Archive of SID

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۵، جلد ۵، شماره ۲، صفحات ۲۱۰-۱۹۷

JRIFST

بررسی تولید کومین آلدئید به‌عنوان طعم‌دهندهٔ مواد غذایی با استفاده از سیستم کشت توأم سلولی زیرهٔ سیاه کوهی [Boiss] *Bunium persicum* و زیرهٔ سیاه اروپایی *Carum carvi* L.

مریم غیور کاظمی[۱]، سیدمهدی زیارت‌نیا[۲]*، مجید رجبیان[۳]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
۲- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
* نویسنده مسئول (m.ziaratnia@rifst.ac.ir)
۳- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۱

واژه‌های کلیدی:
زیرهٔ سیاه کوهی
زیرهٔ سیاه اروپایی
کشت توأم سلولی
کشت سوسپانسیون سلولی
کومین آلدئید

چکیده

در این پژوهش به‌منظور افزایش تولید کومین آلدئید به روش کشت سلولی تعلیقی از سیستم کشت توأم سلولی دو گیاه زیرهٔ سیاه کوهی *Bunium persicum* [Boiss] و زیرهٔ سیاه اروپایی *Carum carvi* L. استفاده شد. براین‌اساس بذور دو گیاه در یک محیط کشت ساده و در شرایط دمایی ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد جوانه‌زنی انجام دادند. جهت القای کالوس از بذر جوانه زدهٔ دو گیاه در محیط کشت جامد MS استفاده شد. سپس برای رسیدن به حداکثر بیوماس سلولی در محیط کشت جامد MS، غلظت‌های مختلف ساکارز ۶-۱ درصد موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت ۳ درصد ساکارز پس از ۲ هفته به حداکثر وزن تر سلول به میزان ۰/۲۱ گرم می‌رسد. پس از استقرار کشت تعلیقی سلولی هر کدام از گیاهان به‌طور جداگانه، سلول‌های حاصل از کشت تعلیقی دو گیاه زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی به نسبت درصدهای مختلف (۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۷۵:۲۵، ۱۰۰:۰) با یکدیگر مخلوط شده و روی شیکر در شرایط محیطی همانند مرحلهٔ کشت کالوس قرار گرفتند. اندازه‌گیری کومین آلدئید به روش کروماتوگرافی گازی از عصارهٔ حاصله از نمونه‌های کشت توأم سلولی طی ۷ هفته مشخص نمود که بیشترین میزان تولید کومین آلدئید در تمام نسبت درصدها مربوط به ترکیب ۲۵ درصد زیرهٔ سیاه کوهی و ۷۵ درصد زیرهٔ سیاه اروپایی به میزان ۲۳/۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم در هفته پنجم می‌باشد که در مقایسه با زیرهٔ سیاه کوهی که ۷/۶۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بود در همین مدت سه برابر افزایش تولید را نشان می‌دهد. همچنین کمترین میزان کومین آلدئید در این ترکیب مربوط به هفته اول بود.

مقدمه

زیرهٔ سیاه شامل گیاهان زیرهٔ سیاه کوهی[۱] و زیرهٔ سیاه اروپایی[۲] است که به‌عنوان گیاه دارویی موردِتوجه می‌باشند در حال حاضر اسانس این گیاهان در صنایع مختلف دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی دارای کاربرد می‌باشد. در اسانس زیرهٔ سیاه که مهم‌ترین خواص دارویی شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدتومورهای سرطانی، مدر، سبب افزایش استروژن،

[1] *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch
[2] *Carum carvi* L.

www.SID.ir

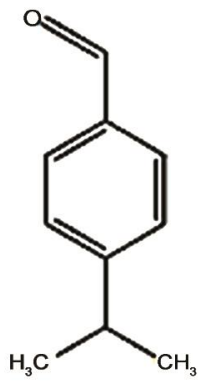
Archive of SID

ضددیابت، تقویت سیستم ایمنی و دستگاه گوارش می‌باشد.

زیرهٔ سیاه کوهی[1] ازجمله گیاهان دارویی ارزشمند و بومی ایران است که در نواحی شمالی خراسان، کرمان و شرق زاگرس تا بندرعباس رشد می‌کند (قهرمان، ۱۳۷۲). این گیاه در سالهای اخیر زراعی شده و در حال حاضر در بعضی نقاط کشور به‌ویژه استان خراسان کشت می‌گردد و از بذر آن در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود (خسروی، ۱۳۸۴). بذر این گیاه حاوی ترکیبات ارزشمندی نظیر کومین آلدئید، گاما-ترپینن، پارا-سیمن، بتا-پینن، آلفا-پینن، میرسن و لیمونن است (مقتدر و همکاران، ۱۳۸۸)، 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 علاوه‌بر صنعت غذا و دارو در برخی صنایع آرایشی نیز استفاده می‌شود (salehi *et al.*, 2008). از زیرهٔ سیاه اروپایی[2]، در درمان اختلالات گوارش، سردرد، بهبود عملکرد کبد، درمان سرفه، درمان التهاب و روماتیسم و آنتی‌دیورتیک و درمان دیابت، فشارخون بالا و ذات‌الرّیه و اگزما استفاده می‌شود. همچنین از خواص درمانی این گیاه می‌توان به اثرات ضدنفخ، ضداسپاسم، ضدمیکروبی، قابض، مدر و شیرافزا بودن، درمان اختلالات گوارشی به‌ویژه در قولنج نفخی کودکان و همچنین التهاب دستگاه تنفسی نام برد.

محصول عمدهٔ این گیاهان اسانس آنهاست که به‌عنوان عطر و طعم‌دهنده در صنایع غذایی و نیز دارویی مورد استفاده قرار می گیرد. ترکیبات عمده در اسانس زیرهٔ سیاه اروپایی کارون، آلفاپینن، لیمونن، گاماتریپینن، لینالول، کارون و پی‌پاراسمین و کومین آلدئید می‌باشد. همچنین مطالعات مختلفی بر روی شناسایی ترکیبات اسانس زیرهٔ سیاه کوهی صورت گرفته است. در تحقیقی ترکیب‌های اسانس آن در سه رویشگاه مختلف کرمان توسط کوهستانی و همکاران (۱۳۸۶) موردبررسی و مقایسه قرار گرفته است. در اسانس حاصله از مناطق مختلف ترکیبات عمده، شامل گاما-ترپینن، کومین آلدئید، لیمونن، پاراسیمن و بتا-پینن، بودند.

کومین آلدئید یک ترکیب طبیعی است (شکل ۱) که در طب سنتی و صنایع غذایی و آرایشی مصرف می‌شود. در مطالعات سلولی مشاهده شده است که حضور این ترکیب در غلظت‌های بسیار کم (میکرومولار) اثر کشندگی بر سلول‌ها ندارد (Nitoda *et al.*, 2008). درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر مانند بسیاری از ترکیبات فعال در اسانس‌ها می‌تواند اثر ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروس و ضدسرطان بالایی داشته باشد (Mahony *et al.*, 2005).



شکل ۱- ساختار شیمیایی کومین آلدئید

استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عدم ایجاد اثرات جانبی مضر موردِتوجه عموم مردم می‌باشد ولی اکثر این گیاهان ارزشمند در حال حاضر به صورت وحشی در عرصه‌های طبیعی یافت می‌شوند که متأسفانه به دلیل برداشت بی‌رویه از عرصه‌های طبیعی، بخش عمدهٔ این گیاهان در معرض انقراض می‌باشند. بنابراین برای حفظ این ذخایر ارزشمند طبیعی باید از روش‌های جدید استفاده نمود که ضمن بهره‌برداری از خواص دارویی آنها بتوان از انقراض آنها نیز جلوگیری نمود.

