

باززایی زیره پارسی (*Bunium persicum* Boiss.) با استفاده از ریزنمونه جنین برش خورده

Regeneration of Plantlets from Fragmented Embryo Explant of Parsi Zira (*Bunium persicum* Boiss.)

محمود ولی زاده^۱، عباس صفر نژاد^۲، قربانعلی نعمت زاده^۳، سید کمال کاظمی تبار^۳، و
حسن حمیدی^۲

- ۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه مازندران، ساری
- ۲- به ترتیب استادیار و کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد
- ۳- به ترتیب دانشیار و استادیار، مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه مازندران، ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۹/۲۹

چکیده

ولی زاده، م.، صفر نژاد، ع.، نعمت زاده، ق.، کاظمی تبار، س. ک. و حمیدی، ح. ۱۳۸۷. باززایی زیره پارسی (*Bunium persicum* Boiss.) با استفاده از ریزنمونه جنین برش خورده. نهال و بذر ۲۴: ۳۸۹-۳۹۷.

زیره پارسی (*Bunium persicum* Boiss.) که به آن زیره سیاه یا زیره کوهی نیز گفته می شود، یکی از مهم ترین گیاهان دارویی است و ارزش اقتصادی بالایی دارد. به طور کلی اطلاعات محدودی در ارتباط با کشت درون شیشه ای زیره پارسی وجود دارد. در این تحقیق برای اولین بار از ریزنمونه جنین برش خورده برای باززایی زیره پارسی استفاده شد. در این روش به دلیل جوان بودن ریزنمونه و عکس العمل مناسب به محیط کشت، کالوس دهی و باززایی به میزان نسبتاً بالایی فقط در یک نوع محیط کشت و بدون نیاز به هیچگونه واکنشی انجام شد که منجر به کوتاه شدن زمان کشت بافت و کم شدن آلودگی و نیاز به مواد مصرفی شد. همچنین، محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف هورمون های NAA (نفثالین استیک اسید) و 2,4-D به تنهایی یا همراه با Kin (کینتین) مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تیمار مختلف و ده تکرار در هر تیمار انجام شد. در تعدادی از تیمارهای فاقد کینتین نیز باززایی انجام شد که نشان داد، برای باززایی زیره پارسی وجود هورمون سیتوکینین الزامی نیست. بهترین تیمار از نظر میانگین تعداد ساقه باززایی شده، تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر Kin بود. بهترین تیمار از نظر القاء جنین سوماتیکی تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin بود.

واژه های کلیدی: زیره پارسی یا زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.)، جنین برش خورده، کشت بافت، باززایی.

نویسنده مسئول: mahmoodkalate@yahoo.com

مقدمه

زیره پارسی که به آن زیره سیاه یا زیره کوهی نیز گفته می‌شود، یکی از گیاهان تیره کرفس (Apiaceae) و بومی منطقه محدودی از غرب آسیا است که در ایران در نواحی شمالی استان خراسان، کرمان، شرق زاگرس تا بندرعباس و جنوب البرز به طور خودرو وجود دارد. این گیاه از گیاهان دارویی مهم بوده و به طور گسترده در صنایع دارویی و آرایشی به کار می‌رود و ارزش ادویه‌ای نیز دارد (Khosravi, 1993).

مدیریت بیوتکنولوژی گیاه در سطوح مولکولی و سلولی روش کارآمد جدیدی برای اصلاح فراورده‌های ثانویه زیره در صنعت داروسازی و غلبه بر مشکلات بیماری‌ها بوده و یک سیستم کارآمد ریزازدیادی با فراوانی بالای باززایی جهت استفاده در دست ورزی‌های ژنتیکی مورد نیاز است. اساسی‌ترین هدف کشت بافت کوتاه کردن طول دوره اصلاحی و تولید تعداد زیادی از گیاهان عاری از بیماری است که کالوس‌دهی و باززایی همزمان به این مسئله کمک می‌کند. به طور کلی اطلاعات محدودی در ارتباط با کشت درون شیشه‌ای زیره پارسی وجود دارد.

