Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 53-61

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۶۱- ۵۳)

بررسی عکس‌العمل ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر کالوس‌زایی، ریشه‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای زیره سیاه ایرانی *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch

عبدالرضا باقری[۱]، فرشته مشیری[۲]* و سارا خسروی‌نیا[۳]
۱، ۲، ۳، استاد، کارشناس‌ارشد آموزشی و دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۴ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۲/۱۴)

Investigation on Reaction of Explants and Plant Growth Regulators on Callus Induction, Rooting and *in vitro* Regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch

A. BAGHERI[1], F. MOSHIRI[2]* AND S. KHOSRAVINIA[3]
1, 2, 3, Professor, Expert Training and Ph.D student, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(Received: Oct. 26, 2013 - Accepted: Mar. 5, 2013)

Abstract

Black zira is a perennial herb with highly valuable impact in the pharmaceutical industries. To overcome the existing limitations of the field, achieving efficient regeneration methods provides the possibility of genetic manipulation and improvement of traits in this plant. Our objective in this research work is to develop an efficient regeneration protocol of bleack zira being used in genetic improvement programs. After optimizing the conditions for sterilization and seed germination, sterile cotyledonary seedlings were obtained on MS basal medium. We investigated efficient callus induction, rooting and shoot regeneration methods on Murashige and Skoog's medium containing different concentrations of growth regulators including BAP, NAA and IAA in a factorial experiment based on completely randomized design with 3 replications. A significant increase in callus, rooting and regeneration from rootlet explants was observed. We noted that BAP and NAA were more capable for callus initiation and long-persistent development. It is shown that the most frequency and dry weight of callus was obtained on medium MS supplemented with 0.5 or 1mg/l BAP and NAA. Often frequency of rooting was influenced by NAA growth regulator. Also BAP and IAA in single stage regeneration in this study were found to be effective so that the addition of IAA to the culture medium caused reduction in callus development and showed direct shoot regeneration from cotyledon node, hypocotyl and rootlet explants.

Keywords: *Bunium persicum*, Benzylaminopurine, 1-Naphthaleneacetic acid, Indol acetic acid, Regeneration, *In vitro* culture

چکیده

زیره سیاه گیاهی چندساله با خواص دارویی باارزش است. به‌منظور غلبه بر موانع اصلاحی موجود در شرایط مزرعه، دست‌یابی به روش‌های باززایی مؤثر، امکان دست‌ورزی ژنتیکی و بهبود صفات را در این گیاه فراهم می‌کند. تحقیق حاضر با هدف دستیابی به یک پروتکل باززایی معتبر جهت استفاده از آن در برنامه‌های مهندسی‌ژنتیک این گیاه انجام شد. پس از بهینه‌سازی شرایط ضدعفونی و جوانه‌زنی بذر، در محیط‌کشت پایه MS، گیاهچه‌های لپه‌ای حاصل شدند. القای کالوس، ریشه‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های مختلف این گیاهچه‌ها، در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP، NAA و IAA، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. با کشت ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف محیط کشت، فراوانی کالوس‌زایی، ریشه‌زایی و باززایی از ریزنمونه ریشه‌چه افزایش معنی‌داری داشت. تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP و NAA بر القای کالوس و تداوم رشد آن مؤثر بودند. بیشترین فراوانی کالوس‌دهی و وزن‌خشک توده کالوس در غلظت‌های ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA مشاهده شد. فراوانی ریشه‌زایی غالباً متأثر از تنظیم‌کننده رشد NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین IAAدر باززایی تک مرحله‌ای مؤثر شناخته شد. به نحوی که با افزودن ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA به محیط کشت، کالوس‌دهی به میزان قابل توجهی کاهش یافته و باززایی ساقه از هر سه ریزنمونه گره لپه‌ای، هیپوکوتیل و ریشه‌چه مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: زیره سیاه، بنزیل آمینو پورین، نفتالین استیک‌اسید، ایندول استیک‌اسید، باززایی

* نویسنده مسئول: فرشته مشیری
E-mail: moshiri-fe@staff.um.ac.ir

مقدمه

زیره سیاه (*Bunium persicum* L.) گیاهی چندساله، خودگشن و علفی از خانواده چتریان و بومی مناطق خشک در شرق مدیترانه است. توده‌های وحشی زیره سیاه در ایران به‌صورت پراکنده در ارتفاعات غرب و شمال‌غربی، همچنین نواحی جنوب‌شرقی از جمله کرمان و بلوچستان و نیز در خراسان رویش یافته‌اند (Bahadori and Javanbakht, 2006).

