) و در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به ترتیب در دمای ۲۵ و ۱۹ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده ای (در هر محیط کشت، ۴ ریز نمونه) و در ۳ تکرار انجام گرفت. پس از ۸ هفته، صفات رنگ برگ، طبیعی بودن شکل برگ، رنگ ساقه، و کیفیت ریشه یادداشت برداری گردیدند (جدول ۳). با توجه به کیفی بودن صفات، جهت ارزیابی داده ها از روش های آماری غیرپارامتری استفاده گردید و نتایج با آزمون های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney توسط نرم افزار SPSS ارزیابی شدند.

مرحله سازگاری با شرایط برون شیشه ای

گیاهچه های رشد یافته جهت سازگاری با محیط، به گلدان های حاوی خاک ضد عفونی شده با ترکیب (۱ پیت: ۱/۲ ورمی کولایت و ۱ پیت: ۱/۲ پرلیت) انتقال یافتند و با پوشش پلاستیکی احاطه شدند. این پوشش بتدریج و پس از یک هفته از روی گلدان ها برداشته شد.

بافت کالوس، درصد کالوس زایی و درصد جنین زایی یادداشت برداری گردیدند. طول، عرض و ارتفاع کالوس به کمک کاغذ میلی متری اندازه گیری شد و حجم آن محاسبه گردید. وزن کالوس نیز با ترازو اندازه گیری شد. از مراحل تکامل جنین های تولید شده، توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ عکس گرفته شد. با توجه به نرمال نبودن داده ها پس از آزمون، داده های حاصل از صفات وزن، حجم و تراکم بافت کالوس، جهت نرمال شدن به توان ۰/۱ رسانده شدند. این تبدیل به کمک فرمان Box-Cox در نرم افزار Minitab انتخاب شد و مناسب ترین روش جهت نرمال شدن داده ها ارزیابی گردید. جهت آنالیز داده های حاصل از درصد جنین زایی و درصد کالوس زایی نیز ابتدا درصد آنها در هر تکرار محاسبه گردید و پس از تبدیل معکوس، با نرم افزار SAS ارزیابی شدند.

مرحله تولید و تکثیر جنین های ثانویه

به منظور تولید جنین ثانویه، جنین های حاصل از هیپوکوتیل، به سه محیط برتر جنین زایی منتقل گردیدند و به عنوان ریزنمونه کشت شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده ای و در ۴ تکرار انجام شد. نمونه ها در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به ترتیب در دمای ۲۵ و ۱۹ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از ۴ هفته یادداشت برداری گردیدند. تعداد جنین های ثانویه، وزن، حجم و تراکم بافت کالوس اندازه گیری شد و

جدول ۲- 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

جدول ۳- 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 Compound leaf	3	طبیعی Normal	3	طبیعی Normal	5	سبز طبیعی green	7	سبز طبیعی green
2	کوتیلدون Cotyledon	2	پفکی Puffy	2	کمی غیر طبیعی Shortly Normal	4	سبز-بنفش Violet-green	6	سبز با نوک سوخته Green with necrosis tip
		1	عدم ریشه Without root	1	غیر طبیعی و دفرمه abnormal	3	بنفش Violet	5	سبز با نوک آلبینو Green with albino tip
						2	سیاه Black	4	بنفش violet
						1	آلبینو Albino	3	بنفش-آلبینو violet-Albino
								2	آلبینو Albino
								1	نکروزه Necrosis

نتایج

مرحله القا و تولید کالوس

از ۱۴ تیمار به کار رفته جهت کالوس‌زایی، ۱۰ تیمار تولید کالوس نمودند که بیشترین وزن، حجم و تراکم بافت کالوس مربوط به تیمار حاوی ۱ mg/l NAA بود. در ارتباط با وزن کالوس، تفاوت تیمار حاوی ۱ mg/l NAA با تیمارهای ۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kin و ۱ mg/l NAA + ۲ mg/l NAA معنی‌دار بود (شکل ۱ و). از نظر حجم کالوس تفاوت تیمار حاوی ۱ mg/l NAA با تیمار ۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kin معنی‌دار نبود (شکل ۱ د) و در مورد صفت تراکم بافت کالوس، تفاوت تیمار حاوی ۱ mg/l NAA با تیمارهای ۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kin و ۱ mg/l NAA + ۲ mg/l NAA معنی‌دار نبود (شکل ۱ 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 (شکل‌های ۱ الف-ج). درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۸۱٪ و در برگ‌های کوتیلدونی، ۷۵٪ ارزیابی شد که با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری داشتند (جدول ۴). بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۳٪) مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kin می‌باشد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار است (شکل ۲ الف). تولید جنین رویشی تنها در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل مشاهده شد.

