تولید پینه و باززایی گیاه کامل در سه توده بومی زیره سبز ایرانی

Callus Production and Plant Regeneration in Three Iranian Cumin Landraces (*Cuminum cyminum*)

محمد رضا معفوی فرد[1]، جعفر احمدی[2*]، امیر حسین بیگی[2]

چکیده

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum*، گیاهی یکساله از خانواده چتریان است که در ایران به‌صورت توده‌های بومی کشت می‌شود. این گیاه یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و با ارزش اقتصادی بالا می‌باشد. در این پژوهش از سه توده زیره سبز تهیه شده از استان‌های خراسان، کرمان و فارس استفاده گردید. ریز نمونه‌ها که شامل قطعاتی از کوتیلدون و هیپوکتیل حاصل از بذور جوانه زده بودند، در محیط کشت گامبورگ با ترکیبات هورمونی مختلف کشت شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی پیاده گردید. فاکتورهای مورد استفاده شامل هورمون NAA با سه غلظت 0/2، 0/4 و 0/6 میلی‌گرم در لیتر، IAA با دو غلظت 0/2 و 0/4 میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت صفر و 0/1 میلی‌گرم در لیتر و سه توده بومی زیره بودند. نتایج آزمایش نشان داد که هر سه توده تولید پینه‌های فشرده، سخت و به رنگ سفید مایل به سبز نمودند. با واکشت پینه‌ها به محیط تازه مراحل تولید جنین‌های رویشی از قبیل کروی، قلبی، نیزه‌ای و لپه‌ای شکل مشاهده شد. سپس جنین‌ها تولید نوساقه نمودند. نو ساقه‌های طویل شده به طول یک تا دو سانتی متر پس از بریده شدن از روی پینه به محیط ریشه‌زایی MS $\frac{1}{2}$ همراه با 0/2 میلی‌گرم در لیتر IAA منتقل و همه آن‌ها ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده نهایتاً به گلدان‌های حاوی خاک شنی و خاک برگ استریل به نسبت 1:1 انتقال داده شدند. پس از 20 تا30 روز گیاهچه‌ها تولید گل نمودند. هیچ‌گونه گیاه فاقد کلروفیل مشاهده نشد و همه گیاهان از نظر ظاهری سالم بودند. در این پژوهش توده خراسان با ترکیب هورمونی 0/4 میلی‌گرم در لیتر IAA + 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA + 0/1 میلی‌گرم در لیتر BAP بیش‌ترین پینه‌زایی و باززایی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: زیره سبز، بهینه سازی، پینه، باززایی

Archive of SID

1 و 2 به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین

*: نویسنده مسوول Email: njahmadi910@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* گیاهی از خانواده چتریان (Apiaceae)، یک‌ساله و علفی بوده و ارتفاع آن بر حسب شرایط محیطی از 15 تا 50 سانتی‌متر متغیر است (زرگری، 1360). زیره سبز دارای 4-3 درصد روغن فرار و 15 درصد رزین می‌باشد. عصاره آن دارای موادی همچون کومینول[1]، پاراسیمین[2]، ترپن[3]، فلاندرن[4]، کارون[5]، الکل کومینیک[6]، دی‌پنتن[7] و هیدروکومنیک[8] می‌باشد (*موتاما میلان*[9] و همکاران، 2008). کشت سلول و بافت یا قطعات جدا شده از بافت گیاهی روی یک محیط کشت غذایی و تحت شرایط ضد عفونی شده ممکن است منجر به تولید گیاهان کامل شود (*کومار*[10]، 2002). پینه اصولاً یک توده سلولی تمایز نیافته است که معمولاً در محل زخم‌های ایجاد شده در بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود. امکان تولید پینه و پس از آن رشد مجدد در یک محیط کشت جدید در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد. در شرایط استثنایی گاهی اوقات به‌طور خودبه‌خودی اندام‌های نابجا و یا جنین از یک پینه ایجاد می‌شوند (*لیندسی*[11]، 2207).