گیاهان خانواده چتریان اغلب به‌دلیل متابولیت‌های ثانویه باارزشی که دارند از جمله ترپنوئیدها حائز اهمیت می‌باشند. اسانس زیره دارای مواد آلکالوئیدی با خواص دارویی باارزش است. همچنین از اسانس موجود در بذر آن به‌دلیل خواص متعددی از قبیل ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی و به‌عنوان بازدارنده جوانه‌زنی یا ممانعت از رشد قارچ در انبارهای موادغذایی استفاده می‌شود (Sharifi *et al.*, 1995; Simic *et al.*, 2008). در مقایسه با سایر گیاهان هم‌خانواده و از نظر اثرات ضدباکتریایی عصاره روغنی، زیره سیاه جایگاه سوم را دارا بوده و این امکان فراهم می‌باشد که از طریق ترکیب عصاره آن با زیره سبز بتوان به مواد دارویی مؤثرتری نیز دست یافت (Oroojalian *et al.*, 2008).

نظر به اهمیت زیره سیاه در تولید فرآورده‌های غذایی و به‌ویژه داروهای باارزش، اصلاح صفات یا افزایش ترکیبات دارویی آن مورد توجه قرار گرفته است. با این همه عوامل متعددی از جمله سطح پایین اتوگامی، غلبه بر خواب‌بذر به‌منظور جوانه‌زنی بذور، دوره رویشی طولانی، تنوع کم ژنتیکی و حساسیت به برخی از تنش‌های زنده و غیرزنده، روش‌های معمول زراعی یا اصلاحی را با محدودیت‌هایی مواجه می‌نماید (Bahadori and Javanbakht, 2006). در دو دهه اخیر استفاده از روش‌های نوین از جمله کشت درون‌شیشه‌ای در رفع موانع موجود مؤثر واقع شده و امکان دست‌یابی به گیاهچه عاری از بیماری ظرف مدت زمان کوتاه را میسر ساخته است. علاوه بر این توسعه تراریختی مؤثر، نیازمند در اختیارداشتن روش‌های کارآمد باززایی است که از طریق آن‌ها بتوان به واریته‌های با صفات جدید دست یافت. تاکنون از کشت این‌ویترو به‌منظور باززایی یا تکثیر اغلب گونه‌های گیاهی از جمله گیاهان دارویی استفاده شده است. به‌عنوان مثال ازدیاد گیاه رازیانه (از گیاهان هم‌خانواده زیره) در محیط کشت پایه MS با استفاده از ریزنمونه نوک ساقه گزارش شده است (Rout *et al.*, 2000). گیاه تاجریزی نیز که اخیراً به‌عنوان گیاه دارویی مطرح شده با استفاده از ریزنمونه گره ساقه در شرایط این‌ویترو تکثیر شده است (Padmapriya *et al.*, 2011).

تحقیقات مبتنی بر روش‌های کشت این‌ویترو که در گونه‌های نزدیک زیره سیاه از جمله زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) و زیره اروپایی (*Carium carvi* L.) صورت گرفته است، عمدتاً به‌منظور دابل‌هاپلوئیدی از طریق کشت بساک، بیوسنتز ترپنوئیدها به‌واسطه تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی و باززایی مستقیم یا غیرمستقیم به‌ویژه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی بوده‌اند (Krens *et al.*, 1997) و (Ebrahimie *et al.*, 2003) و (Smykalova *et al.*, 2009). Krens *et al.* (1997) برای اولین بار از گره‌های کوتیلدونی برای باززایی زیره اروپایی (*Carium carvi* L.) استفاده نموده و آن را به‌عنوان یک روش مؤثر با فراوانی بالا برای انتقال ژن‌های مطلوب به زیره اروپایی و تولید گیاهان تراریخته پایدار معرفی کرده‌اند. در تحقیق صورت گرفته، فعالیت‌های آنزیمی درگیر در مسیرهای بیوسنتزی زیره اروپائی نیز تا حدودی شناسایی شده و گیاه زیره به‌عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات متابولیکی مطرح شده است.