مرحله تولید و تکثیر جنین‌های ثانویه

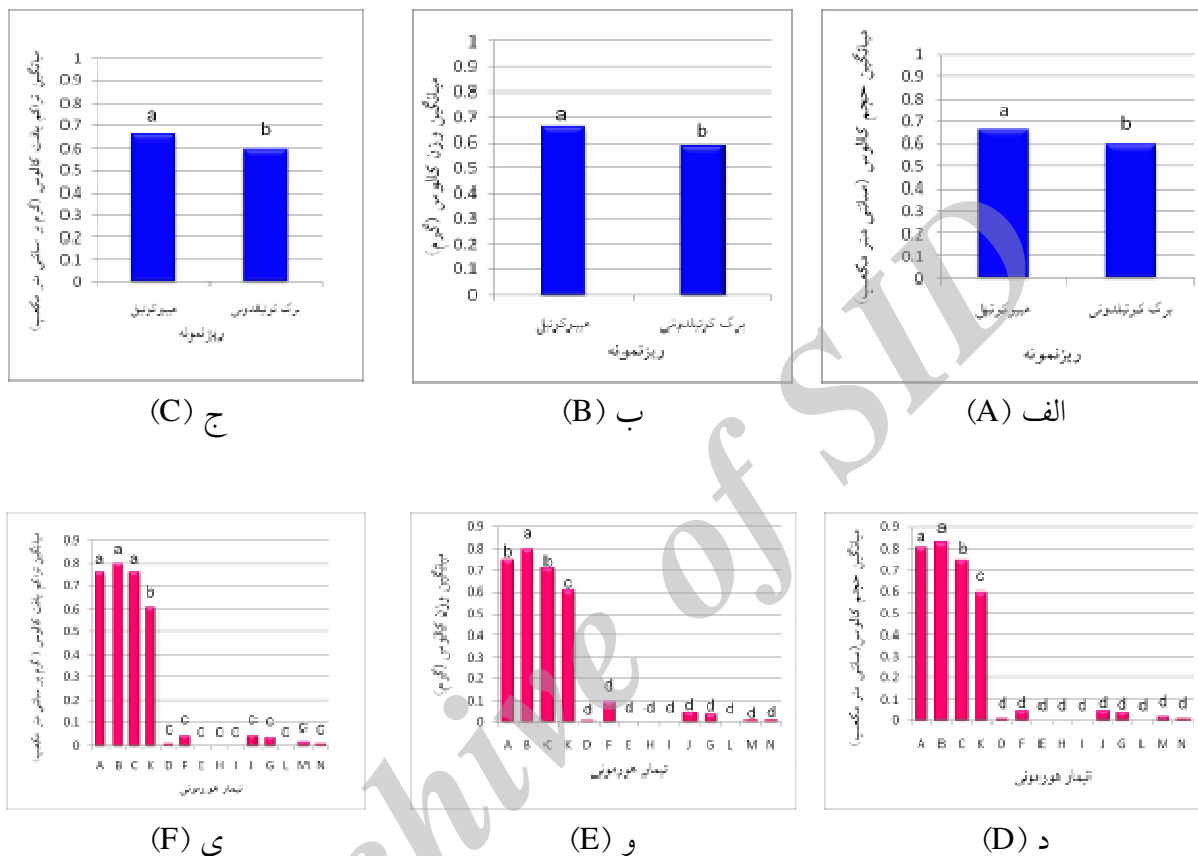
تیمارهای ۱ mg/l NAA، ۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kin (تیمارهای برتر تولید جنین از هیپوکوتیل)، جهت تولید جنین ثانویه استفاده شدند و پس از دو هفته تولید جنین رویشی نمودند. بیشترین تعداد جنین ثانویه در تیمار ۱ mg/l NAA + ۰/۵ mg/l Kin مشاهده شد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (شکل ۳ د). بیشترین وزن و بیشترین حجم کالوس نیز در تیمار ۱ mg/l NAA مشاهده شد. در وزن کالوس، تیمار ۱ mg/l NAA با تیمار ۰/۵ mg/l Kin + ۱ mg/l NAA تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۳) اما در حجم کالوس، تیمار ۱ mg/l NAA با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۳). بیشترین تراکم بافت کالوس در تیمار ۱ mg/l Kin + ۰/۵ mg/l NAA مشاهده شد که تفاوت آن با سایر تیمارها معنی‌دار بود (شکل ۳) مطالعات میکروسکوپی نشان داد که جنین‌ها از لحاظ تکامل، هر سه مرحله کروی، قلبی و اژدری را کاملاً طبیعی به پایان رساندند (شکل ۴).