برای تحریک تشکیل پینه روی یک ریز نمونه اضافه کردن مواد تنظیم‌کننده رشد به محیط کشت توصیه می‌شود. خصوصیات ماده تنظیم‌کننده (نوع، غلظت و نسبت آن‌ها) تا حد زیادی بستگی به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های موجود در ریزنمونه دارد (*رزدان*[12]، 2003). کشت جنین از لحاظ اقتصادی مهم است زیرا امکان رشد گونه‌های هیبریدی که بذر آن‌ها در حالت عادی قادر به رشد نیستند را فراهم می‌آورد. هم‌چنین زمانی که بذر دارای دوره خواب قبل از جوانه زنی باشد، می‌توان به‌وسیله آن باعث شکستن دوره خواب بذر گردید (*تاکدا*[13] و همکاران، 2008). *تافیک*[14] و *نوگا* (2001) از ریز نمونه‌های هیپوکوتیل و میان‌گره زیره سبز استفاده نموده و توانستند در محیط MS حاوی 2/5 میکرومول در لیتر BAP[15]، نوساقه‌هایی به طول 4-3 میلی‌متر به‌دست آوردند. نوساقه‌های حاصله جهت ریشه‌زایی به محیط فاقد هورمون منتقل شدند که 95% آن‌ها ریشه‌زایی کردند. اضافه نمودن 2% پلی‌اتیلن گلیکول به محیط کشت، ریشه‌زایی را افزایش داد. هم‌چنین با اضافه کردن 1 میکرومول در لیتر IBA[16] به محیط حاوی PEG ریشه‌زایی از 75% به 85% افزایش یافت. *تافیک* و *نوگا* (2002) جهت تولید پینه از میان‌گره زیره در محیط حاوی 4 میکرومول در لیتر تو فوردی[17] به تنهایی و یا همراه با 2 یا 4 میکرومول در لیتر کاینیتین[18] استفاده کردند و میان‌گره‌ها تولید پینه نمودند. پینه‌ها جهت افزایش جنین‌زایی واکشت داده شده که با کاهش میزان کاینیتین محیط به 1 یا 0/5 میکرومول در لیتر نو ساقه‌هایی را تولید نمودند که در مراحل بعدی به گیاه کامل تبدیل شدند. ابراهیمی و همکاران (2003) اثر ریز نمونه‌های مختلف، ترکیبات مختلف هورمونی و محیط کشت‌های مختلف را برای تولید پینه در زیره سبز مطالعه نمودند و توانستند موفق به پینه‌زایی و باززایی گیاه شوند. بهترین ترکیب هورمونی این آزمایش شامل BAP، NAA[19] و IAA[20] به‌ترتیب به میزان 0/1، 0/2 و 0/4 میلی‌گرم در لیتر بود. *فلیپو*[21] و همکاران (2006) غلظت‌های مختلف دای کامبا[22]، توفوردی، IAA، NAA و IBA را بر جنین زایی و باززایی ارقام مختلف گندم‌های بهاره و پاییزه روسی مورد بررسی قرار داده و نتیجه گرفتند که همه هورمون‌های گروه اکسین باعث افزایش پینه‌زایی ریز نمونه‌های جنین گندم شدند. دای کامبا به غلظت 12 میلی‌گرم در لیتر به همراه 0/5 میلی‌گرم هورمون IAA، بیش‌ترین میزان پینه‌زایی (61 درصد) را در ریز نمونه ایجاد نمود. هم‌چنین نقش هورمون IAA جهت افزایش بازدهی جنین‌زایی رویشی در گندم، اساسی ذکر شده و اثر آن‌را وابسته به ژنوتیپ گزارش نموده‌اند.

تاناکا[23] و *ساکانیشی* (1977 و 1980) از 10 میلی‌گرم در لیتر BAP و یک میلی‌گرم در لیتر NAA برای باززایی جنین‌ها از ریز نمونه‌های برگی استفاده نمودند و توانستند به‌طور متوسط 3/8 جنین در محیط Hyponex و 1/4 جنین در محیط MS به ازای هر ریز نمونه القا کنند. هم‌چنین

1. Cuminol
2. Parasmin
3. Terpen
4. Phelanderen
5. Caruon
6. Al.cuminic
7. Dipenten
8. Hydrocuminie
9. Muthamma-Milan *et al.*
10. Kumar
11. Lindsey
12. Razdan
13. Takeda *et al.*
14. Tawfik and Noga
15. Benzylaminopurin
16. Indole 3-butyric acid
17. 2,4 dichirophenoxyacetic acid
18. Kinetin: 6 -furfurylamino purine
19. 1-Naphtalene acetic acid
20. Indole 3- acetic acid
21. Filippov *et al.*
22. Dicamba
23. Tanaka. and Sakanishi

Archive of SID

www.SID.ir

کالیموتو[1] و همکاران (2007) غلظت بهینه 2 میلی‌گرم در لیتر BAP را در آزمایش‌های خود جهت پینه‌زایی و جنین-زایی گزارش کردند. *پارک*[2] و همکاران (2002) نیز بالاترین باززایی جنینی (12 عدد در هر ریزنمونه) را در محیط 1/2MS حاوی 8/8 میکرومول BAP و 5/4 میکرومول NAA گزارش نمود.