روش‌های مختلف کشت بافت و سلول یکی از روش‌های افزایش تولید متابولیت ثانویه با منشاء گیاهی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند از این میان کشت سلولی گیاهی از روش‌های نویدبخش جهت تولید ترکیبات ثانویهٔ گیاهی بشمار می‌آید. در همین رابطه سیستم‌های مختلف کشت توأم[3] سلولی برای

[1] *Bunium persicum*
[2] *Carum carvi* L.
[3] Co-culture

www.SID.ir

Archive of SID

مدت طولانی جهت مطالعهٔ روابط بین جمعیت‌های مختلف سلولی از منابع مختلف مورد استفاده بودند در یک تعریف پایه‌ای، کشت توأم عبارت است از یک سیستم کشت محتوی دو یا بیشتر جمعیت سلولی مختلف که در یک سطح یکسان از تماس با یکدیگر رشد می‌کنند، اخیراً این سیستم‌ها جهت مطالعه و مهندسی سیستم‌های سنتزی چند سلولی پیچیده موردِتوجه ویژهٔ زیست‌شناسان علم سنتز واقع شده است. مطالعهٔ اثرات متقابل بین جمعیت‌های مختلف سلولی، بهبود سطح موفقیت کشت در برخی جمعیت‌ها یا استقرار اثرات سنتزی بین سلول‌های مختلف، انگیزه استفاده از این روش می‌باشد (Goers *et al.*, 2014).

کشت توأم یک رویکرد جدید در تولید بالای متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی است که شامل ترکیبات مختلفی از اندام‌های گیاهی مانند سلول، ساقه، ریشهٔ نابجا، ریشهٔ موئین با یکدیگر یا در ترکیب با باکتری یا قارچ می‌باشد. اندام‌ها یا سلول‌های گیاهی که به‌طور همزمان در کشت توأم رشد می‌یابند، می‌توانند از گونه، جنس یا خانواده مشابه یا متفاوت باشند، در این سیستم دو کشت در یک دستگاه به‌طور همزمان رشد می‌کنند. این رویکرد برای اولین بار توسط Subroto و همکاران (۱۹۹۶) در کشت توأم غده‌های ساقه‌ای[1] و ریشهٔ موئین[2] *Atropa belladna* که به‌صورت ژنتیکی به ترتیب توسط *Agrobacterium tumefaciens* و *A. Rhizogenes* ایجادشده بودند با هدف تولید هیوسیامین و اسکوپولامین موردِمطالعه قرار دادند درنهایت علی‌رغم اینکه هیچ‌کدام از این کشت‌ها به تنهایی قادر به تولید اسکوپولامین نبودند در این روش میزان ذخیرهٔ اسکوپولامین در ساقه‌ها ۰/۸۴ میلی‌گرم بر گرم مادهٔ خشک بود یعنی ۱۱-۳ برابر آنچه در برگ گیاه کامل ذخیره می‌شود. همچنین نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در کشت توأم در دامنه‌ای بین ۰/۷ تا ۱/۹ افزایش یافت درحالی‌که این نسبت در ریشهٔ موئین به تنهایی ۰/۰۳-۰ متغیر بود. در کشت توأم سلولی گیاهی، ابتدا سلول‌ها به‌طور جداگانه در محیط کشت مایع رشد یافته و سپس با هم مخلوط شده و در یک محیط کشت مایع رشد می‌کنند. در این سیستم به دلیل وجود اثرات متقابل دو سیستم بر روی یکدیگر احتمال افزایش متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. یکی از کاربردهای این سیستم‌ها می‌توانند در بررسی اثرات متقابل جمعیت‌های سلولی مختلف بر تولید مواد مؤثرهٔ خاصی باشد که برخی از آنها دارای خواص دارویی می‌باشند. در آزمایشی با هدف تولید بتاکربولین در سیستم کشت سلولی دو گیاه اسپند و گیاه عطرسنگ به روش کشت توأم استفاده شد. در این تحقیق تأثیر سلول‌های گیاه عطرسنگ به‌عنوان محرک تولید بتاکربولین آلکالوئید گیاه اسپند (هارمین، هارمول و هارمالول) بررسی شده است (اصغری و همکاران، ۱۳۸۵). Lin و همکاران (۲۰۰۳) از این روش برای بهبود تولید داروهای ضدتوموری پودوفیلوتوکسین[3] از *coniferin* استفاده نمودند در این آزمایش کشت توأم ریشهٔ موئین *Linum fLavum* با سوسپانسیون سلولی *Podophyllum heyandrum* در فلاسک و بیورآکتور با هم مقایسه شدند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از کشت توأم در دو سیستم فوق، تولید پودوفیلوتوکسین در سلول‌های *P. Heyandrum* در فلاسک و بیورآکتور به ترتیب ۲۴۰ و ۷۲ درصد نسبت به کشت سلولی *P. Heyandrum* افزایش نشان داد. Luczkiewicz و همکاران (۲۰۰۵) از کشت همزمان ریشهٔ موئین و ساقهٔ گیاه *Genista tinctori*a تولید ۳۸ برابری از daidzin، نوعی ایزوفلاون، را تولید نمودند. در تحقیق دیگری استفاده از کشت توأم ریشهٔ موئین-ریشهٔ موئین حاصل از دو گونهٔ متفاوت *Linum Persicum* و *L. austviacum* جهت تولید پودوفیلوتوکسین و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین[4] موردِبررسی قرار گرفت. مقدار پودوفیلوتوکسین و متوکسی پودوفیلوتوکسین تولید شده به روش کروماتوگرافی گازی مایع اندازه‌گیری شد. نتایج در کشت توأم سلولی کاهش مقادیر از دو مادهٔ فوق و فاکتورهای رشد را نشان داد که ناشی از رقابت بین این دو در استفاده از مادهٔ جدید حاصل از بیوسنتز متابولیست‌ها بوده است. درحالی‌که در کشت *L. Persicum* سطح این دو مادهٔ پودوفیلوتوکسین و

[1] Shooty teratomas
[2] Hairy root
[3] Podophyllotoxin
[4] 6-methoxypodophyllotoxin

www.SID.ir

Archive of SID

متوکسی پودوفیلوتوکسین به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از کشت‌های دیگر بوده است (Mohagheghzadeh و همکاران، ۲۰۰۸). Baldi و همکاران (۲۰۰۸) از کشت توأم سلولی، گیاه *L. album* با قارچ مینوریزا برای تولید پودوفیلوتوکسین که داروی ضدسرطان می‌باشند استفاده نمودند نتایج این آزمایش رشد ۴ برابری پودوفیلوتوکسین به همراه افزایش ۲۰٪ بیوماس و ۸ برابر ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین را به همراه داشت. Wu و همکاران (۲۰۰۸) از کشت توأم سلولی ریشهٔ نابجای گیاهان ginseng و Echinacea که به نسبت‌های متفاوتی کشت داده شده بودند، برای تولید متابولیت های ثانویه مانند مشتقات اسیدکافئیک و تولید جین سنوسیدها در بیورآکتور جباب هوا استفاده نمودند. نتایج اثر منفی ریشه‌های نابجای Echinacea روی ریشهٔ نابجای ginseng را نشان داد علی‌رغم این اثر منفی آنها موفق شدند مشتقات اسیدکافئیک و تولید جین سنوسیدها را در کشت توأم ریشه نابجای ginseng و Echinacea در نسبت‌های ۱:۴ و ۲:۳ و به دنبال استفاده از عامل محرک‌زای متیل جاسمونات تولید جین سنوسیدها و مشتقات اسیدکافئیک را افزایش دادند.

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر همجواری سلول‌های گیاه زیرهٔ سیاه اروپایی بر میزان کومین آلدئید تولیدی توسط گیاه زیرهٔ سیاه کوهی در یک سیستم کشت سلولی تعلیقی توأم می‌باشد. در همین رابطه و باتوجه‌به عدم وجود سوابق پژوهشی در زمینهٔ جوانه‌زنی، القای کالوس و استقرار کشت سلولی در زیرهٔ سیاه اروپایی آزمایش‌هایی در این زمینه نیز انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ ریز نمونه

بذر زیرهٔ کوهی (کرمانی) و زیرهٔ اروپایی از مزرعهٔ تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. بذور به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند سپس با آب اتوکلاو شده آب‌کشی شدند.