مرحله باززایی جنین‌های رویشی

نتایج مربوط به بهینه‌سازی 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 (۲ mg/l 2ip) + ۰/۱ mg/l IBA (MS) می‌باشد (شکل ۵). نتایج آزمون Kruskal-Wallis و Mann-Whitney جهت تعیین تیمار برتر و مقایسه آن با سایر

(برگ مرکب و برگ کوتیلدونی) نیز روی صفات حاصل از تیمارهای هورمونی محیط رشد جنین، اثر معنی داری نشان نداد.

تیمارها نشان داد که از ۱۷ تیمار بررسی شده، تیمار مذکور، بهترین محیط جهت بهینه سازی رشد جنین و تبدیل آنها با گیاهچه می باشد (جداول ۵ و ۶ و شکل ۵). ضمناً اثر نوع برگ

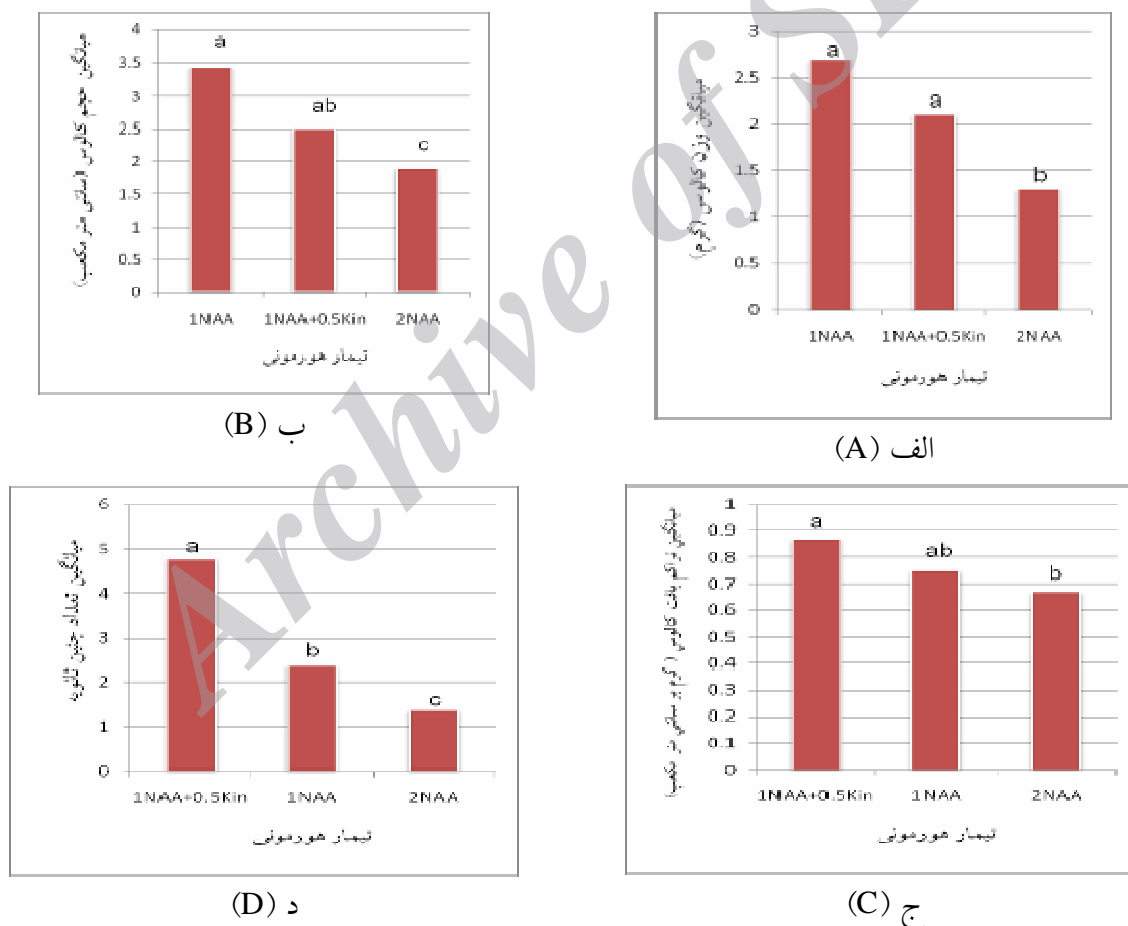