واخلو (Wakhlu *et al.*, 1990) از کشت مریکارپ‌های زیره پارسی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin، کالوس به دست آورد و پس از

انتقال کالوس‌ها به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D توده‌های سلولی فشرده کوچک و سفید رنگی ایجاد شد. این توده‌های سلولی پس از انتقال به محیط کشت مشابه به جنین‌های کروی متعددی متمایز شدند و سپس به محیط کشت پایه و یا حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین منتقل شده و جنین‌های بالغ و ریشه‌دار ایجاد شدند. شریفی (Sharifi, 1995) از ریزنمونه محور زیرلپه و برگ لپه‌ای در کشت بافت زیره پارسی استفاده کرد. کالوس حاصل از محور زیرلپه زیره پارسی در محیط B5 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin رشد سریع‌تری داشت. تشکیل جوانه و ساقه در ریزنمونه محور زیرلپه، در ۱/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و تشکیل جنین‌های سوماتیکی در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشتر بود. زیارت‌نیا (Ziaratnia, 2000) برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا از غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D و NAA به طور جداگانه در ترکیب با Kin استفاده کرد. در تحقیق وی بهترین کالوس مربوط به تیمارهای با غلظت بالای اکسین و سیتوکینین بود. در این تحقیق برای رشد جنین‌های غیرجنسی ایجاد شده از محیط کشت پایه MS در غلظت‌های مختلف کینتین استفاده شد که بهترین عکس‌العمل مشاهده شده مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین بود. از جنین برش خورده در کشت بافت زیره سبز نیز استفاده

دوره سرمادهی ضروری است. پس از این مدت بذرها به وسیله محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی و سه بار در آب مقطر استریل شستشو داده شدند. نوک بذر با اسکالپل شماره ۱۰ استریل برش داده شد و با فشار بر روی وسط بذر، جنین به راحتی خارج شد. در این آزمایش، با توجه به مطالعات قبلی (شریفی، ۱۹۹۵؛ Ebrahimie et al., 2003) و پاسخ بهتر ریزنمونه محور زیرلپه نسبت به سایر ریزنمونه‌ها، فقط قسمت محور زیرلپه جنین برش داده شد و مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و همچنین هورمون‌های تنظیم کننده رشد با غلظت‌های مختلف NAA (۰/۱، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۱، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) یا همراه با Kin (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) کشت شدند. هر کدام از هورمون‌های اکسین به صورت جفتی با هورمون سیتوکینین مورد استفاده قرار گرفت. هورمون‌های NAA و 2,4-D هر کدام با سه غلظت همراه با پنج غلظت هورمون سیتوکینین در مجموع سی تیمار را تشکیل دادند. محیط کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و شدت روشنایی ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۱۶ ساعت در روز نگهداری شدند. در این تحقیق هیچ گونه واکنشی دیده نشد. در واقع القاء کالوس و باززایی و

شده است که در زمان کوتاه و بدون هیچ گونه واکنشی، باززایی حاصل شد (Ebrahimie et al., 2003). بهترین محیط کشت، B5 با ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی گرم در لیتر IAA (ایندول استیک اسید) و ۱ میلی گرم در لیتر BAP (بنزیل آمینوپورین) یا ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP بود.

همان طور که ذکر شد در روش‌های قبلی در ارتباط با باززایی زیره پارسی، معمولاً از ریزنمونه محور زیرلپه و لپه استفاده شده است که به دلیل مسن بودن بافت نسبت به جنین، عکس‌العمل خوبی نسبت به محیط کشت نشان نداده و باعث طولانی شدن مدت کشت بافت، آلودگی بالا، نیاز به محیط‌های مختلف کالوس دهی و باززایی و مصرف بالای مواد می‌شود که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. هدف از این آزمایش استفاده از جنین برش خورده در کشت بافت زیره پارسی و ارائه محیط کشت مناسب جهت القاء کالوس و باززایی بود.