مارتین[3] (2004) در آزمایشی توانست از گیاه داروئی *Centella asiatica* در محیط حاوی 5/3 میکرومول در لیتر هورمون NAA به همراه 2/3 میکرومول در لیتر کاینیتین جنین‌های رویشی به‌دست آورد. او هم‌چنین کاربرد IAA و کاینتین را آزمایش نمود و نتیجه‌گیری کرد که اگر NAA یا IAA در غلظت‌های بالاتر از 16 میکرومولار به کاربرده شود - (در حضور کاینتین)، میزان پینه‌زایی کاهش خواهد یافت. هم‌چنین کاربرد هم‌زمان NAA وBAP مشابه کاربرد NAA و کاینتین گزارش گردید.

هدف از این آزمایش عبارت بود از (1) بهینه کردن تولید پینه زیره سبز به‌منظور استفاده در تولید متابولیت‌ها و کشت پروتوپلاست و غیره (2) به‌دست آوردن بهترین ترکیب هورمونی در توده‌های مختلف جهت پینه‌زایی و باززایی.

مواد و روش‌ها

بذور توده‌های بومی (خراسان، کرمان و فارس) زیره سبز از سازمان تحقیقات کشاورزی استان‌های مربوطه تهیه گردیدند. برای ضد عفونی آن‌ها ابتدا بذور یک مرتبه با آب صابون شستشو و آب‌کشی شدند، سپس با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد همراه با 8 قطره توین[4] 80 (به‌منظور افزایش نفوذ پذیری محلول) در 200 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به مدت 20 دقیقه روی همزن مغناطیسی قرار گرفته و ضدعفونی شدند. بذور ضد عفونی شده به مدت 4-2 ساعت درون آب مقطر استریل در محفظه سترون دارای جریان هوا قرار گرفتند تا متورم شوند. سپس جنین‌ها را از پوسته بذور خارج نموده و روی آن‌ها دو برش یکی در بالای جنین در انتهای کوتیلیدون و دیگری در پایین جنین در انتهای هیپوکوتیل ایجاد گردید. ریزنمونه‌های آماده شده بلافاصله به محیط کشت منتقل شدند. درون هر پتری‌دیش پنج ریزنمونه برش یافته کشت داده شد. در این آزمایش از محیط کشت گامبورگ[5] محتوی 30 گرم در لیتر ساکارز استفاده شد و به‌منظور ایجاد تیمارهای هورمونی متفاوت از IAA به میزان 0/2 و 0/4 میلی‌گرم در لیتر، NAA به میزان 0/2، 0/4 و 0/6 میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان صفر و 0/1 میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. بر این اساس، آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با هشت تکرار (پتری‌دیش) اجرا شد و هر پتری‌دیش حاوی پنج ریز نمونه بود. فاکتورهای آزمایشی شامل سه توده زیره، دو غلظت IAA، سه غلظت NAA و دو غلظت BAP به شرح فوق بودند. pH محیط روی 5/7 تنظیم و از آگار به میزان هفت گرم در لیتر، به عنوان جامد کننده استفاده شد. محیط کشت تهیه شده به مدت 20 دقیقه در فشار 1/5 اتمسفر و دمای 121 درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. ریزنمونه‌ها (جنین‌های برش یافته)، به‌صورت افقی روی محیط کشت درون پتری-دیش‌ها کشت شدند و شیشه‌ها درون اتاقک رشد، با فتوپریود 16ساعت روشنایی، شدت نور 6500 لوکس و دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای ارزیابی میزان پینه-زایی ریزنمونه‌ها، درصد نمونه‌های رشد یافته ملاک عمل قرار گرفت. گیاهچه‌های باززائی شده حاوی ریشه و ساقه از محیط کشت خارج شده و پس از شستشوی ریشه‌ها با آب، به گلدان‌های حاوی خاک شنی و خاک برگ استریل به نسبت 1:1 منتقل و سپس به گلخانه انتقال داده شدند. جهت جلوگیری از اتلاف رطوبت، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشیده شد (شکل 1). گلدان‌ها هر روز آبیاری شدند و به مرور زمان با ایجاد سوراخ‌هایی در این سرپوش‌ها، گیاهان به شرایط محیطی عادت داده شدند.