جوانه‌زنی

فرایند جوانه‌زنی بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت ساده دارای ۰/۵ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار انجام شد. باتوجه‌به وجود سوابق پژوهشی در زمینهٔ جوانه‌زنی زیرهٔ سیاه کوهی در پژوهشکده علوم و صنایع غذایی شرایط محیطی برای فرایند جوانه‌زنی در زیرهٔ سیاه کوهی بر اساس نتایج آزمایش‌های گذشته به‌طور ثابت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد (زیارت‌نیا، ۱۳۷۹) ولی برای جوانه‌زنی زیرهٔ سیاه اروپایی، دو دمای ۲۵ درجه و ۴ درجه سانتی‌گراد موردِبررسی قرار گرفتند. شمارش بذرهای جوانه زده در هر هفته شمارش و رسم نمودار با استفاده از داده‌های تجمعی تا رسیدن به فاز پایدار در هر گیاه به‌طور جداگانه ادامه یافت. بذرهای جوانه زده به‌عنوان مواد اولیه به‌منظور القای کالوس مورد استفاده قرار گرفتند.

القای کالوس و استقرار کشت سلولی

جهت القای کالوس، بذرهای جوانه زده در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایهٔ موراشیگ و اسکوگ (MS) دارای ۳ درصد ساکارز و هورمون Kin به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ویتامین‌های MS کشت شدند و pH محیط کشت‌ها قبل از اتوکلاو شدن روی ۵/۸ تنظیم گردید و سپس ۰/۷ درصد آگار به آنها اضافه شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. نمونه‌ها پس از کشت در اتاقک رشد با دمای۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی دائم نگهداری شدند. نمونه‌های کشت شده پس از تقریباً ۷ تا ۱۰ روز شروع به تشکیل کالوس‌های شفافی کردند. از کشت قطعات بذرهای جوانه زده جهت استقرار در کشت مایع استفاده شدند.

بررسی تأثیر غلظت و نحوهٔ اتوکلاو نمودن ساکارز بر رشد سلولی زیرهٔ سیاه اروپایی

باتوجه‌به اینکه برخلاف زیرهٔ سیاه کوهی در رابطه با زیرهٔ سیاه اروپایی مطالعات در شرایط آزمایشگاهی[1] انجام نشده بود لذا در این مطالعه بر اساس نتایج

[1] In vitro

www.SID.ir

Archive of SID

حاصله در پژوهش‌های انجام شده در زیرهٔ سیاه کرمانی، برخی از آزمایش‌ها به‌طور خاص برای گیاه زیرهٔ سیاه اروپایی انجام شد در این آزمایش جهت تعیین اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر میزان رشد سلول‌های زیرهٔ اروپایی نسبت‌های مختلفی از ساکارز (۱٪، ۳٪ و ۶٪) به محیط کشت MS اضافه شدند. سپس به محیط‌های کشت MS فوق، کالوس با وزن مشخصی افزوده شد. در آزمایش دیگری جهت بررسی اثر شرایط اتوکلاو ساکارز بر رشد سلولی، ساکارز به صورت جداگانه از محیط کشت و آزمایشی دیگر همراه با محیط کشت اتوکلاو شد در ادامه کالوس با وزن مشخصی به محیط‌های کشت اضافه شده و سپس محیط‌ها در شرایط تاریکی دائم و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هر دو هفته تغییر وزن آنها موردِبررسی قرار گرفت. میزان رشد سلول‌ها تا هشت هفته بررسی و ثبت شدند.

کشت توأم سلولی

بر اساس نتایج مطالعات انجام شده در خصوص استفاده از کشت توأم سلولی در سیستم‌های مختلف، گرچه این مطالعات درزمینهٔ بررسی اثرات متقابل سلول–سلول گیاهی بسیار محدود می‌باشد، نسبت ترکیب شدن منابع مختلف سلولی درنتیجهٔ حاصله به‌عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر موردِتوجه قرار گرفته است و بر همین اساس اثر نسبت‌های مختلف ترکیب دو نوع سلول موردِبررسی قرار گرفته است. در این آزمایش با هدف بررسی اثر سیستم کشت توأم سلولی زیرهٔ اروپایی و زیرهٔ سیاه کوهی بر میزان کومین آلدئید تولیدی، نسبت‌های درصدی مختلفی از سلول‌های کشت تعلیقی زیرهٔ سیاه اروپایی با کشت تعلیقی زیرهٔ سیاه کوهی (۲۵:۷۵، ۱۰۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰) با یکدیگر مخلوط شدند (جدول ۱) به‌نحوی که هر ظرف در مجموع محتوی ۲ گرم سلول باشد و درنهایت به هر ظرف ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت جدید اضافه و به روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کامل منتقل شدند. نمونه‌گیری در هفته‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از زمان کشت انجام شد. پس از هموژنیزه کردن سلول و محیط کشت عصاره‌گیری به روش حلال انجام شد. این آزمایش در ۳ تکرار اجرا شد. اندازه‌گیری میزان کومین آلدئید در عصارهٔ حاصله با کروماتوگرافی گازی انجام شد.

جدول ۱- نحوهٔ ترکیب درصدهای مختلف سلول‌های زیرهٔ سیاه کوهی (*Bunim persicum*) و زیرهٔ سیاه اروپایی (*Carum*)

کد	درصد ترکیب سلولی دو گیاه در کشت توأم
A	*B. persicum* (۱۰۰) : *C. carvi* (۰)
B	*B. persicum* (۲۵) : *C. carvi* (۷۵)
C	*B. persicum* (۵۰) : *C. carvi* (۵۰)
D	*B. persicum* (۷۵) : *C. carvi* (۲۵)

روش عصاره‌گیری و اندازه‌گیری ترکیبات

در زمان نمونه‌گیری به هر نمونه ظرف کشت سلولی ۲۰ میلی‌لیتر اتیل استات اضافه شد و دو ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه در شرایط تاریکی دائم و دمای۱ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جهت ایجاد یکنواختی و نیز شکستن دیوارهٔ سلولی به هدف استخراج بهتر ترکیبات از امواج فراصوت به مدت یک دقیقه استفاده شد. جهت جداسازی بهتر فازهای آلی و آبی و نیز بقایای دیوارهٔ سلولی، نمونه‌ها با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند سپس یک میلی‌لیتر از عصارهٔ فوق جهت آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و بقیه جهت حذف حلال و تهیهٔ عصاره در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط روتاری مورد استفاده قرار گرفتند. درنهایت وزن عصارهٔ تعیین شده و جهت سنجش میزان کومین آلدئید توسط GC در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای بررسی ترکیبات موجود در سلول‌ها از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با پوشش سیلیکاژ 60F254 استفاده گردید. همچنین به‌منظور بررسی غلظت کومین آلدئید موجود در سلول‌های کشت سلولی تعلیقی و مقایسهٔ آنها با نمونهٔ شاهد (بذر) از روش استخراج حلال استفاده شد، سپس نمونه‌ها با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل 17A شرکت Shimadzo مورد آنالیز قرار گرفتند. خصوصیات ستون GC مورد استفاده، سیلیکای موئین با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲ میلی‌متر و فاز ساکن پلی دی متیل سایل اکسان، ضخامت لایه ۰/۲ میکرومتر و شرایط آزمایش شامل برنامهٔ دمایی سه درجه سلسیوس در

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه (از دمای ۷۰ تا۲۲۰ درجه سلسیوس) دمای محفظهٔ تزریق ۲۷۵ درجه سلسیوس، گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۲۰ میلی‌لیتر در دقیقه بود. دمای آشکارساز بر روی ۲۸۵ درجه سانتی‌گراد آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای نسبت شکاف یک به سی بود، آنالیز ۵۰ دقیقه و مقدار تزریقی برای تمام نمونه‌ها حدود ۰/۵ میکرولیتر بود.