مواد و روش‌ها

بذر زیره پارسی جمع‌آوری شده از منطقه کلات واقع در استان خراسان رضوی مورد استفاده قرار گرفت. بذر بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب در داخل تشتک پتری قرار گرفتند و به مدت بیست روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شدند. برای رشد جنین و امکان خروج آن از داخل بذر، این

ریشه‌زایی عمدتاً در تیمارهای دارای هورمون اکسین NAA رخ داده و در تیمارهای دارای هورمون 2,4-D ریشه‌زایی یا رخ نداد و یا میزان آن بسیار ناچیز بود. با افزایش غلظت این هورمون در اغلب موارد ریشه‌زایی افزایش داشت. بیشترین میزان ریشه‌زایی نیز در تیمار با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (جدول ۱). در تعدادی از تیمارها از جمله تیمار با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin تنها ریشه‌زایی رخ داد و باززایی ساقه در آن‌ها مشاهده نشد. بهترین تیمار از نظر القاء جنین سوماتیکی تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که اثر تیمارها بر روی فراوانی القاء ساقه در سطح احتمال ۰/۰۱ و در بقیه موارد یعنی میانگین تعداد ریشه و ساقه و فراوانی القاء کالوس، ریشه و جنین سوماتیکی در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۲). جنین‌های سوماتیکی پس از انتقال به محیط کشت فاقد هورمون، رشد و تولید ساقه کردند (شکل ۱). در تعدادی از تیمارها، کالوس‌دهی، باززایی و ریشه‌دهی به طور توأم رخ داد که این امر به میزان قابل توجهی از طول زمان کشت بافت کاست. باید توجه داشت که نتایج فوق هشت هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت به دست آمد و می‌توان با قطعه قطعه

تولید ریشه در یک نوع محیط کشت انجام شد. هشت هفته پس از انتقال، تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس و باززایی و تعداد ساقه‌های باززایی شده در هر ریزنمونه در محیط کشت‌های مختلف ثبت شد. فراوانی القاء کالوس و باززایی، از تقسیم تعداد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس و باززایی به تعداد کل ریزنمونه‌ها محاسبه شد.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سی تیمار هورمونی مختلف و ده تکرار در هر تیمار انجام شد. تجزیه آماری طرح با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اولین کالوس‌ها ده روز پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت، مشاهده شدند و پس از یک ماه باززایی رخ داد. به طور کلی مقدار کالوس در تیمارهای با ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین نسبت به تیمارهای فاقد سیتوکینین بیشتر بود. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، باززایی در تیمارهای دارای هورمون اکسین NAA نسبت به تیمارهای دارای هورمون اکسین 2,4-D به میزان بیشتری رخ داد. بیشترین ساقه باززایی شده مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بود (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی باززایی ساقه، ریشه، جنین سوماتیکی و میانگین تعداد ساقه و ریشه زیره پارسی در تیمارهای مختلف هورمونی

Table 1. The frequency of somatic embryo, root induction, shoot regeneration and mean number of root and shoot of Parsi zira in different treatments of plant growth regulators (PGRs)

تیمارهای هورمونی PGRs mg l ⁻¹	میانگین تعداد ساقه Mean number of shoots	فراوانی باززایی ساقه Shoot regeneration frequency	میانگین تعداد ریشه Mean number of roots	فراوانی القاء ریشه Root induction frequency	فراوانی جنین سوماتیکی Somatic embryogenesis frequency
0.1 NAA	0.56 abc	0.11 c	0.56 b	0.11 b	0.22 ab
0.1NAA+0.5KIN	1.00 abc	0.25 abc	0.25 b	0.13 b	0.65 a
0.1 NAA+1KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.00 b
0.1 NAA+2KIN	1.40 a	0.40 ab	0.00 b	0.00 b	0.20 ab
0.1 NAA+4KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.11 ab
1NAA	0.43 bc	0.14 bc	0.00 b	0.00 b	0.29 ab
1NAA+0.5KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.33ab
1NAA+1KIN	0.11 c	0.11 c	1.11 b	0.11 b	0.44ab
1NAA+2KIN	0.14 c	0.14 bc	0.00 b	0.00 b	0.00 b
1NAA+4KIN	0.67 abc	0.22 abc	0.44 b	0.11 b	0.44 ab
2NAA	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.44 ab
2NAA+0.5KIN	0.00 c	0.00 c	0.56 b	0.11 b	0.33 ab
2NAA+1KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.00 b
2NAA+2KIN	1.22 ab	0.44 a	3.33 a	0.33 a	0.22 ab
2NAA+4KIN	0.33 bc	0.11 c	0.22 b	0.11 b	0.11 ab
0.1 2,4-D	0.20 c	0.20 abc	0.00 b	0.00 b	0.40 ab
0.1 2,4-D+0.5KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.40 ab
0.1 2,4-D+1KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.11 ab
0.1 2,4-D+2KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.11 ab
0.1 2,4-D+4KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.11 ab
1 2,4-D	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.43 ab
1 2,4-D+0.5KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.44 ab
1 2,4-D+1KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.22 ab
1 2,4-D+2KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.56 ab
1 2,4-D+4KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.33 ab
2 2,4-D	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.56 ab
2 2,4-D+0.5KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.44 ab
2 2,4-D +1KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.5 ab
2 2,4-D +2KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.33 ab
2 2,4-D +4KIN	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.11 ab

