Archive of SID

فصل‌نامه داروهای گیاهی

journal homepage: www.journal.iaushk.ac.ir

تأثیر امواج فراصوت بر کارون در کالوس حاصل از کشت بافت زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.)

محمود اطرشی[۱]، الهام توکلی دینانی[۲]، محمد تقی درزی[۳]، جواد هاشمی[۱]، شیرین روزبه[۱]، امیر معصومی[۴]

۱. عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (ABRII)، اصفهان، ایران؛

۲. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، تهران، ایران؛

مسئول مکاتبات* (**E-mail: *elham230@yahoo.com*)

۳. عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت، تهران، ایران؛

۴. دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران؛

شناسه مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۴/۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۰۷/۷

نوع مقاله: پژوهشی

موضوع: به زراعی-به نژادی

کلید واژگان:

- ✓ *فراصوت*
- ✓ *متابولیت ثانویه*
- ✓ *کشت بافت*
- ✓ *کارون*
- ✓ *زیره سیاه*

چکیده

مقدمه و هدف: گیاهان دارویی منابع اصلی و با ارزش سازنده داروهای مفید هستند. تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه تأثیر شگرفی بر صنایع داروسازی داشته است. کارون یک ترکیب طبیعی است که در ساختار میوه و اندام هوایی زیره سیاه وجود دارد. با توجه به محدودیت تولید زراعی، کشت سلولی با اعمال محرک‌های تولید، نظیر امواج فراصوت، از جمله روش‌هایی است که می‌تواند در جهت تولید متابولیت های ثانویه مؤثر و کارآمد باشد. لذا تحقیق حاضر با هدف مطالعه اثر امواج فراصوت بر تولید متابولیت ثانویه و مهم موجود در گیاه دارویی زیره سیاه (*Bunium persicum*) به نام کارون در کالوس حاصل از کشت بافت به مرحله اجرا درآمد.

روش تحقیق: در این تحقیق کالوس در محیط سوسپانسیون تحت تأثیر تیمارهای یک‌بار و دو بار صوت دهی با زمان‌های ۰، ۵، ۲۰، ۳۵، ۵۰ و ۲۴۰ ثانیه توسط حمام فراصوت با فرکانس ۳۸/۵ کیلو هرتز و توان خروجی ثابت مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج متابولیت ثانویه کارون، میزان کارون تولید شده با روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) اندازه گیری گردید.

نتایج و بحث: اثر تحریک کنندگی امواج فراصوت، سنتز متابولیت ثانویه کارون را به میزان چشمگیری افزایش داد. چنان‌چه مشاهده گردید ترکیب محیط هورمون دار با تیمار ۲ بار صوت دهی و زمان ۳۵ ثانیه صوت دهی بالاترین میزان تولید کارون را در نمونه‌های مورد بررسی ایجاد نمود. تیمار شاهد (فاقد صوت دهی) نیز در همه موارد کمترین میزان کارون را داشت.

توصیه کاربردی / صنعتی: امواج فراصوت می توانند به عنوان یک محرک غیر زنده، با تشدید پاسخ های دفاعی در گیاه، سنتز متابولیت کارون را در نمونه های کشت بافت افزایش دهند.

۱. مقدمه

زیره سیاه گیاهی است دو ساله از خانواده چتریان با نام علمی *Bunium persicum* (Boiss.)، از تیره چتریان (Apiaceae) به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر، با ساقه توخالی و شیاردار که از قاعده منشعب می‌شود. ریشه‌ای راست یا دوکی شکل و گوشتدار و برگ هائی با بریدگی‌های نازک، نخی شکل و سبز روشن دارد (توکلی و معصومی، ۱۳۸۸). گل‌ها سفید یا صورتی کوچک به صورت چتر مرکب و میوه بیضی شکل به طول ۴ تا ۶ میلی‌متر و به رنگ قهوه-ای است. بوی آن معطر و مطبوع و طعم آن تند و کمی سوزاننده