شکل 1: گیاهچه‌های باززایی شده توده خراسان و انتقال آن‌ها به خاک در شرایط گلخانه

Figure1: Regenerated plantlets of Khorasan accession and transferring to soil at greenhouse

تجزیه و تحلیل آماری

1. Kalimuthu *et al.*
2. Park *et al.*
3. Martin
4. Tween 80
5. Gamburg

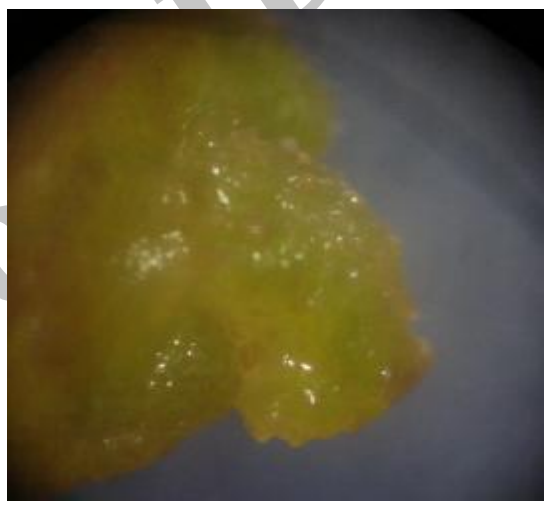
www.SID.ir

برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم افزار SPSS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

تولید پینه و جنین رویشی از ریز نمونه و باززایی گیاهچه

هر سه توده بذری پینه‌های فشرده، سخت و به رنگ سفید مایل به زرد تولید کردند. با واکشت پینه‌ها با همان ترکیب هورمونی مراحل تولید جنین‌های رویشی شامل کروی[1]، قلبی[2]، نیزه‌ای[3] و لپه‌ای[4] شکل مشاهده شد. شکل (2) نمونه‌ای از پینه جنین‌زای تولید شده از توده خراسان در محیط کشت گامبورگ را نشان می‌دهد.



شکل 2: پینه جنین زای تولید شده از توده خراسان در محیط کشت گامبورگ با ترکیب هورمونی ۰/۴ mg/l IAA + ۰/۱ mg/l BAP + ۰/۲ mg/l NAA

Figure 2: Embryogenic callus of Khorasan accession in Gamborg's medium complemented with 0.2 mg/l NAA+0.1 mg/l BAP+0.4 mg/l IAA

پس از گذشت 20 روز، جنین‌ها نوساقه‌هایی را ایجاد نمودند (شکل3). به‌منظور رشد طولی نوساقه‌ها، پینه‌های دارای نو ساقه به محیط کشت تازه با ترکیب هورمونی قبلی واکشت شدند که پس از این‌که 3 تا 5 سانتی‌متر رشد کردند به محیط کشت ریشه‌زایی (ابراهیمی و همکاران، 2003) منتقل گردیدند. ضمنا سعی شد نو ساقه‌هایی انتخاب گردند که از لحاظ ظاهری نسبت به بقیه قوی‌تر و شاداب‌تر باشند. محیط کشت ریشه‌زایی ($\frac{1}{2}$MS) حاوی 0/2 میلی-گرم در لیتر IAA بود که در آن همه نوساقه‌ها ریشه‌دار شدند (شکل 4). در این آزمایش90 درصد گیاهچه‌های باززایی شده زنده ماندند و گیاهچه‌ها 20 تا 30 روز پس از انتقال به محیط خاکی تولید گل نمودند (شکل5). در این آزمایش گیاهچه فاقد کلروفیل (Albino) مشاهده نشد.