تجزیهٔ آماری

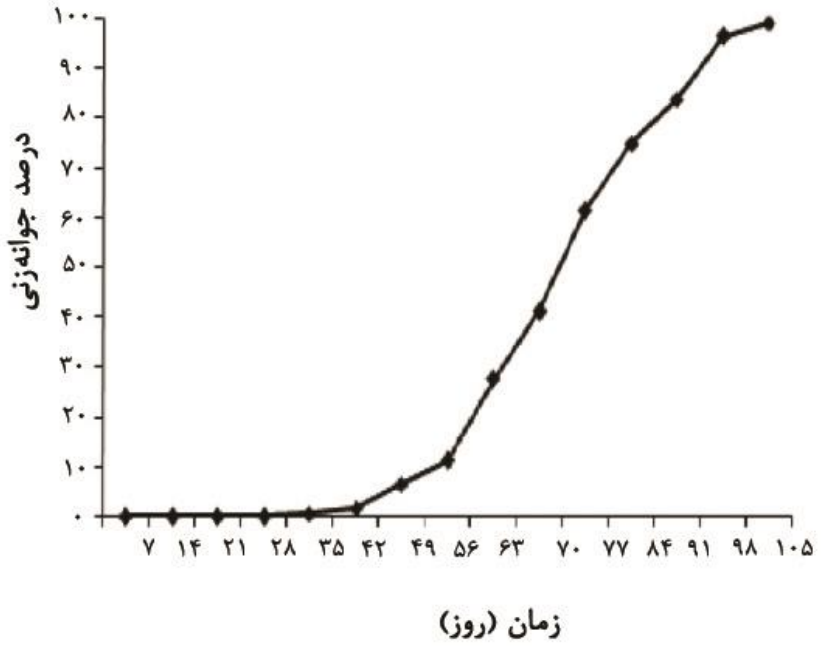
پس از یاداشت‌برداری و اندازه‌گیری صفات، در آزمایش اول وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای دمایی مختلف با استفاده از آزمون T.test به کمک نرم‌افزار SPSS انجام شد. همچنین تجزیهٔ واریانس داده‌ها برای آزمایش غلظت‌های متفاوت ساکارز بر اساس طرح اسپلیت پلات در زمان در قالب آزمایش فاکتوریل با سه تکرار انجام گرفت و سپس مقایسهٔ میانگین تیمارها با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی

زیرهٔ سیاه کوهی

بذر زیرهٔ سیاه کوهی دارای خفتگی است و سرما باعث شکستن دورهٔ خفتگی آن می‌شود (شریفی و پوراسماعیل، ۱۳۸۲) به‌منظور تعیین روند جوانه‌زنی بذرها، ۲۵۰ عدد بذر کشت شده در محیط سادهٔ جوانه‌زنی به مدت ۱۵ هفته در دمای محیط بررسی شدند (شکل ۲).



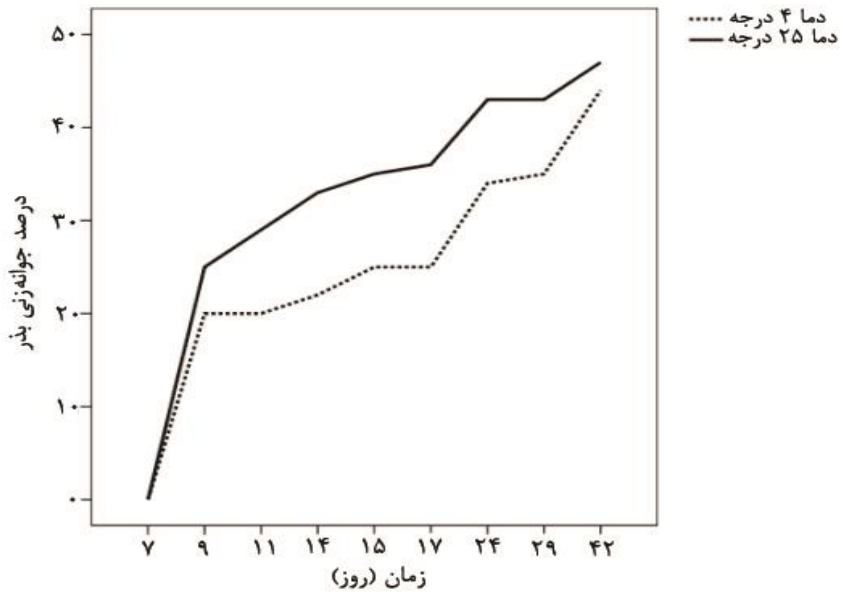
شکل ۲- روند افزایش درصد جوانه‌زنی بذر زیرهٔ سیاه (*Bunim persicum*) در محیط کشت ساده در طی ۱۰۵ روز.

زیرهٔ اروپایی

به‌منظور مقایسهٔ عملکرد جوانه‌زنی بذرهای زیرهٔ اروپایی، این فرایند در دو دمای مختلف انجام و نتیجه با استفاده از آزمون T.test مقایسه شد. در این آزمون فرض برابری واریانس‌ها بر اساس آزمون لوین Levene برقرار بود. در نتایج آزمون T.test نشان داد اختلاف معنی‌داری بین دوگروه جوانه‌زنی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دمای محیط ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد وجود ندارد براین‌اساس دمای محیط مبنای جوانه‌زنی بذر این گیاه قرار گرفت (شکل ۳).

www.SID.ir

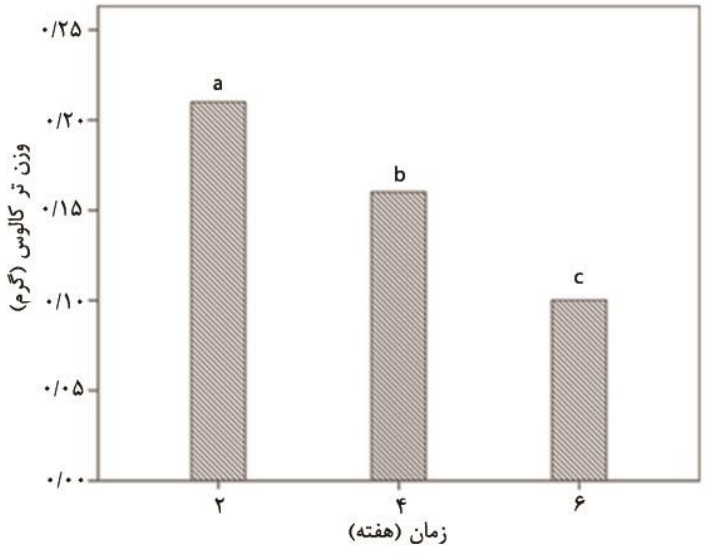
Archive of SID



شکل ۳- روند افزایش درصد جوانه‌زنی بذر زیرهٔ اروپایی (*Carum carvi*) در محیط کشت ساده در دو دمای ۴ درجه و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۵۰ روز.

بررسی غلظت‌های مختلف و نحوهٔ اتوکلاو ساکارز بر رشد کالوس زیرهٔ سیاه اروپایی

در این آزمایش تفاوت معنی‌داری در وزن ترِ کالوس‌های حاصل از غلظت‌های مختلف ساکارز مشاهده نشد. درحالی‌که بین زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. اثر ساکارز بر افزایش بیوماس سلولی در گیاهان مختلف بسیار متفاوت گزارش شده است به‌طوری‌که در برخی منابع ۳ درصد ساکارز در برخی درصدهای بیشتر را به‌عنوان غلظت مطلوب برای افزایش زیست تودهٔ سلولی عنوان نموده‌اند (شکل ۴). به‌طور مثال در گزارش Zhang و همکاران (۲۰۰۷) بیشترین مقدار وزن ترِ کالوس در کشت سلولی *Hyoscyamus muticus* در غلظت ۳ درصد ساکارز در محیط کشت MS به دست آمد. درحالی‌که Goleniowski و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کردند که ساکارز ۶ درصد، مطلوب‌ترین رشد کالوس را در *Ambrosia tenuifolia* فراهم آورد.