www.SID.ir

Archive of SID

است. زیره سیاه در نواحی گرم آسیا، اروپا، جنوب ایران و آفریقا می‌روید (قاسمی، ۱۳۸۸). از ترکیبات شیمیایی که توسط این گیاه ساخته می‌شود می‌توان به تانن (۸٪)، ماده روغنی (۷ تا ۱۵٪)، موم، موسیلاژ، موارد زرینی و مواد قندی مختلف (۱۹ تا ۲۰٪)، مواد ازته و اسانس (۳/۵ تا ۹٪) که حاوی ترکیبات ترپنی و ترپنوئیدی هم‌چون کارون (۵۰ تا ۷۰٪)، لیمون (۲۵ تا ۳۰٪)، دی هیدروکارون، کاروئول و دی‌هیدروکاروئول می‌باشند اشاره کرد (امیدبیگی، ۱۳۷۶). کارون نوعی هیدروکربن مونوترپنی و عضوی از خانواده ترکیبات بیوشیمیایی ترپنوئیدها (DeCarvalhoand *et al*. 2006) است که از مهمترین اجزای اسانس‌ها یا روغن‌های معطر گیاهی بوده و به‌طور طبیعی در بسیاری اسانس‌ها از جمله میوه و اندام هوایی زیره، نعناع، شوید و میوه مرکبات یافت می‌شود. بیشترین میزان آن در بذور زیره و شوید است (Wagner, 1894).

کارون در طب نوین به عنوان کرم کش، مقوی، مدر (قاسمی، ۱۳۸۸)، کاهش دهنده چربی خون و از جمله ترکیبات شیمیایی مؤثر در درمان سرطان است (نجف پور نوائی، ۱۳۸۶). این ترکیب در صنایع غذایی و ادویه‌ای، دهان شویه‌ها، خوشبو کننده‌ها و انواعی از صابون‌ها، در داروهای شیرافزا، کارمیناتیف، کارامین، میکسچرها، سینکل، عطرها، در اروماتراپی و پزشکی مکمل یا طب جایگزین کاربرد دارد (نجف پور نوائی، ۱۳۸۶). سایر خواص درمانی این ترکیب عبارتند از تقویت کننده و نیرو دهنده، درمان اختلالات گوارشی (ضد نفخ، ضد قولنج، بادشکن و اشتها آور)، ضدعفونی کننده، قاعده آور و شیرافزا (Karim *et al*., 1977) و نیز ضد اسپاسم و ضد میکروب است (احمدی، ۱۳۸۰). علاوه بر این در کشاورزی به عنوان یک آفت کش و عامل بازدارنده جوانه‌زنی غده‌های سیب زمینی حین انبارداری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wagner, 1894).

با توجه به اهمیت جهانی و کاربرد وسیع اسانس‌ها در زمینه‌های گوناگون، هم‌چنین با توجه به مشکلات زراعی، تغییرات آب و هوایی، آفات و بیماری‌های گیاهی به منظور تولید و استفاده از گیاهان دارویی، از روش‌های دیگری نظیر کشت سلولی با اعمال محرک‌های تولید، جهت به دست آوردن مواد مؤثر گیاهی می‌توان استفاده نمود. هر چند روش‌های کشت بافت پرکاربرد و سودمند هستند اما تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از فن‌آوری کشت بافت هنوز هم دچار محدودیت‌های زیستی و زیست فن‌آوری است. یکی از این موارد درصد پایین متابولیت‌های تولید شده در این فن‌آوری می‌باشد (Tripathi & Tripathi, 2003).

تیمار سلول‌های گیاهی با الیسیتورهای زیستی (پلیمرهای گلیکان، گلیکوپروتئین‌ها، اسیدهای ارگانیک کوچک و یا ترکیبات استخراج شده از سلول‌های قارچی) و غیر زیستی (امواج UV، US، نمک‌ها، فلزات سنگین و موادی هم‌چون سالیسیلیک اسید، متیل جاسمونات، الیسیتورهای قارچی، نیترات نقره، آراکیدونیک اسید و وانادیل سولفات) همواره یکی از مؤثرترین ابزارهایی است که سنتز متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Roberts & Shuler, 1997).