شکل 3: نوساقه‌های تولید شده از پینه توده خراسان در محیط کشت گامبورگ با ترکیب هورمونی ۰/۴ mg/l IAA + ۰/۱ mg/l BAP + ۰/۲ mg/l NAA

Figure 3: Regenerated shoots from Khorasan accession callus in Gamborg's medium complemented with 0.2 mg/l NAA+0.1 mg/l BAP+0.4 mg/l IAA

شکل 4: نوساقه ریشه‌دار شده توده فارس در محیط $\frac{1}{2}$ MS محتوی 0/2 میلی‌گرم در لیتر IAA

Figure 4: Rooting of regenerated shoot for Fars accession in 1/2 MS medium with 0.2 mg/l IAA

1. Globular
2. Heart shape
3. Torpedo
4. Cotylidonary

www.SID.ir

شکل 5: گیاهچه‌های سازگار شده در گلخانه و آغاز گلدهی پس از 30 روز از انتقال به خاک در توده کرمان

Figure 5: Adapted plantlets in greenhouse and their flowering after 30 days of transferring to soil in Kerman accession

نتایج تجزیه واریانس

تجزیه واریانس اثر عوامل مطالعه شده روی پینه زایی در جدول (1) نشان داده شده است. در این پژوهش پاسخ توده‌ها به غلظت‌های مختلف هورمونی متفاوت بود. در جدول (1) اثر معنی‌دار توده (ژنوتیپ) در پینه‌زایی زیره سبز دیده می‌شود. توده‌های خراسان، فارس و کرمان پاسخ متفاوتی را به ترکیبات هورمونی مورد استفاده نشان دادند، که نشان از تفاوت ژنوتیپی این توده‌ها می‌باشد. در توجیه نحوه اثر ژنوتیپ می‌توان چنین بیان داشت که هر کدام از این پاسخ ها ممکن است توسط ژن یا گروه های ژنی خاصی کنترل شوند که در ژنوتیپ‌ها یا توده‌های بومی متفاوت تظاهر یکسانی ندارند. بین دو غلظت BAP تفاوت معنی‌دار دیده شد که دلالت بر وابستگی صفت پینه‌زایی به این هورمون دارد. بین سه غلظت NAA هم اختلاف معنی‌دار وجود داشت که تاثیر این هورمون بر پینه‌زایی زیره سبز را نشان می‌دهد. هم‌چنین اثر دو غلظت هورمون IAA نیز معنی‌دار شد که اثر مقدار IAA را بر پینه‌زایی زیره سبز نشان می‌دهد.

همان‌طور که در جدول (1) ملاحظه می‌شود، اثر متقابل بین توده و غلظت‌های BAP معنی‌دار می باشد، که این مساله دلالت بر واکنش متفاوت توده‌ها به غلظت‌های مختلف BAP می‌کند، به‌طوری که هر توده رفتار متفاوتی را نسبت به غلظت‌های مختلف این هورمون از خود نشان می‌دهد. اثر متقابل بین توده‌ها و غلظت‌های هورمون IAA، نیز معنی‌دار بوده و دلالت برعدم تاثیر یکسان این هورمون بر پینه‌زایی، در توده‌های مختلف داشت. در حالی‌که اثر متقابل بین توده‌ها و غلظت‌های هورمون NAA معنی‌دار نبوده و دلالت بر تاثیر یکسان این هورمون بر پینه‌زایی، در توده‌های مختلف دارد. در مورد سایر اثرات متقابل نیز وجود و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطوح یک و پنج درصد، در جدول مذکور نشان داده شده است.

مقایسه میانگین سه توده بومی از لحاظ میزان پینه‌زایی در جدول (2) نشان داده شده است، توده خراسان با میانگین 27/5 درصد بیشترین تولید پینه را در بین سه توده داشته و توده کرمان با میانگین 12/3 درصد رتبه دوم و توده فارس با میانگین 2/3 درصد در رتبه سوم قرار گرفت.

جدول1: تجزیه واریانس صفت پینه‌زایی برای توده‌ها و ترکیبات هورمونی

Table 1: Analysis of variance for accessions callus induction and hormonal combination

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (M.S)	F-test
(a) accession	2	6.14	25.8**
(b) BAP	1	26.05	109.3**
(c) NAA	2	1.75	7.4**
(d) IAA	1	2.71	11.4**
a Í b	2	5.8	24.4**
a Í c	4	0.61	2.5 ns
a Í d	2	0.88	3.7*
b Í c	2	0.59	2.5 ns
b Í d	1	0.29	1.2 ns
c Í d	2	2.18	9.2**
a Í b Í c	4	0.16	0.7 ns
a Í b Í d	2	0.38	1.6 ns
a Í c Í d	4	1.43	6**
b Í c Í d	2	0.85	3.6*
a Í b Í c Í d	4	1.06	4.5**
Error	252	0.23	
Total	288		

ns ، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال 5 و 1 درصد.

ns,* and **: non-significant and significant at 5 and 1% levels, respectively.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج پژوهش‌های گذشته اثر ژنوتیپ بر نوع و میزان پاسخ دهی ریز نمونه‌ها به غلظت‌های هورمونی و هم‌چنین متفاوت بودن این پاسخ‌ها حتی در ژنوتیپ‌های مختلف یک رقم را قبلاً گزارش نموده‌اند (*اوزژن*[1]، 1998، *فلیپو*، 2006 و *ساناتومبی*[2]، 2008).