شکل ۴- مقایسهٔ میانگین وزن ترِ کالوس زیرهٔ اروپایی (*Carum carvi*) در غلظت‌های مختلف ساکارز در هفته‌های مختلف.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی مقدار کومین آلدئید در کشت توأم سلولی زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی

نتایج مربوط به بررسی میزان کومین آلدئید در عصارهٔ حاصل از ترکیب محیط کشت و سلول در سیستم کشت توأم سلولی زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی در نسبت درصدهای مختلف (۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۷۵:۲۵، ۱۰۰:۰) در طول هفت هفته در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشان می دهد که پس از یک هفته غلظت کومین آلدئید در ترکیب D (زیرهٔ سیاه کوهی ۷۵ درصد و زیرهٔ سیاه اروپایی ۲۵ درصد) دو برابر بیشتر از سایر ترکیبات است (شکل ۵). درحالی‌که در هفتهٔ سوم تمام ترکیبات باستثنای ترکیب D که روند کاهشی دارد سایر موارد از روند روبه‌رشدی در تولید کومین آلدئید برخوردار هستند. البته این روند افزایشی برای همهٔ ترکیبات تا هفتهٔ پنجم تداوم یافته به جزء ترکیب C که افزایش کومین آلدئید در آن بسیار کند می‌باشد. ترکیب C را می‌توان به‌عنوان یکی از نتایج جالب توجه در این آزمایش عنوان نمود زیرا ترکیب یکسان دو نوع سلول برخلاف ترکیب‌های غیریکسان، نه‌تنها اثرات هم‌افزایی نداشته بلکه بر یکدیگر اثر کاهنده داشته‌اند به‌نحوی که در هفتهٔ پنجم که تمام ترکیبات دارای جهش افزایشی در تولید کومین آلدئید بودند این ترکیب از کمترین افزایش برخوردار است. Mohagheghzadeh و همکاران (۲۰۰۸) استفاده از کشت توأم ریشهٔ موئین-ـریشهٔ موئین حاصل از دو گونهٔ متفاوت *L. persicum* و *L. austviacum* تولید پودوفیلوتوکسین و متوکسی پودوفیلوتوکسین را موردِبررسی قرار دادند. پس از ۶۰ روز کشت توأم، نتایج کاهش مقادیر هر دو لیگنان فوق و نیز شاخص‌های رشد را نشان داد. از نقاط مشترک در تمام ترکیبات این است که از هفتهٔ پنجم همراه با گذر زمان میزان کومین آلدئید در نمونه‌های سلولی کاهش شدیدی می‌یابد. این افت شدید در تولید متابولیت ثانویهٔ را می‌توان به عوامل متعددی نسبت داد ازجمله افزایش ترکیبات می‌تواند اثرات سمی و کشنده برای سلول را فراهم کند جهت جلوگیری از مرگ سلول آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ فعال شده و از طرفی سیگنال‌های توقف تولید به آنزیم‌های بالا دستی ارسال می‌گردد تا در مجموع با کاهش میزان ترکیبات از اثرات سمی متابولیت‌های ثانویه کاسته شده و حیات سلول‌ها کمتر در معرض خطر قرار بگیرند. در مجموع بالاترین میزان کومین آلدئید در ترکیب B کشت توأم سلولی زیرهٔ سیاه (زیرهٔ سیاه کوهی ۲۵ درصد و زیرهٔ سیاه اروپایی ۷۵ درصد) مشاهده شد. ازآنجاکه گزارش‌های کشت توأم سلول-سلول گیاهی محدودی در خصوص تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد، لذا مقایسهٔ نتایج و بحث درموردِ وجود اختلاف در نتایج چندان قابل انجام نیست اما بر اساس گزارش‌های موجود یکی از عواملی که در تولید ترکیبات دارویی در کشت توأم تأثیر قابلِ‌توجهی دارد اثر نسبت‌های مختلف ترکیب دو اورگانیسم می‌باشد. در مطالعهٔ اخیر نسبت ۳ به ۱ (ترکیب B) سلول‌های زیرهٔ سیاه اروپایی و ایرانی و پس از پنج هفته به حداکثر تولید مادهٔ مؤثرهٔ موردِنظر رسید درحالی‌که این نسبت در گزارش اصغری و همکاران (۱۳۸۵) که تأثیر کشت توأم سلول‌های گیاه عطرسنگ و گیاه اسپند جهت تحریک تولید بتاکربولین آلکالوئید (هارمین، هارمول و هارمالول) موردِبررسی قرار گرفته بود تمام ترکیب نسبت‌ها در طول دورهٔ آزمایش نسبت به شاهد (سوسپانسیون سلولی اسپند) آلکالوئیدهای هارمین، هارمول و هارمالول بیشتری تولید کردند درحالی‌که بالاترین میزان ترکیبات مؤثرهٔ فوق در نسبت ۱:۱ به دست آمد به‌نحوی که این برتری بر سایر ترکیبات در طول دورهٔ آزمایش و برای همهٔ انواع مواد مؤثره پایدار ماند. در مطالعهٔ دیگری که توسط Sidwa-Gorycka و همکاران (۲۰۰۳) دررابطه‌با اثر کشت توأم ریشهٔ موئین *A. majus* و سلول‌های حاصل از کشت سلولی *R. graveolens* در نسبت‌های مختلف (۱:۶، ۱:۴، ۱:۲، ۲:۱، ۴:۱ و ۶:۱) و نیز کشت توأم ریشهٔ موئین *A. majus* با ساقهٔ *R. graveolens* در نسبت ۱:۵ و ۱:۱۰ با هدف تعیین اثر نسبت ترکیبات مختلف کشت توأم اندام‌های مختلف این دو گیاه بر شاخص رشد ریشهٔ موئین در ترکیب اول و تولید فوناروکومارین‌ها در ترکیب دوم انجام شد. نتایج ترکیب اول کاهش شاخص رشد ۴۰ برابری نسبت ۶:۱ ریشهٔ موئین *A. majus* به ساقهٔ *R. graveolens* در مقابل نسبت ۱:۶ را نشان داد درحالی‌که سطوح پایینی از

www.SID.ir

Archive of SID

فوناروکومارین‌ها تولید نمود. ترکیب دوم سیستم کشت توأم در مواد مؤثره اثرات افزایشی ایجاد نکرد و اختلافات مشاهده شده بیشتر تحت تأثیر شرایط محیطی (تاریکی یا روشنایی) کشت بودند. در مجموع این محققین نتیجه گرفتند کشت توأم این دو گیاه برای افزایش نرخ رشد ریشهٔ موئین مناسب است. همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، اثرات منفی ساقه و سلول *R. graveolens* بر ریشهٔ موئین *A. majus* در کشت توأم به ترکیبات سمی است که توسط اندام‌های گیاه *R. graveolens* تولید و در محیط کشت توأم آزاد می‌شود، نسبت دادند. درحالی‌که در نتایج مطالعهٔ حاضر در کلیهٔ نسبت‌های ترکیب دو سلول اثرات روند افزایشی در میزان کومین آلدئید مشاهده می‌شود و اختلافات بین آنها مربوط به تفاوت در نسبت‌ها می‌باشند. در همین راستا Wu و همکاران (۲۰۰۸) برای رفع اثر منفی ریشهٔ نابجای اکیناسه رشد ریشه‌های جینسنگ در کشت توأم این دو گیاه را ناشی از انتخاب نسبت ترکیب دانستند و نتیجه‌گیری نمودند که برای تولید مواد مؤثره، جینوسایدها، باید در نسبت‌های ترکیبی از ریشهٔ جینسنگ بیشتری نسبت به اکیناسه (۲:۳ یا ۴:۱) استفاده نمود.