شکل ۱- مقایسه اثر تیمارهای هورمونی مختلف و نوع ریزنمونه بر میانگین حجم کالوس (الف، د)، میانگین وزن کالوس (ب، و) و میانگین تراکم بافت کالوس (ج، ی).

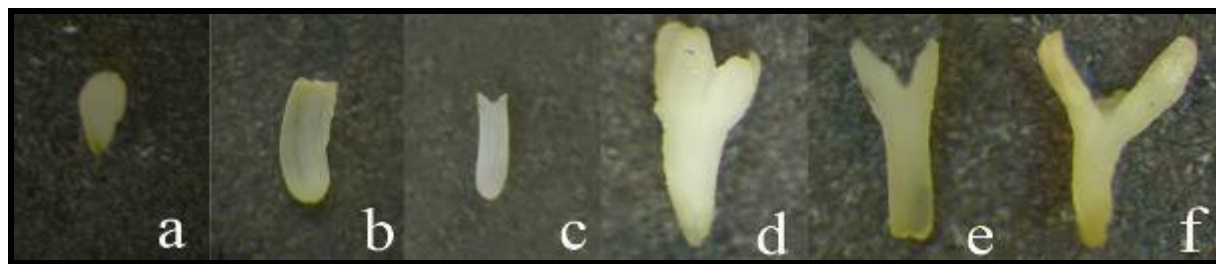
Figure 1- Comparison of different hormone treatments and explant type on volume (A,D), fresh weight (B,E) and tissue density (C,F) of callus.



شکل ۲- مقایسه درصد کالوس زایی (الف) و درصد جنین زایی (ب) در تیمارهای هورمونی مختلف.
Figure 2 Comparison of callogenesis (A) and embryogenesis (B) percentage under different hormone treatments