حقیقتی که تاکنون به بررسی عوامل مؤثر در تولید متابولیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی پرداخته، غالباً از عوامل شیمیایی به عنوان محرک استفاده نموده‌اند، در حالی‌که امواج فراصوت به عنوان یک فن‌آوری نوین غیر حرارتی، محرکی فیزیکی و منبع انرژی ایمن و بی خطری است که ضمن تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه، تأثیرات نامطلوب محرک‌های شیمیایی را نیز ندارند (DiCosmo & Misawa, 1985).

از جمله دلایل استفاده از امواج فراصوت آن است که ترکیبات مفید تحت شرایط کنترل شده و بدون تأثیر تغییرات اقلیمی تولید می‌شوند، امکان نفوذ و توسعه میکروب‌ها و آفات در سلول‌های تحت کشت وجود ندارد، امکان اعمال کنترل بر مسیرهای تولید فراهم است و به این ترتیب هزینه‌های تولید و فرآوری این ترکیبات ارزشمند کاهش خواهد یافت. امواج فراصوت بسته به گونه گیاهی، سنتز متابولیت‌های ثانویه را به‌طور معنی داری افزایش می‌دهد (Dörnenburg & Knoor,1995).

باززایی در کشت لوله (*In-vitro*) به عنوان یکی از ابزارهای زیست فن‌آوری در تولید ترکیبات پایه گیاهی با کیفیت بالا، قابل ادغام با فن‌آوری اولتراسونیکاسیون است. امواج فراصوت دارای فرکانسی بیشتر از بازه فرکانسی شنوایی انسان هستند. محدوده فرکانس قابل شنیدن برای انسان ۲۰ تا ۲۰۰۰۰ هرتز می‌باشد. به فرکانس صوتی پایین تر از ۲۰ هرتز فروصوت و به فرکانس‌های

www.SID.ir

Archive of SID

صوتی بالاتر از ۲۰ هزار هرتز فراصوت اطلاق می‌گردد. با این‌که فراصوت و فروصوت توسط انسان قابل شنیدن نمی‌باشند، اما فردی که طولانی مدت در معرض آن‌ها قرار می‌گیرد دچار احساس سرگیجه، تهوع و سردرد می‌گردد (Schroeder, 2007). تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی مواد تولید شده در کشت بافت گیاه زیره به همراه امواج فراصوت به عنوان یک فن‌آوری فیزیکی محرک انجام نشده است. بر این اساس و با توجه به خواص درمانی مختلف و مهم گیاه زیره سیاه، تولید کالوس و مقایسه اثر امواج فراصوت بر میزان سنتز متابولیت کارون در نمونه‌های کالوس مورد مطالعه قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

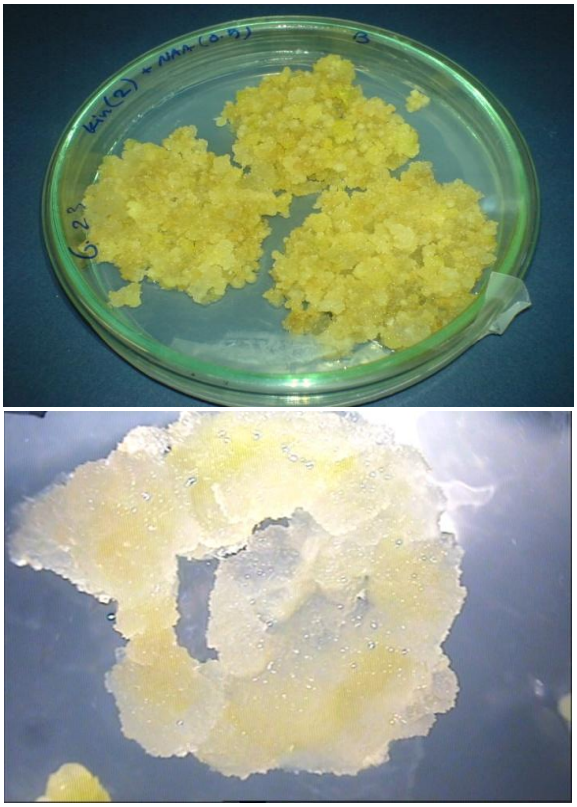
این آزمایش در اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ در بخش کشت بافت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی ایران انجام شد. بذور زیره سیاه جهت تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از کلکسیون گیاهان دارویی مرکز تحقیقات شهید فزوه اصفهان تهیه شد.