حروف متفاوت در داخل ستون‌ها اختلاف معنی دار را در سطح احتمال ۰/۰۵ نشان می دهد (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

Different letters within the columns indicate significant differences (DMRT, P≤ 0.05).

جدول ۲- تجزیه واریانس مشاهدات مربوط به فراوانی باززایی ساقه، جنین غیر جنسی، القاء کالوس و ریشه و میانگین تعداد ساقه و ریشه

Table 2. The analysis of variance of observations for shoot regeneration, somatic embryogenesis, root, callus induction frequency and root, and shoot mean number

منابع تغییرات S.O.V.	میانگین مربعات Mean of squares						
	درجه آزادی df.	فراوانی القاء کالوس Callus induction frequency	میانگین تعداد ساقه Mean number of shoots	فراوانی باززایی ساقه Shoot regeneration frequency	میانگین تعداد ریشه Mean number of roots	فراوانی القاء ریشه Root induction frequency	فراوانی جنین سوماتیکی Somatic embryogenesis frequency
تیمار Treatment	29	0.32*	1.1 *	0.11**	3.65*	0.05*	0.27*
خطای آزمایشی Error	218	0.20	0.7	0.05	2.35	0.03	0.20

* و **: به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

* and **: Significant difference at 5% and 1% probability levels, respectively.



شکل ۱- القاء کالوس، جنین غیر جنسی، ریشه و اندام‌زایی در ریزنمونه جنین برش خورده، ۱- کالوس حاصل از ریزنمونه جنین برش خورده پس از دو هفته، ۲- اندام‌زایی در ریزنمونه جنین برش خورده پس از چهار هفته، ۳- رشد جنین‌های سوماتیکی پس از انتقال به محیط فاقد هورمون، ۴- القاء همزمان کالوس، باززایی و ریشه (فلشها)

Fig. 1. Callus and root induction, somatic embryogenesis and organogenesis on fragmented embryo explant. (Right to left): Callus induction on fragmented embryo explant after 2 weeks; Organogenesis on fragmented embryo explant after 4 weeks; Growth of somatic embryos after transfer to medium without PGRs; Simultaneous callus and root induction and regeneration (arrows)

(Guohua, 1998). در بعضی از گونه‌های گیاهی دیگر جنین‌های سوماتیکی القاء شده احتمالاً به میزان کمی سیتوکینین یا سایر مکمل‌های تنظیم کننده رشد برای جوانه‌زنی و رشد گیاه نیاز دارند (Kumar *et al.*, 1988). این روش نسبت به روش‌های قبلی که تاکنون گزارش شده دارای مزیت‌هایی از جمله افزایش تعداد گیاهان باززایی شده، کالوس‌دهی و باززایی همزمان و کوتاه شدن طول دوره کشت بافت، آلودگی پایین و عدم نیاز به واکشت‌های مکرر و کاهش مواد مصرفی است. با توجه به استفاده از ریزنمونه جوان جنین برش خورده و عکس‌العمل مناسب آن به محیط کشت، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده نسبت به روش‌های قبلی که از ریزنمونه‌های نسبتاً مسن محور زیرپه و کوتیلدون استفاده شده بود (شریفی، ۱۹۹۵؛ Tawfik and Noga, 2002) بیشتر است. از جنین برش خورده در گیاهان دیگر نیز استفاده شده است (Yong *et al.*, 1999). در این روش می‌توان پس از گذشت سی روز از انتقال ریزنمونه، بدون هیچ گونه واکشتی به گیاه کامل و ریشه دار دست یافت که با احتساب دوره سرمایی، طول کل دوره ۵۰ تا ۶۰ روز است. در صورتی که به خواهیم از محور زیرپه به عنوان ریزنمونه استفاده کنیم، با احتساب دوره سرمایی ۹۰ روزه برای جوانه‌زنی بذر، طول کل دوره برابر ۲۱۰ روز خواهد بود که در طول این مدت چندین بار واکشت می‌بایست انجام شود. نتایج