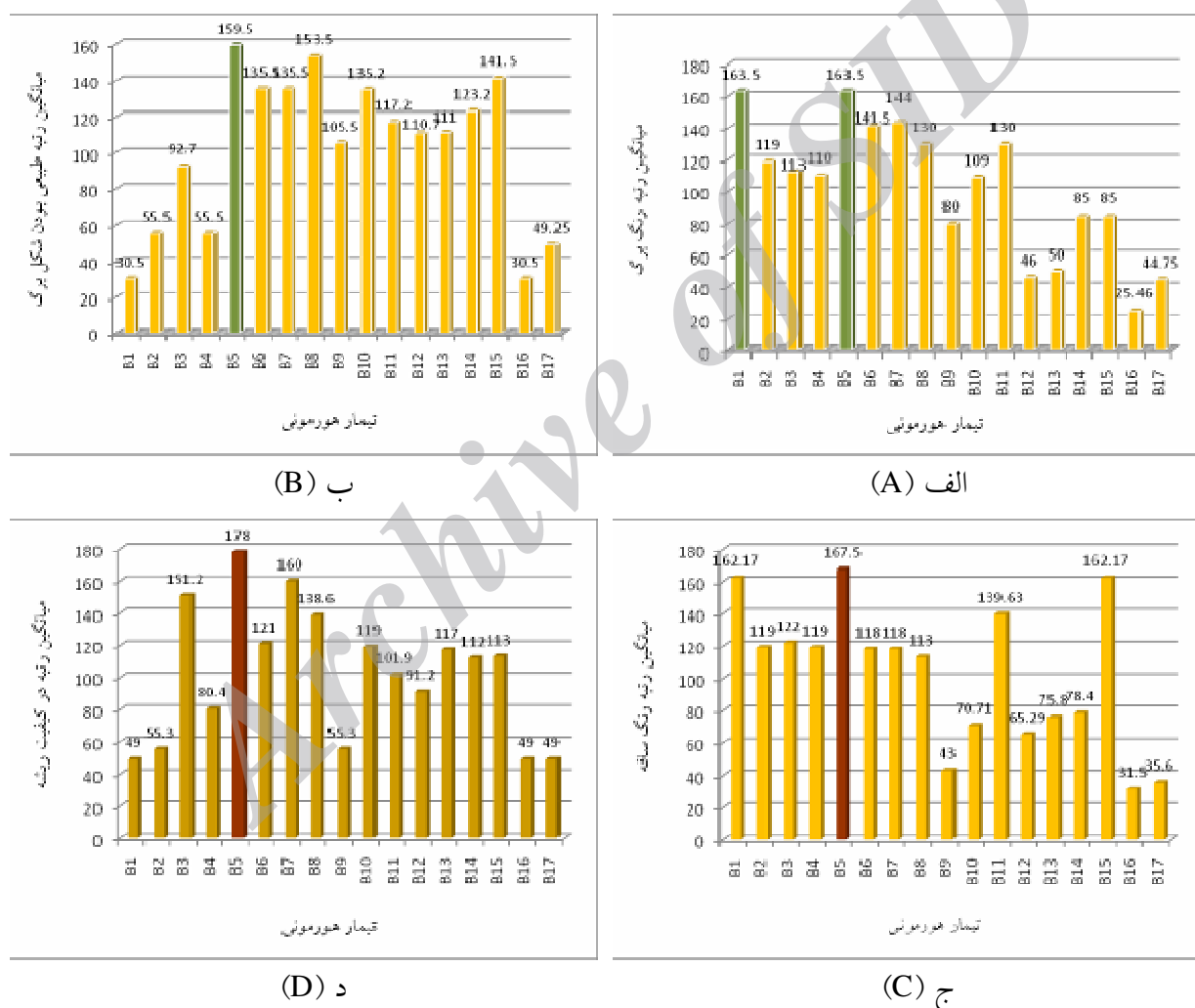


شکل ۳- مقایسه میانگین وزن (الف)، حجم (ب)، تراکم بافت کالوس (ج) و تعداد جنین های ثانویه (د) حاصل از کشت جنین های هیپوکوتیل.
Figure 3. Comparison of weight (A), volume (B), density (C) and secondary embryos (D) produced from hypocotyl explant



شکل ۴- 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 initiation, d-heart stage and e,f-torpedo stage



شکل ۵- مقایسه میانگین رتبه رنگ برگ (الف)، طبیعی بودن گیاهچه‌ها (ب)، رنگ ساقه (ج) و کیفیت ریشه (د) حاصل از گیاهچه‌ها در تیمارهای 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 ۴- خلاصه تجزیه واریانس صفات درصد کالوس‌زایی و درصد جنین‌زایی در دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ کوتیلدون.

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
۰/۷۵	۱۲/۶۲	۱۰۶۰۷**	۱	درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage
۰/۷۷	۱۱/۰۱	۷۹۴۹۷۰۶۴**	۱	درصد جنین‌زایی Embryogenesis percentage

ns: عدم اختلاف معنی دار * : اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و **: اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪
ns, *, **: non-significant, significant and highly significant (P<0.05 and P<0.01), respectively

آنها وارد مرحله نمو شده و پس از ۳۵ روز، برگ مرکب فرعی تولید نمودند (شکل ۶). گیاهچه‌ها مرحله رویشی را کاملاً طبیعی به پایان رساندند.