۲-۱. آماده سازی گیاهچه‌ها جهت تهیه ریزنمونه

بذور پس از طی مراحل ضدعفونی با الکل ۷۰ ٪، وایتکس ۳۰٪ و آب مقطر استریل، به محیط خواب شکنی شامل ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP [۱] و ۷ گرم در لیتر آگار و آب مقطر منتقل گردیدند. بذور پس از ۲ تا ۳ هفته نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی جوانه زده و به محیط MS 1/2 [۲] انتقال یافتند. زمانی که رشد برگ‌های لپه‌ای پایان یافت و درست قبل از ظهور برگ اصلی، گیاهچه‌های جوان آماده تهیه ریزنمونه و انتقال به محیط‌های کالوس زایی بودند.

۲-۲. تولید کالوس

جهت تولید کالوس از ریزنمونه‌های ریشه استفاده شد. بدین منظور قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری از ریزنمونه‌های ریشه به محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA [۳] و ۵/۸ گرم در لیتر آگار کشت گردید. نمونه‌ها به مدت ۴ هفته در اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. کالوس‌های تولید شده، جهت تکثیر هر ۴ هفته یکبار در محیط تازه واکشت گردیدند (شکل ۱).



شکل۱. کالوس‌های تولید شده در ریزنمونه ریشه زیره در محیط Kin (2 mg/L) + NAA (0.5 mg/L)

۲-۳. انتقال کالوس به محیط سوسپانسیون

انتقال کالوس به دو گروه محیط سوسپانسیون حاوی هورمون و فاقد هورمون انجام شد. در این مرحله ۰/۰۸ ± ۲ گرم کالوس به ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت MS مایع و نیز محیط کشت MS مایع حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز در شیکر انکوباتور با دور *rpm* ۱۱۰ و در شرایط تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا فاز رشد آن‌ها تکمیل شود. در روز ۲۱، صوت دهی نمونه‌های سوسپانسیون توسط حمام

[۱] 6-Benzylaminopurine
[۲] Murashig and Skoog
[۳] . 1-Naphthaleneacetic acid

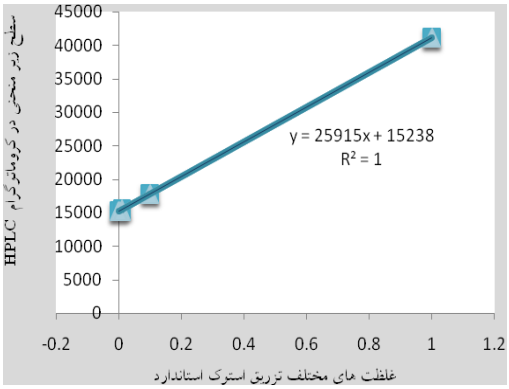
www.SID.ir

Archive of SID

فراصوت (Model 1875,Crest Ultrasonics Ternton, N.J) انجام گرفت. صوت دهی نمونه‌ها به دو صورت یک‌بار صوت دهی و دوبار صوت دهی با زمان‌های ۰، ۵، ۲۰، ۳۵، ۵۰ و ۲۴۰ ثانیه و با چهار تکرار انجام شد. به‌منظور اعمال تیمار دوبار صوت دهی، همان مدت زمان اول با فاصله ۲۴ ساعت تکرار گردید. توان خروجی دستگاه ثابت و فرکانس امواج ۳۸/۵ کیلو هرتز بود. مراحل واکشت زیر لامینار ایرفلو و تحت شرایط کاملاً سترون انجام شد.