میزان اسانس بذر زیرهٔ سیاه کرمانی (۴-۷٪، Thappa و همکاران، ۱۹۹۱، طاهرخوانی و همکاران، ۱۳۹۴) بیش از سایر گیاهان خانوادهٔ زیره (۱-۶٪ برای *C. carvi*، Sedláková و همکاران، ۲۰۰۳ و ۱-۴٪ برای *Cuminum cyminum*، Mohammadpour و همکاران، ۲۰۱۲ و Li و Jiang ۲۰۰۴) گزارش شده است. از طرف دیگر بیشترین میزان کومین آلدئید گزارش شده در میان اسانس‌های گیاه زیره مربوط به زیرهٔ سیاه ایرانی (۴۰/۷٪) است (Baser و همکاران، ۱۹۹۷). بر همین اساس انتظار می‌رفت عصارهٔ حاصل از کشت سلولی زیرهٔ سیاه ایرانی (ترکیب A) در مقایسه با کشت توأم آن با زیرهٔ اروپایی محتوی بیشترین میزان کومین آلدئید باشد درحالی‌که نتایج این آزمایش نشان می‌دهد برخلاف آنچه انتظار می‌رفت در ترکیب B با اختلاف قابلِ‌توجهی تولید کومین آلدئید افزایش یافته بود. این افزایش را می‌توان به اثرات هم‌افزایی کشت توأم دو نوع سلول در کنار یکدیگر بیان نمود. اثرات هم‌افزایی در کشت توأم اورگانیسم‌های مختلف در گزارش‌های متعددی ارائه شده است به‌عنوان مثال Subroto و همکاران (۱۹۹۶) در کشت توأم غده‌های ساقه‌ای و ریشهٔ موئین *Atropa belladna* میزان ذخیرهٔ اسکوپولامین در ساقه‌ها ۰/۸۴ میلی‌گرم بر گرم مادهٔ خشک بود یعنی ۱۱-۳ برابر آنچه در برگ گیاه کامل ذخیره می‌شود. همچنین نسبت هیوسیامین به اسکوپولامین در کشت توأم در دامنه‌ای بین ۰/۷ تا ۱/۹ افزایش یافت درحالی‌که این نسبت در ریشهٔ موئین به تنهایی ۰/۰۳-۰ متغیر بود. در پژوهش دیگری که توسط Luczkiewicz و همکاران (۲۰۰۵) کشت توأم ساقه و ریشهٔ موئین *Genista tinctoria* با هدف افزایش تولید *daidzin* و *daidzein*، ایزوفلاونون‌ها، انجام دادند. در این نوع کشت ریشهٔ موئین تولید یک ایزوفلاونون منفرد، ایزولیکویری تیجنین[1]، نوعی پیش ماده برای *daidzein*، در گیاه اصلی وجود ندارد، تولید می‌کند. با افزودن اسید سالیسیلیک به محیط کشت تقریباً تمامی ایزولیکویری تیجنین به محیط کشت آزاد شده و مورد استفاده ساقه‌ها قرار می‌گیرد. این فرایند منجر به افزایش معنی‌دار در تولید *daidzin* به میزان ۳۸ برابر آنچه در گیاه اصلی تولید شده می‌باشد. در آزمایشی که Baldi و همکاران (۲۰۰۸) کشت توأم سلول‌های گیاهی *L. album* و قارچ‌های شبه میکوریزای *P. indica* و *S. vermifera* جهت افزایش تولید پدوفیلوتوکسین انجام شده بود اثرات هم‌افزایی این دو اورگانیسم سبب افزایش پدوفیلوتوکسین و ۶-متوکسی پدوفیلوتوکسین به ترتیب ۴ و ۸ برابر بود به‌علاوه که تودهٔ سلولی نیز به میزان ۲۰٪ افزایش نشان داد. علت این هم‌افزایی استفاده از کشت زندهٔ قارچ به مدت طولانی، ۲۴ ساعت، در جوار سلول‌های گیاهی بیان شد که سبب تحریک سیستم دفاعی و آزادسازی مولکول‌های سیگنالی مسئول تولید ترکیبات دفاعی مانند پدوفیلوتوکسین می‌گردد. این محققین این دلیل را ازطریقِ بیان افزایش یافتهٔ آنزیم که در کشت توأم اتفاق افتاده بود مورد تأکید قرار دادند. Li و همکاران (۲۰۰۹) نیز در کشت توأم

[1] Isoliquiritigenin

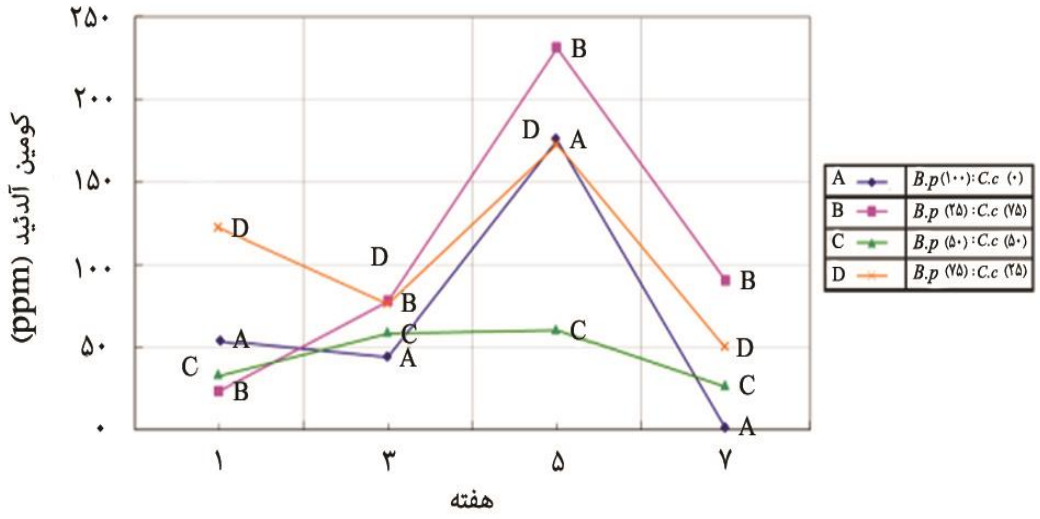
www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون سلولی *Taxus chinensis* واریته *mairei* موفق شدند پاکلیتاکسل را در بیورآکتور به میزان ۲۵/۶۳ میلی‌گرم بر گرم مادهٔ خشک در طی ۱۵ روز تولید کنند این مقدار معادل ۳۸ برابر تولید در کشت انفرادی می‌باشد.

جدول۲- نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی در کشت توأم سلولی اروپایی (*Carum carvi*) و زیرهٔ سیاه کوهی (*Bunim persicum*)

نام نمونه‌ها (٪)	هفته	ناحیه	غلظت کومین آلدئید (*ppm*)	میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم
B. p (۱۰۰) : *C. c* (۰)	۱	۳۹۷۶	۵۳/۹	۵/۴
B. p (۲۵) : *C. c* (۷۵)	۱	۱۶۸۹	۲۳/۳	۲/۳
B. p (۵۰) : *C. c* (۵۰)	۱	۲۳۹۸	۳۲/۸	۳/۳
B. p (۷۵) : *C. c* (۲۵)	۱	۹۰۷۲	۱۲۲/۱	۱۲/۲
B. p (۱۰۰) : *C. c* (۰)	۳	۳۲۱۵	۴۳/۷	۴/۴
B. p (۲۵) : *C. c* (۷۵)	۳	۵۷۵۱	۷۷/۷	۷/۸
B. p (۵۰) : *C. c* (۵۰)	۳	۴۳۱۵	۵۸/۴	۵/۸
B. p (۷۵) : *C. c* (۲۵)	۳	۵۶۳۴	۷۶/۱	۷/۶
B. p (۱۰۰) : *C. c* (۰)	۵	۱۳۰۶۳	۱۷۵/۵	۱۷/۵
B. p (۲۵) : *C. c* (۷۵)	۵	۱۷۲۱۹	۲۳۱/۱	۲۳/۱
B. p (۵۰) : *C. c* (۵۰)	۵	۴۴۳۲	۶۰	۶
B. p (۷۵) : *C. c* (۲۵)	۵	۱۲۸۵۰/۶	۱۷۲/۷	۱۷/۳
B. p (۱۰۰) : *C. c* (۰)	۷	۰	۰/۷	۰/۱
B. p (۲۵) : *C. c* (۷۵)	۷	۶۶۸۸	۹۰/۲	۹
B. p (۵۰) : *C. c* (۵۰)	۷	۱۸۵۱	۲۶/۱	۲/۶
B. p (۷۵) : *C. c* (۲۵)	۷	۳۶۵۰	۴۹/۵	۵