مقایسه توده‌ها از لحاظ نو ساقه‌های باززایی شده از پینه در جدول 2 نشان داده شده است. توده خراسان با میانگین 52/8 درصد بیش‌ترین میزان تولید نو ساقه را بین سه توده داشت و پس از آن توده کرمان با میانگین 24/6 درصد و توده فارس با میانگین 13/3 درصد نو ساقه باززایی شده از پینه، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

از نظر اثر BAP بر پینه‌زایی توده‌ها، درغلظت صفر BAP پینه‌زایی مشاهده نگردید. اما در غلظت 0/1 میلی‌گرم در لیتر، میانگین پینه‌زایی 25 درصد افزایش نشان داد. در تائید نتایج این آزمایش ابراهیمی و همکاران (2003) و *تافیک* و *نوگا* (2001) تاثیر مثبت BAP در تولید پینه زیره سبز و *تاناکا* و *ساکانیشی* (1977 و 1980)، *کالیموتو* و همکاران (2007) و *پارک* و همکاران (2002) تاثیر مثبت BAP در تولید پینه و جنین‌زایی ارکیده و سایر گیاهان را مورد تایید قرار داده و وجود آن را جهت تولید پینه ضروری دانسته‌اند.

گزارش‌های متعددی در مورد اثر NAA بر میزان پینه‌زایی و جنین‌زایی در گیاهان مختلف وجود دارد. به‌طوری‌که *تاناکا* و *ساکانیشی* (1977 و 1980) یک میلی‌گرم در لیتر NAA را برای باززایی جنین‌ها از ریز نمونه‌های برگی ارکیده مناسب گزارش کرده است هم‌چنین *پارک* و همکاران (2002) نیز بالاترین باززایی جنینی (12 عدد در هر ریزنمونه) را در محیط 1/2MS دارای 5/4 میکرومول NAA گزارش نمود. در برخی موارد افزایش این هورمون موجب افزایش میزان پینه دهی شده است (*رائو*[3] و پوروهیت، 2006) و برعکس در برخی موارد افزایش این هورمون موجب کاهش میزان پینه دهی شده است (*مارتین*، 2008). به کار بردن غلظت 0/4 هورمون NAA باعث کاهش پینه دهی نسبت به سطح 0/2 گردید (جدول 2). با توجه به معنی‌دار نبودن اختلاف غلظت‌های 0/2 و 0/6 NAA ، چنین استنباط می‌شود که به کار بردن غلظت 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA برای پینه زایی کافی بوده و افزودن آن تاثیری در افزایش میزان پینه دهی ندارد. این‌که چرا غلظت 0/4 میلی‌گرم در لیتر این هورمون باعث کاهش پینه‌زایی می‌شود بر ما مشخص نیست.

میانگین پینه‌زایی دو غلظت 0/2 و 0/4 میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA (جدول 2) نشان داد که افزایش میزان این هورمون موجب کاهش میانگین پینه‌زایی شده، به گونه‌ای که با افزایش IAA از 0/2 به 0/4 میلی‌گرم در لیتر، پینه‌زایی در تمام توده‌ها کاهش یافته و برای پینه‌دهی، غلظت 0/2 میلی‌گرم در لیتر این هورمون نتیجه بهتری را نسبت به غلظت 0/4دارد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل سه جانبه BAP × IAA × NAA بر پینه‌زایی توده‌ها در جدول (3) نشان داده شده است. در این جدول ملاحظه می‌شود که در ترکیب‌های مختلف دو هورمون BAP و NAA افزایش IAA از 0/2 به 0/4 در همه موارد تاثیر منفی داشته و باعث کاهش پینه‌زایی می‌شود. البته در مقایسه میانگین اثرات ساده IAA نیز مشاهده شد که در کل افزایش غلظت IAA اثر منفی در میزان پینه‌زایی دارد. غلظت 0/1 میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA به‌علاوه 0/2 میلی‌گرم در لیتر IAA بیش‌ترین میزان پینه‌زایی (43/3 درصد) را باعث گردید. همان‌گونه که از جدول (3) مشاهده می‌شود، وجود هورمون BAP (در تمام ترکیبات ممکن NAA×IAA) در پینه‌زایی، نقشی اساسی را ایفا می‌کند به‌نحوی که در عدم حضور آن، پینه‌زایی انجام نمی‌پذیرد.