۲-۴. استخراج کارون احتمالی

جهت جداسازی و استخراج کارون احتمالی تولید شده در کالوس از روش تائو و پریرا (Tao & Pereira, 1997) استفاده گردید. ۴ روز بعد از اعمال تیمارهای صوت دهی، محیط کشت و سلول‌ها به کمک فیلتراسیون از یکدیگر جدا شده و با استفاده از متانول نمونه‌ها عصاره گیری و تغلیظ شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه HPLC تحت شرایط سرعت جریان 1 میلی‌لیتر در دقیقه و فاز متحرک آب/متانول با نسبت ۷۲/۲۸ و طول موج UV ۲۲۷ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ستون Kromasil C18 با ابعاد ۴/۶ mm × ۲۵۰ تزریق شد. سطح زیر نمودارهای حاصل از HPLC با کمک نرم افزار Choromstar Light 6.3 محاسبه گردید (شکل۲).



شکل ۲: منحنی رگرسیون رابطه غلظت های مختلف استاندارد و سطح زیر منحنی

۲-۵. تجزیه آماری

آزمون‌ها به صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار طراحی شد و داده‌های حاصل از کلیه آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS version 8 مورد تجزیه قرار گرفت. سطح زیر نمودارهای حاصل از HPLC با کمک نرم افزار Choromstar Light 6.3 محاسبه گردید و با به دست آوردن سطح زیر منحنی ها، نمودار مربوطه در Excel office 2007 رسم شد. مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن و LSD انجام شد و سطح معنی دار ۵٪ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج و بحث

کلیه عوامل مورد بررسی از جمله وجود یا عدم وجود هورمون در محیط سوسپانسیون، دفعات صوت دهی، مدت زمان صوت دهی و اثرات متقابل آن‌ها تأثیر بسیار معنی داری بر میزان تولید کارون داشته است (جدول ۱). بررسی کروماتوگرام‌های HPLC (شکل ۳) نشان می‌دهد که همواره متابولیت تولید شده در تیمار ۲ بار صوت دهی، موفق‌تر و دارای اختلاف معنی داری با تیمار ۱ بار صوت دهی بوده است (جدول ۲).

در این تیمار اثر تحریک کنندگی امواج فراصوت بیشتر نمایان می‌شود، زیرا با اعمال ۲ بار صوت دهی، امواج فراصوت به عنوان یک محرک مکانیکی مؤثر، سبب تحریک بیشتر نمونه‌های سوسپانسیون شده و پاسخ‌های دفاعی بیشتری را بر می‌انگیزد.

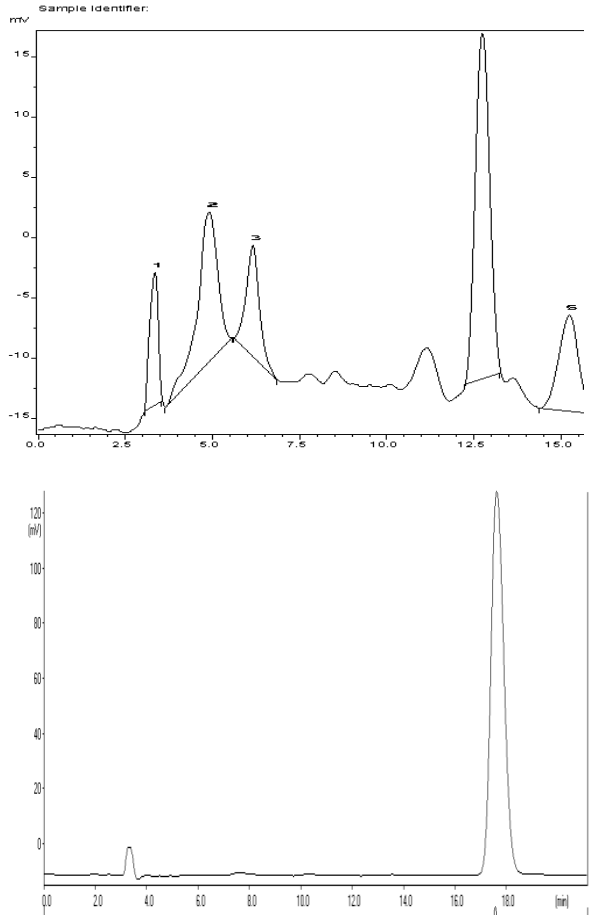
در آزمایش دیگری بر روی بررسی اثر امواج فراصوت بر میزان تولید متابولیت ثانویه شیکونین مشاهده شده است هنگامی که صوت دهی در دو مرحله انجام شده است، اثر تحریک کنندگی امواج به مراتب بیشتر از قبل آشکار شده و سنتز شیکونین در مقایسه با یک‌بار صوت دهی ۲ و حتی ۳ برابر بیشتر بوده است (Wu & Lin, 2003). مرتضوی و مسکوکی (۱۳۸۵) در مطالعات خود، دلیل این موضوع را چنین بیان کرده اند که استفاده از امواج فراصوت، استخراج ترکیبات آلی از مواد گیاهی و دانه را تسهیل می‌کند. تأثیرات مکانیکی کاربرد این امواج منجر به انتشار بیشتر حلال به درون سلول ها و افزایش میزان انتقال جرم می شود. هم‌چنین تخریب برخی دیواره های بیولوژیک در بافت‌های زنده، منجر به آزاد شدن بیشتر محتویات سلول در محلول می شود (مرتضوی و مسکوکی،۱۳۸۵). از میان زمان‌های مختلف صوت دهی، تیمار ۳۵ ثانیه بهتر از سایر تیمارها، تولید کارون را افزایش داد. اثرات متقابل ۳ عامل مورد بررسی گویای این مطلب است که محیط هورمون دار