شکل ۵- نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی در کشت توأم سلولی زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی در هفته‌های متفاوت که حروف انگلیسی نشان‌دهندهٔ نسبت ترکیب درصدها طبق جدول ۲ می‌باشد.

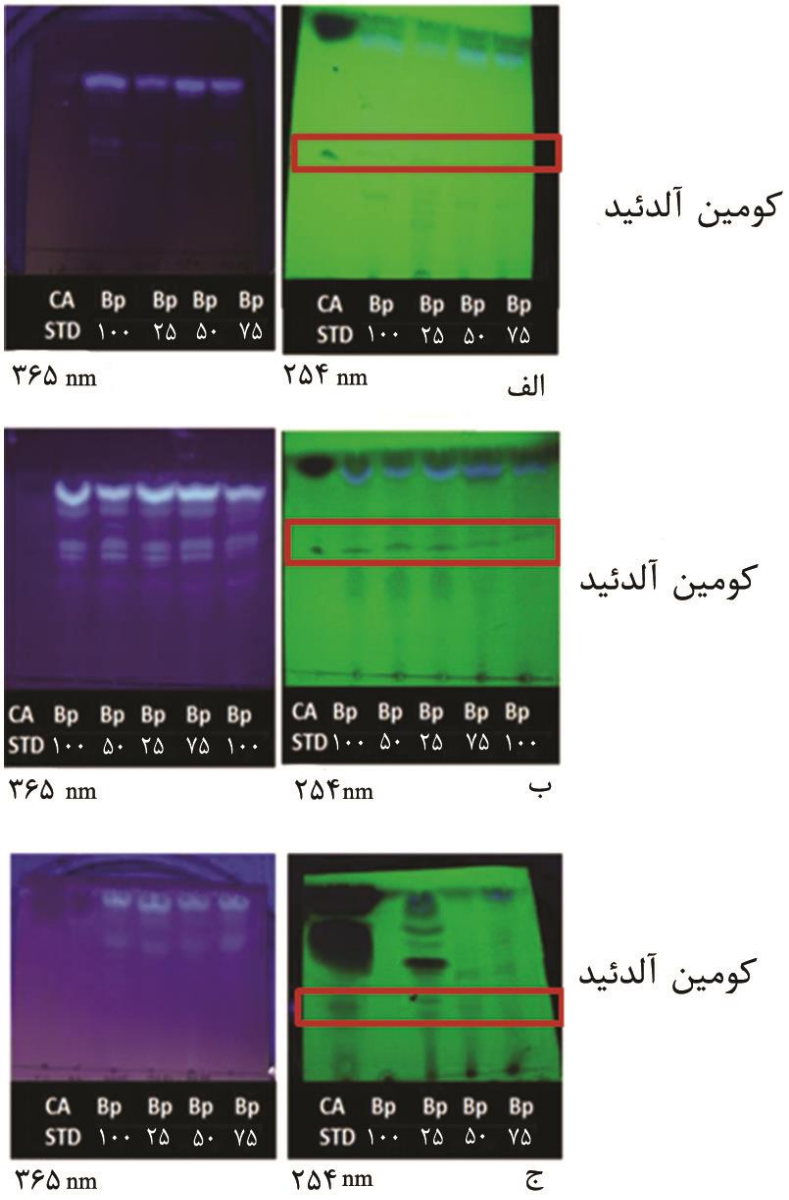
www.SID.ir

Archive of SID

مقایسهٔ مقدار کومین آلدئید در عصارهٔ سلولی و بذر زیرهٔ سیاه اروپایی به روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC)

لایهٔ نازک (TLC) با پوشش سیلیکاژ 60F254 استفاده گردید. همچنین به‌منظورِ بررسی غلظت کومین آلدئید موجود در سلول‌های کشت سلولی تعلیقی و مقایسهٔ آنها با نمونهٔ شاهد (بذر) از روش استخراج بر اساس نتایج حاصل از جداسازی ترکیبات موجود در کشت توأم عصارهٔ سلولی زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی به روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک (TLC) همان طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود.

در کشت همزمان زیرهٔ سیاه کوهی ۲۵ درصد و زیرهٔ سیاه اروپایی ۷۵ درصد میزان تولید ترکیب کومین آلدئید در هفتهٔ پنجم بیشتر از سایر نسبت درصدها می‌باشد که نتایج به‌دست‌آمده با نتایج کروماتوگرافی گازی مطابقت دارد.



شکل ۶ – ترکیبات حاصل از عصاره‌های کشت توأم سلولی زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی. الف: هفتهٔ اول، ب: هفتهٔ سوم، ج: هفتهٔ پنجم.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ساکارز با غلظت ۳ درصد در محیط کشت MS مایع در هفتهٔ دوم ۰/۲۲۳ گرم بیشترین میانگین رشد سلولی را در زیرهٔ سیاه اروپایی به‌دست‌آورده است. در بررسی نتایج مربوط به کشت توأم سلول زیرهٔ سیاه کوهی و سلول زیرهٔ سیاه اروپایی مشخص شد که زمان و نیز نوع ترکیب سلولی دو گیاه زیرهٔ سیاه در تولید کومین آلدئید به‌عنوان یکی از مواد مؤثرهٔ مهم در اسانس این گیاهان نقش اساسی دارند. بر اساس نتایج حاصله در این آزمایش اختلاف اثر کشت توأم سلولی دو گیاه در هفته‌های اول کم بوده ولی به تدریج اختلافات بروز کرده و در هفتهٔ پنجم به اوج خود می‌رسد. همچنین نتایج نشان داد که در ترکیب دو سلول مختلف اثرات هم‌افزایی برای تولید کومین آلدئید وجود دارد البته بسته به نوع ترکیب این اثرات متفاوت می‌باشند. کشت توأم سلولی می‌تواند باعث افزایش میزان تولید کومین آلدئید حتی بیش از زیرهٔ سیاه کرمانی به تنهایی باشد که در شرایط طبیعی دارای سطح تولید حداکثری این ماده است. البته اثر هم‌افزایی در کشت توأم سلولی دارای حدی می‌باشد و در صورت تداوم کشت می‌تواند سبب کاهش مادهٔ مؤثره گردد.

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که کشت همزمان دو گیاه زیرهٔ سیاه کوهی و زیرهٔ سیاه اروپایی باعث افزایش تولید کومین آلدئید می‌شود و بهترین ترکیب برای کشت همزمان دو گیاه زیرهٔ سیاه کوهی و گیاه زیرهٔ سیاه اروپایی ترکیب B می‌باشد و بهترین زمان رسیدن به تولید حداکثری هفتهٔ پنجم می‌باشد.

منابع

۱- اصغری، غ.، قنادی، ع. و همتیان، س. ۱۳۸۵. تولید بتاکربولین آلکالوئیدها در کشت سوسپانسیون سلولی مخلوط دو گیاه اسپند و عطرسنگ. مجله پزشکی هرمزگان، ۱۰(۲):۱۳۷-۱۴۳.