کردن کالوس باززایی شده و واکشت آن و صرف زمان بیشتر، تعداد باززایی را به ازای هر ریزنمونه، به مقدار قابل توجهی افزایش داد. به طور کلی بهترین تیمار برای القاء کالوس و باززایی و ریشه‌زایی به طور توأم، ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بود (جدول ۱).

تشکیل جنین سوماتیکی در مرحله القاء کالوس در تعدادی از گیاهان تیره کرفس (Apiaceae) از جمله رازیانه و هویج، معمول است (Hunault *et al.*, 1989). مکمل 2,4-D و NAA به تنهایی یا همراه با Kin برای تداوم القاء کالوس مورد نیاز است و کاهش آن‌ها باعث القاء فرایند اندام‌زایی و تولید جنین‌های نابجا در زیره پارسی می‌شود. وقوع باززایی در تعدادی از تیمارهای فاقد کینتین نشان داد، برای باززایی زیره پارسی الزامی نیست، در صورتی که در مورد زیره سبز وجود سیتوکینین برای باززایی ضروری است (Ebrahimie *et al.*, 2003). مطالعات قبلی نیز نشان داده که انتقال کالوس به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (Wakhlu *et al.*, 1990) و یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (Bonyanpour, 1995) منجر به تولید جنین‌های سوماتیکی می‌شود. به هر حال ترکیب هورمون‌های اکسین و سیتوکینین در مورد سایر گیاهان نیز مشاهده شده و در هر دو مورد اندام‌زایی و جنین‌زایی نقش دارد

فوق اهمیت نوع ریزنمونه انتخابی را روشن می‌کند. کشت جنین به عنوان یک روش ریزازدیادی در زیتون و زنبق نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Canas *et al.*, 1992). با استفاده از روش کشت بافت و انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها و آفات، می‌توان تعداد زیادی از گیاهان عاری از عوامل بیماریزا را در مدت کوتاهی تولید کرد. همچنین از این روش در تولید اسانس‌ها و مواد اولیه صنعت داروسازی می‌توان بهره برد.

References

- Bonyanpour, A. 1995.** Investigation of sexual propagation of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* and cumin callus induction. MSc. Thesis, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran.
- Canas, LA., Aliva, J., Vicente, M., and Benbadis, A. 1992.** Micropropagation of olive. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 18: 493-505.
- Ebrahimie, E., Habashi, A. A., Ghareyazie, B., Ghannadha, M., 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: 19-25.
- Guohua, M. 1998.** Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 1-7.
- Hunault, G., Desmarest, P., and Manoir, J. D. 1989.** *Foeniculum vulgare* Miller: cell culture, regeneration and the production of anethole pp. 185-212. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry 7: Medicinal and Aromatic Plants II*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Khosravi, M. 1993.** *Bunium persicum*, Botany, Ecology and Investigation the Possibility of Crop Production. Faculty of Agriculture, Ferdowsi University. Mashhad, Iran (in Farsi).
- Kumar, S. A., Gamborg, O. L., and Nabors, M. W. 1988.** Plant regeneration from long-term cell suspension cultures of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Plant Cell Reproduction* 7: 322-325.

- Sharifi, M. 1995.** Comparative investigation of essences of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* seed and explant fragments. MSc. Thesis, Faculty of Agriculture, Tehran University, Iran.
- Tawfik, A., and Noga, A. 2002.** Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended Kinetin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 35-40.
- Wakhlou, A. K., Nagari, S., and K. Barna, S. 1990.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Bunium persicum* *Bioss. Plant Cell Reproduction* 9: 137-138.
- Yong, W. K., Yang, Y., and Joon, C, K. 1999.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 95-101.
- Ziaratnia, S. M. 2000.** Somatic embryogenesis in *Bunium persicum*. Industrial and Scientific Researches Organization of Iran, Khorasan Centre.