مرحله سازگاری با شرایط برون شیشه ای در مرحله سازگاری، گیاهچه‌های منتقل شده به گلدان، ۷۲٪ رشد طبیعی نشان دادند که ۴۵٪



ج (C)



ب (B)



الف (A)

شکل ۶- گیاهچه طبیعی حاصل آزمایش بهینه سازی رشد جنین (الف) و مراحل سازگاری و انتقال گیاهچه‌ها به گلدان شامل برداشتن پوشش پس از ۱۰ روز (ب) و مشاهده نمو، تشکیل برگ مرکب جدید پس از ۳۵ 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 ۵- آزمون مان وایتنی جهت مقایسه تیمار برتر (MS ۱/۲+ ۰/۰۱mg/l IBA + ۰/۲mg/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 Treatment comparison
معنی داری Asymp. sig.	مان ویتنی Mann-Whitney U	معنی داری Asymp. sig.	مان ویتنی Mann-Whitney U	معنی داری Asymp. sig.	مان ویتنی Mann-Whitney U	معنی داری Asymp. sig.	مان ویتنی 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 ۵٪ و ^{**}: اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪

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

جدول ۶- 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.

رنگ برگ		طبیعی بودن شکل برگ		رنگ ساقه		کیفیت ریشه		مقایسه برگ مرکب و برگ کوتیلدونی Comparison of leaf type
Leaf color		Leaf shape		Stem color		Root quality		
معنی داری	مان ویتنی	معنی داری	مان ویتنی	معنی داری	مان ویتنی	معنی داری	مان ویتنی	
Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	Asymp. sig.	Mann-Whitney U	
0.919 ^{ns}	72	0.655 ^{ns}	4915.5	0.876 ^{ns}	5027	0.646 ^{ns}	4912	

^{ns} : عدم اختلاف معنی دار

ns : Non significant

(1999). در بیش از ۸۰٪ از ۱۲۴ 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 ۶۵ گونه دولپه‌ای مرور شده، جنین‌زایی سوماتیکی در ۱۷ گونه در محیط بدون هورمون، در ۲۹ گونه روی محیط حاوی اکسین و در ۲۵ 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 (۴۹٪). هرچند مشاهده شده است که اسیدی کردن محیط در حضور غلظت مناسب از 2,4-D برای جنین‌زایی ($10\mu\text{M}$)، سبب ممانعت از جنین‌زایی می‌گردد اما اسیدی کردن محیط در شرایطی که غلظت 2,4-D برای جنین‌زایی مناسب نیست ($1\mu\text{M}$)، تحریک جنین‌زایی را سبب می‌شود (Pasternak *et al.*, 2002). پس از 2,4-D، هورمون‌های IAA (۶٪)، NAA (۲۷٪)، IBA (۶٪) و پیکلورام^۱ (۵٪) و دیکامبا^۲ (۵٪)، در مراتب بعد قرار دارند. در تحقیق حاضر نیز بیشترین میزان جنین‌زایی در محیط کشت MS و در حضور تیمارهای حاوی NAA به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتین صورت گرفت. در سیتوکینین‌ها،

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 منشأ 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 قلبی شکل 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.*,

¹-Picoloram

²- Dicamba

3-In vitrification

پدیده شیشه‌ای شدن^۳ 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 ۱-۳). 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 جنین‌های سوماتیکی در این پژوهش، نتایج این تحقیق می‌تواند نویدبخش امکان تولید بذر مصنوعی در زیره سیاه باشد.

بیشتر گزارشات تولید جنین، مربوط به هورمون BAP بوده است (۰.۵٪). پس از آن هورمون‌های کیتین (۰.۳٪)، زآتین (۰.۳٪) و TDZ (۰.۳٪) 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

منابع

- Agrawal SG, Thappa RK, Dbar KL, Atal CK (1979). Essential oils of the seeds of *Bunium bulbocastanum* Linn., *Carum gracile* Lindl and *Cuminum cyminum* Linn. *Indian Perfumer* 23: 34-37.
- Ammirato P, 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 *Dendrostellera 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 focitometry 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 Improvement 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.
- Wakhlou 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, Omid M.³, Hoori M.¹

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

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

³Department 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.