www.SID.ir

Archive of SID

همراه با تیمار ۲ بار صوت دهی و زمان ۳۵ ثانیه صوت دهی، برای تولید کارون در نمونه‌های مورد بررسی ایده آل بوده است و تولید را از ۰ به بیش از ۷۷٪ افزایش داده است (جدول ۲).

شکل ۲. کروماتوگرام HPLC حاصل از : (بالا) تزریق نمونه استوک استاندارد کارون به دستگاه ، (پائین): تزریق عصاره ی نمونه های سوسپانسیون به دستگاه



نتایج پژوهش‌های دیگر نیز مؤید این مطلب است که استفاده از حمام فراصوت به مدت ۱ تا ۴ دقیقه بر نمونه‌های کشت سوسپانسیون سلول‌های گیاه جین‌سینگ (*Panax ginseng*) می‌تواند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را تحریک کند و محتوای ساپونین کل را تا ۷۵ درصد افزایش دهد (Lin *et al.*, 2001). هم-چنین در مطالعه دیگری (Wu & Lin, 2003) استفاده از ۱ تا ۸ دقیقه امواج فراصوت بر کشت سوسپانسون سلول‌های گونه *Lithospermum erythrorhizon* توانسته است بیوسنتز شیکونین را به میزان ۷۰-۶۰ درصد افزایش دهد. افزایش سنتز متابولیت در این آزمایش می‌تواند به دلیل افزایش نفوذ پذیری غشاء سلول‌های تیمار شده با امواج فراصوت باشد. معمولاً عملکرد دو آنزیم کلیدی که عبارتند از فنیل آلانین آمونیالایز و هیدروکسی بنزوئیک اسید گرانیل ترانسفراز، با استفاده از امواج فراصوت تشدید می‌شود، به نظر می رسد امواج فراصوت میزان انتقال سوبسترا بر بستر آنزیم را افزایش می دهند (Wu & Lin, 2003)، این در حالی‌است که شناخته‌شده‌ترین اثر امواج فراصوت بر روی آنزیم ها، غیرفعال سازی آن‌ها می باشد. از جمله این آنزیم ها می توان به لیپاز، لیپوکسیژناز، پلی فنل اکسیداز و انواع پروتئازها اشاره کرد. بر مبنای اطلاعات ارائه شده در منابع مشخص می شود مقاومت اکثر آنزیم ها به امواج فراصوت آن‌چنان زیاد است که کاربرد این امواج به تنهایی می تواند تأثیرات کیفی نامطلوبی را به همراه داشته باشد (Alissadrakis *et al.*, 2003). شدت تأثیر این امواج به پیوندهای درون مولکولی، بین مولکولی، جایگاه فعال آنزیم، وزن مولکولی آنزیم و ماهیت گروه های شرکت کننده در عمل کاتالیز بستگی دارد (مرتضوی و مسکوکی، ۱۳۸۵). لذا تأثیر این امواج در مورد هر گیاه باید به صورت مجزا بررسی شود.