۲- خسروی، م. ۱۳۸۴، دیدگاه‌های اگرواکولوژی و اقتصادی کشت مخلوط زیرهٔ سیاه با زعفران و گیاهان یکساله. پایان‌نامه دورهٔ دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- زیارت‌نیا، س.م. ۱۳۷۹. جنین‌زایی زیرهٔ سیاه (*Bunium persicum*). گزارش نهایی طرح پژوهشی، سازمان پژوهشی علمی و صنعتی ایران، مرکز خراسان.

۴- شریفی، م. و پوراسماعیل، م. ۱۳۸۲. بررسی اثر برخی ترکیبات شیمیایی بر رفع خفتگی و القای جوانه‌زنی در دانهٔ زیرهٔ سیاه [*Bunium Persicum* (Boiss.) Fedtsch.]. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۰(۲):۳۳-۴۱.

۵- طاهرخانی، پ.، نوری، ن.، آخوندزاده‌بستی، ا.، گندمی‌نصرآبادی، ح. و علی‌محمدی، م. ۱۳۹۴. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس زیرهٔ سیاه کرمانی(*Bunium persicum* Bioss.) در سامانهٔ پنیر گودا. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی، ۵۴(۲):۷۶-۸۵.

۶- قهرمان، ا. ۱۳۷۲. فلور رنگی ایران. جلد دوم، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۱۴۰۵ صفحه.

۷- کوهستانی، س.، رنجبر، غ.، باقی‌زاده، الف. و بابایان‌جلودار، ن. ۱۳۸۶. مقایسه کمی و کیفی ترکیب‌های شیمیایی اسانس *Bunium persicum* (Boiss) در سه رویشگاه مختلف. دومین همایش ملی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، ۹-۱۰ بهمن ماه، کرمان.

۸- مقتدر، م.، ایرج‌منصوری، ع.، سالاری، ح. و فرهمند، الف. ۱۳۸۸. شناسایی ترکیب‌های شیمیایی و بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس بذر زیره (*Bunium persicum* Boiss.). فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵(۱):۲۰-۲۸.

9- Baldi, A., Jain, A., Gupta, N., Srivastava, A.K., & Bisaria, V.S. 2008. Co-culture of arbuscular mycorrhiza-like fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) with plant cell of *Linum album* for enhanced production of podophyllotoxins: a first report. Biotechnology Letter, 30(9):1671-1677.

www.SID.ir

Archive of SID

10- Baser, K.H.C., Özek, T., Abduganiev, B.E, Abdullaev, U.A., & Aripov, K.N. 1997. Composition of the essential oil of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. From Tajikistan. Journal of Essential Oil Research, 9(5):597-598.

11- Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K.M. 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. Journal of the Royal Society Interface, 11(96):1-13.

12- Goleniowski, M.E., Silva, G.L., & Trippi, V.S. 1990. Sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. Phytochemistry, 29(9):2889-2891.

13- Li, R., & Jiang, Z.T. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. Flavour and Fragrance Journal, 19(4):311-313.

14- Li, Y.C., Tao, W.Y., & Cheng, L. 2009. Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology, 83(2):233-239.

15- Lin, H.W., Kowk, K.H., & Doran, P.M. 2003. Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions. Biotechnology progress, 19(5):1417-1426.

16- Luczkiewicz, M., & Koktkiewicz, A. 2005. Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. Plant science, 169(5):862-871.

17- Mahony, O.R., Al-Khtheeri, H., Weerasekera, D., Fernando, N., Vaira, D., Holton, J., & Basset, C. 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. World Journal of Gastroenterology, 11(47):7499-7507.

18- Mohagheghzadeh, A., Gholami, A., Hemmati, S., & Dehshahri, S. 2008. Bag culture: a method for root-root co-culture. Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences, 63(1-2):157-160.

19- Mohammadpour, H., Moghimipour, E., Rasooli, I., Fakoor, M.H., Alipoor Astaneh, S., Shehni Moosaie, S., & Jalili, Z. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil from Alborz Mountain against *Aspergillus* species. Jundishapur Journal of Natural Pharmacetical Products, 7(2):50-55.

20- Nitoda, T., Fan, M.D., & Kubo, I. 2008. Effects of cuminaldehyde on melanoma cells. Phytotherapy Research, 22(6):809-813.

21- Salehi, P., Mohammadi, F., & Asghari, B. 2008. Seed essential oil analysis of *Bunium persicum* by hydrodistillation-headspace solvent microextraction. Chemistry of Natural Compounds, 44(1):111-113.

22- Sedláková, J., Kocourková, B., Lojková, L., & Kubáň, V. 2003. The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L). Horticultural Science (HORTSCI) (HORTIC SCI), 30(2):73–79.

23- Sidwa-Gorycka, M., Królicka, A., Kozyra, M., Głowniak, K., Bourgaud, F., & Łojkowska, E. 2003. Establishment of a co-culture of *Ammi majus* L. and *Ruta graveolens* L. for the synthesis of furanocoumarins. Plant Science, 165(6):1315-1319.

24- Subroto, M.A., Kwok, K.H., Hamill, J.D., & Doran, P.M. 1996. Co-culture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. Biotechnology and Bioengineering, 49(5):481-494.

25- Thappa, R.K., Ghosh, S., Agarwal, S.G., Raina, A.K., & Jamwal, P.S. 1991. Comparative studies on the major volatiles of kalazira (*Bunium persicum* seed) of wild and cultivated sources. Food Chemistry, 41(2):129–134.

26- Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J., & Paek, K.Y. 2008. Establishment of adventitious root co-culture of ginseng and echinacea for the production of secondary metabolites. Acta Physiological Plantarum, 30(6):891-896.

27- Zhang, L., Yang, B., Lu, B., Kai, G., Wang, Z., Xia, Y., Ding, R., Zhang, H., Sun, X., Chen, W., & Tang, K. 2007. Tropane alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus Niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. Plantarum, 225(4):887-896.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Cuminaldehyde Production as an Odorant via Co-culture of Black Zira (*Bunium persicum* Boiss.) and Caraway (*Carum carvi* L.) Cells

Maryam Ghayoor Kazemi[1], Seyed Mahdi Ziaratnia[2*], Majid Rajabian[3]

1- Master of Biochemistry, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
* Corresponding author (m.ziaratnia@rifst.ac.ir)
3- Assistant Professor Department of Biochemistry, Payam Noor University, Mashhad, Iran

Abstract

To stimulate the production of Cumin aldehyde as an odorant with application in food sciences via co-cultures of cells, two medicinal plants, *Bunium persicum* and *Carum carvi*, were chosen. The cell cultures of both plants were established separately. In this study some basic experiments were also done due to the fact that no research reports were found on *C. carvi* in case of seed germination, callus induction and establishment of cell suspension cultures. The cells of *B. persicum* and *C. carvi* were combined together in different ratios (100:0, 25:75, 50:50 and 75:25) to study their interaction on cumin aldehyde production in a co-culture system. For Gas chromatography (GC) analysis of cumin aldehyde, the cells and medium were homogenized and then extracted with ethyle acetate at room temperature and then analyzed by GC. The results revealed that in contrast to black zira for seed germination process, Caravie seeds do not need chilling. It has also been found that sucrose at the level of 3% is suitable for increasing the biomass of Caravie cells in MS medium. The results of co-culture of *B. persicum* and *C. carvi* cells demonstrated that at the combination of *B. persicum* (25%) and *C. carvi* (75%) the production of cumin aldehyde could be increased to the level of 23.1 mg/100 g extract after five weeks which is higher than *B. persicum* (100%) at similar period with 17.5 mg/100 g extract. It is also found that the production of cumin aldehyde has an increasing trend till 5th week and then decreased to the minimum level in the 7th week.

Keywords: *Bunium Persicum*, *Carum carvi*, cell suspension culture, cumin aldehyde, co-culture

www.SID.ir