مطابق با پژوهش‌های *تافیک* و *نوگا* (2002) و ابراهیمی و همکاران (2003) که ترکیب مناسبی از هورمون‌های اکسینی و سیتوکینینی نقش مهمی را در پینه‌زایی و باززایی زیره ایفا می‌کنند. در این پژوهش نیز در هر سه توده بومی ایرانی پینه تولید شده و این پینه‌ها به گیاه کامل تبدیل شدند. توده خراسان با ترکیب هورمونی 0/2 میلی‌گرم در لیتر NAA +0/1 میلی‌گرم در لیتر BAP + 0/4میلی‌گرم در لیتر IAA بیش‌ترین درصد پینه‌زایی و باززایی را در بین سه توده نشان داد.

همان‌گونه که دیده شد، اثر توده بر میزان پینه‌زایی معنی‌دار بود که نشان از تاثیر شدید ژنوتیپ بر القاء پینه و توانایی باززایی پینه به گیاه کامل را دارد. در تایید نتایج حاصل از این پژوهش، *اوزژن* (1998) نیز اثر ژنوتیپ را بر پینه‌زایی و باززایی گیاه از جنین 12 رقم گندم بسیار موثر ذکر کرده است. *فلیپو* و همکاران (2006) نیز در مقایسه چندین رقم بهاره و پاییزه گندم نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف از لحاظ توانایی تولید پینه‌های جنین‌زا و هم‌چنین

1. Ozgen
2. Sanatombi
3. Rao and Purohit

www.SID.ir

بازایی ساقه تفاوت قابل توجهی وجود دارد. آن‌ها بیان نمودند که می‌توان با بهینه کردن فاکتورهای خارجی مانند ترکیبات هورمونی و محیط کشت، تاثیر ژنوتیپ را در بازایی گیاه کاهش داده و کارآئی تولید جنین‌های رویشی را افزایش داد. بنابراین جهت مطالعات بعدی، بسته به هدف، بهتر است از واریته‌ای استفاده شود که پتانسیل بالایی را در کشت بافت نشان داده است که در پژوهش حاضر توده خراسان توصیه می‌گردد.

جدول 2: مقایسه میانگین پینه‌زائی و بازایی (درصد) بین سه توده بومی و هورمون‌های BAP، NAA و IAA

Table 2: Mean comparison of callus induction and regeneration among three accessions and BAP, NAA and IAA hormones

درصد پینه‌زایی callus induction%	IAA	درصد پینه‌زایی callus induction%	NAA	درصد پینه‌زایی callus induction%	BAP	درصد بازایی regeneration%	درصد پینه‌زائی callus induction%	توده accession
16.94 a	0.2	17.5 a	0.2	1.25 b	0	52.8 a	27.5 a	خراسان
11.11 b	0.4	13 b	0.4	26.8 a	0.1	24.6 b	12.3 b	کرمان
		17.5 a	0.6			13.3 c	2.29 c	فارس

جدول 3: مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA × IAA× BAP بر درصد پینه‌زایی توده‌ها

Table 3: Mean comparison of accessions callus induction for interaction affect NAA× IAA× BAP

NAA × IAA × BAP	N_1I_1	N_1I_2	N_2I_1	N_2I_2	N_3I_1	N_3I_2
BAP(0)	3.3 d	0 d	0 d	0 d	4.1 d	0 d
BAP(0.1)	43.3 a	23.3 c	17.5 cd	10.8 cd	40 ab	25.8 bc

I_1 و I_2 : به‌ترتیب 0/2 و 0/4 میلی‌گرم در لیتر IAA

N_1 و N_2 و N_3 : به‌ترتیب 0/2 و 0/4 و 0/6 میلی‌گرم در لیتر NAA

I_1, I_2: 0.2, 0.4 mg/l IAA, respectively.

N_1, N_2, N_3: 0.2, 0.4, 0.6 mg/l NAA, respectively

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

زرگری، ع. 1360. گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات دانشگاه تهران.

Bhojwani, S. S. and Soh, W. Y. 2003. Agrobiotechnology and Plant Tissue Culture. Science publisher,Inc, India.