چنان‌چه در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، تیمار شاهد (فاقد صوت دهی) در همه موارد کمترین میزان کارون را داشته است. نتایج این تحقیق تأییدی است بر اثر تحریک کنندگی مثبت و مؤثر امواج فراصوت در سنتز متابولیت‌های ثانویه در نمونه‌های کالوس حاصل از کشت بافت گیاه داروئی زیره سیاه، این در حالی است که برخی مطالعات پیشین نشان می داد که سلول‌های کالوس در شرایط عادی قادر به سنتز متابولیت‌های ثانویه نیستند و تنها ممکن است تانن بسازند (شمس اردکانی و هم‌کاران، ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴). با توجه به این مطلب می توان اظهار داشت که برای به‌دست آوردن متابولیت‌های ثانویه از سلول‌های کالوس استفاده از محرک‌ها ضرورت دارد. دستاورد مهم این آزمایش آن است که اثبات می‌کند سلول‌های کالوس زیره تحت شرایط به‌کارگیری محرک مناسبی نظیر امواج فراصوت، قادر به سنتز متابولیت‌های ثانویه مفید کارون می‌باشند. یعنی پیش از تخصصی شدن و تمایز قادرند محصولاتی را که سلول-های تخصصی اندام‌ها و بافت‌ها می‌سازند تولید کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

۴. نتیجه گیری

عملکرد اجزاء فعال در مسیرهای سنتز مولکول‌های بیولوژیک (متابولیت‌های ثانویه)، با تابش‌های فراصوت دست‌خوش تغییر می-شود، در این مطالعه میزان تولید کارون در سلول های تحریک شده با امواج فراصوت بسیار بیشتر از سلول‌های شاهد مشاهده شد. با توجه به پیچیدگی مسیرهای بیوسنتز متابولیت های ثانویه، و تعدد ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم های این مسیر، لذا تولید مصنوعی بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با دشواری های بسیاری روبرو است. از این رو دست‌یابی به روش‌هایی که مقادیر تولید این متابولیت‌ها را در بافت-های زنده گیاهی افزایش می‌دهند، دستاورد چشمگیری به حساب می آید. امواج فراصوت را می‌توان به عنوان یک رهیافت مفید و محرکی غیر زیستی، جهت افزایش سنتز متابولیت‌ها در کشت بافت مورد استفاده قرار داد. امید است در مطالعات آتی از این فن‌آوری بتوان در افزایش تولید ترکیبات مهم دارویی بهره جست.

جدول ۱. تجزیه واریانس بررسی اثر تیمارهای مختلف بر مقدار کارون در نمونه‌ها

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد کارون
محیط هورمون دار یا بدون هورمون (A)	۱	۸۵۲۶٫۶۵**
دفعات صوت دهی (B)	۱	۱۳۷۲٫۶۱**
زمان های مختلف صوت دهی (C)	۵	۲۳۱۶٫۷۵**
$A*C$	۱	۱۰۶۲٫۵۲**
$B*C$	۵	۱۰۳۷٫۱۵**
$B*C$	۵	۱۴۹٫۹۸**
$A*B*C$	۵	۱۱۷٫۲۹**
خطا	۴۸	۱٫۵۹

ns: عدم تفاوت معنی دار، **: تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد، *: تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۲. تاثیر تیمارهای آزمایش بر میزان کارون استخراج شده از نمونه‌ها

زمان تیمارها	یک‌بار صوت دهی		دوبار صوت دهی	
	محیط هورمون دار	محیط بی هورمون	محیط هورمون دار	محیط بی هورمون
0 ثانیه (فاقد صوت دهی)	۱٫۷۶ no	۱٫۳۹ o	۱٫۷۱ no	۱٫۴۴ o
۵ ثانیه	۱۱٫۵۴ i	۲٫۴۷ mno	۳۸٫۹۶ d	۳٫۳۵ lmno
۲۰ ثانیه	۳۵٫۴۶ e	۷٫۰۹ jk	۵۸٫۷۸ b	۸٫۴۹ j
۳۵ ثانیه	۴۷٫۲۷ c	۱۴٫۰۱ h	۷۷٫۶۴ a	۱۶٫۹۱ g
۵۰ ثانیه	۱۳٫۵۶ hi	۴٫۳۷ lm	۳۰٫۴۱ f	۵٫۱۳ kl
۲۴۰ ثانیه	۲۰. j	۳٫۹۷ lmno	۸٫۷۸ j	۴٫۲۸ lmn

* حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی داری بین گروه های مورد بررسی می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

۵. منابع

احمدی، ل. ۱۳۸۰. *بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سیاه carum carvi L.رویش یافته در منطقه آپارچای استان اردبیل*. تحقیقات گیاهان داروئی و معطر ایران. وزارت جهاد کشاورزی. ۱۲۰.

امیدبیگی، ر. ۱۳۷۶ . *رهیافت های تولید و فرآوری گیاهان دارویی*، انتشارات طراحان نشر، ۲: ۹۵ - ۱۰۶.

توکلی دینانی، ا. و معصومی، ا. ۱۳۸۸، *زیره سیاه*. ماهنامه علمی، تخصصی، کشاورزی زیتون ، ۲۰۴: ۳۰.

شمس اردکانی، م. امین زاده، ی. جهانشیر، ف. و ، ا. ۱۳۸۳، مقایسه متابولیت های تولید شده (گیاه بادرنجبویه *Melissa officinalis L*) در کشت سلولی در کالوس با گیاه کامل. *فصلنامه گیاهان دارویی*. ۴ (۱۳) ۶۸-۷۳ .

شمس اردکانی، م. حاجی آخوندی، ع. جمشیدی، ا. و محمدرفیعی، پ. ۱۳۸۴، تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه *Achillea millefolium* L و مقایسه متابولیت‌های تولیدشده در کالوس با گیاه کامل. *فصلنامه گیاهان دارویی*. ۵ (۱۷): ۲۱-۲۵.

قاسمی پیربلوطی، ع. ۱۳۸۸ . گیاهان دارویی و معطر (شناخت و اثرات آنها).چاپ دوم. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. واحد شهرکرد. ۴۰۷.

مرتضوی، ع. و مسکوکی، ع. ۱۳۸۵. افزایش بهره وری غشاهای اولترا- میکروفیلتر با استفاده از اولتراسوند. دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۰۳-۱۲۱.

نجف پور نوائی، م. ۱۳۸۶. *معرفی گیاهان داروئی ضد سرطان ایران*. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور. ۳۸-۳۹.

Alissadrakis, F., Daferera, D., Taratilis, P.A., Polossou, M., and Harizanis, P.C. 2003.Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food chemistry*., 82: 572-582.

DeCarvalho, C. R. and Da Fonseca, M. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*., 95: 413-422.

DiCosmo, F. and Misawa, M. 1985. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. *Trends Biotechnol*., 3:318–322.

Dönenburg, H. and Knorr, D. 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Technol.*, 17:674–684.

Karim, a., Parviz, M. and Bhatty, M. 1977. Studies on the essential oils of the Pakistan species of the family Umbelliferae *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 2: 106-108.

Lin, L.D., Wu, J.Y., Ho, K.P. and Qi, S.Y. 2001. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound Med Biol*., 27: 1147–1152.

Schroeder, M. 2007. Handbook of Acousti. Springer.

Roberts, S.C. and Shuler, M.L. 1997. Large-scale plant cell culture. *Curr Opin Biotechnol*., 8: 154–159.

Tao, L. and Pereira, M. A. 1997. Quantification of carvone, cineol, perilladehyde, perilly1 alcohol and sobrerol by isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* A., 793: 71-76.

Tripathi, L. and Tripathi, J.N. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical J. of Pharmaceutical Res.*, 2: 243 - 253.

Wagner, G. 1894. *Chemische Berichte*. 27: 2270.

Wu, J. and Lin, L. 2003. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Appl Microbiol Biotechnol*., 62: 151–155.

www.SID.ir