Ebrahimi, E., Habashi, A. A., Ghareyazie, B. and Mohammadi, M. 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 75: 19-23.

Filippov, M., Miroshnichenko, D., Vernikovskaya, D. and Dolgov, S. 2006. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84: 213–222.

Kalimuthu, K., Senthilkumar, S. and Vijayakumar, S. 2007. *In vitro* micropropagation of orchid. African Journal of Biotechnology. 6: 1171-1174.

Kumar, U. 2002. Methods in plant tissue culture. Agrobios. pp. 139-147, India.

Lindsey, L. 2007. Plant tissue culture manual. Kluwer academic publisher.

Martin, K. P. 2004. Plant regeneration through somatic embryogenesis in medicinally important centella asiatica. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 40: 586-591.

Muthamma-Milan, K. S., Dholakia, H., Kaul-Tiku, P. and Vishveshwaraiah, P. 2008. Enhancement of digestive enzymatic activity by cumin (*Cuminum cyminum* L.) and role of spent cumin as a bionutrient. Food Chemistry. 110: 678–683.

Ozgen, M., Turet, M., Altmok, S. and Sancak, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Plant Cell Reports. 18: 331–335.

Rao, M. S., and Purohit, S. D. 2006. *In vitro* shoot bud differentiation and plantlet regeneration in (*Celastrus paniculatus*). Biologica Plantrum. 50: 501-506.

Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science publisher, Inc.

Sanatombi, K., and Sharma G. J. 2008. *In vitro* plant regeneration in six cultivars of Capsicum spp. using different explants. Biologica Plantrum, 52: 141-145.

Takeda, T., Mizukami, M. and Matsuoka, H. 2008. Characterization of two-step direct somatic embryogenesis in carrot. Journal of Food Engineering. 38: 206–211.

Tanaka, M. and Sakanishi, Y. 1977. Clonal propagation of Phalaenopsis by leaf culture. Am. Orchid Society Bulletin, 46: 733-737.

Tawfik A. A. and Noga, G. 2001. Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explants of cumin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66: 141-147.

Tawfik, A. A. and Noga, G. 2002. Cumin regeneration from seedling drived embryogenic callus in response to amended kinetin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 35-40.

Park, S. Y. Murthy, N. and Peak, K. Y. 2002. Protocorm like body induction and subsequent plant regeneration from root tip culture of Droitaenopsis. Plant Science, 4: 919-923.

Archive of SID

www.SID.ir

Callus Production and Plant Regeneration in Three Iranian Cumin Landraces (*Cuminum cyminum*)

Mafavi fard[1], M. R., Ahmadi[2]*, J. and Beiki[2],A. H.

Abstract

Cumin (*Cuminum cyminum*) is an annual plant from Umbliferus family that is cultivated in Iran as landraces. This plant is one of the oldest plants with pharmaceutical and economical importance. In this experiment cumin seeds were collected from Khorasan, Kerman and Fars provinces of Iran. Explants were cultured in Gamborg media with hormonal components. Factorial experiment with four factors based on completely randomized design (CRD) was conducted. Factors that used in this experiment consist of three hormones, i.e. NAA with three levels 0.2, 0.4 and 0.6 mg/L, IAA with two levels 0.2 and 0.4 mg/L and BAP with two levels zero and 0.1 mg/L concentrations, and cultivar with three levels (three cumin landraces). The results showed that each of landraces produced hard, compact and white greenish color calli. After subculturing, embryogenesis stages consist of globular, turpido, heart and cotilidonary shapes were observed. Then thiny shoots were produced by embryos. Elongated shoots were cute from callus and transferred to rooting media with 1/2 MS salt and 0.2 mg/l IAA. All of the shoots produced roots successfully. Fully developed plantlets with well-developed root and shoot systems were transferred to pots containing sterile sandy soil. After 20-30 days, the plantlets started to flowering. No albino or abnormal plants observed. The analysis of results showed that Khorasan landrace at hormonal component with 0.4 mg/l IAA+ 0.2 mg/l NAA + 0.1 mg/l BAP had the maximum callus production and plant regeneration.

Keywords: *Cuminum cyminum*, Optimization, Callus, Regeneration

Archive of SID

1 And 2. M. SC. Student and Assistant professors respectively, Department of Agriculture Biotechnology, Imam Khomeini International University, Ghazvin

∗: Corresponding author - Email: njahmadi910@yahoo.com

www.SID.ir