باززایی زیره سبز نیز با فراوانی بالا به‌منظور انتقال ژن Gox14 برای ایجاد مقاومت به قارچ فوزاریوم آلترناریا انجام شده است (Habashi, 2001). در این مطالعه که در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شده است از ریزنمونه‌های مختلف گیاهی که از بالا و پایین طوقه جدا شده‌اند در محیط کشت‌های مختلف دارای تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، NAA و IAA به‌منظور بهینه‌سازی باززایی مؤثر برای انتقال ژن به زیره سبز استفاده شده است. Tawfik and Noga (2001) نیز با استفاده از ریز نمونه‌های هیپوکوتیل زیره سبز در محیط کشت MS واجد غلظت‌های مختلف از تنظیم کنند رشد BAP، توانسته‌اند از طریق جنین‌زایی سوماتیکی از هر ریز نمونه ۹ تا ۳۰ ساقه نابجا به‌دست آورند.

براساس مطالعات گذشته، باززایی زیره سیاه از طریق القای کالوس و با استفاده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و قطعات جنین گزارش شده است. Valizadeh *et al.* (2007) نشان دادند که با استفاده از ریز نمونه هیپوکوتیل در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D باززایی ساقه پس از القای کالوس و بدون نیاز به واکشت صورت می‌گیرد. هنگامی که از ریزنمونه قطعات جنین به جای هیپوکوتیل استفاده شده بود، در محیط کشت B_5 شامل ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin یا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin،

کالوس‌های بیشتری القا شده است (Valizadeh *et al.*, 2008). جنین‌زایی سوماتیکی زیره سیاه پس از تولید کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط کشت پایه MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D صورت گرفته است (Valizadeh *et al.*, 2009) Grewal *et al.* (1999) با جداکردن جنین‌های قلبی شکل دارای رادیکال‌های گسترش‌یافته و سپس قراردادن آن‌ها در محیط کشت مایع توانسته‌اند با افزایش طول دوره کشت، مواد جنینی ثانویه[1] ایجاد نمایند و سپس با انتقال به محیط کشت جامد، جنین‌ها نمو یافته و تبدیل به گیاهچه شده است.

علی‌رغم تلاش‌های صورت گرفته در خصوص کشت درون‌شیشه‌ای در گیاهان هم‌خانواده زیره سیاه یا گونه‌های نزدیک آن، در زیره سیاه مطالعات محدودی صورت گرفته که اغلب با واسطه فاز کالوس بوده و از این‌رو احتمال بروز تنوع سوماکلونال در نمونه‌های گیاهی به‌دست‌آمده اجتناب‌ناپذیر است. بدیهی است دستیابی به روش‌های کارآمد و تکرارپذیر جهت باززایی و تولید گیاهچه‌های عاری از بیماری با حداقل تنوع ژنتیکی در زمان کوتاه، می‌تواند به‌عنوان پیش‌نیاز مهندسی ژنتیک در این گیاه و همچنین در مطالعاتی از جمله حفظ ذخائر ژنتیکی، بررسی انواع تنش‌ها یا کوتاه‌کردن طول دوره اصلاحی این گیاه مؤثر واقع شود. لذا تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی کشت درون‌شیشه‌ای زیره سیاه و دست‌یابی به روش‌های مؤثر و کارامد باززایی آن صورت گرفته است تا در صورت امکان بتوان با استفاده از آن، در کنار سایر روش‌های نوین مهندسی ژنتیک امکان دستیابی به گیاهان تراریخته دارای صفات مطلوب را فراهم نمود.

در دو دهه اخیر استفاده از روش‌های نوین از جمله کشت درون‌شیشه‌ای در رفع موانع موجود مؤثر واقع شده و امکان دست‌یابی به گیاهچه عاری از بیماری ظرف مدت زمان کوتاه را میسر ساخته است. علاوه بر این توسعه تراریختی موثر، نیازمند در اختیار داشتن روش‌های کارآمد باززایی است که از طریق آن‌ها بتوان به واریته‌های با صفات جدید دست یافت.

مواد و روش‌ها

بذور زیره سیاه از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، متعلق به سال گذشته تهیه شدند. حدود ۳ گرم بذر ابتدا به‌خوبی شستشو شدند تا ذرات خاک آن جدا شود. سپس ضدعفونی با وایتکس ۰/۵ درصد و یک قطره توبین ۲۰ صورت گرفت. با توجه به درصد بالای آلودگی بذور در آزمایشات مقدماتی، زمان‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه برای ضدعفونی سطحی منظور گردید. سپس بذور با آب‌مقطر استریل سه مرتبه جمعاً به‌مدت ۱۵ دقیقه آبکشی و در آب‌مقطر استریل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از هر سه تیمار ضدعفونی، نیمی از بذور روی صافی فلزی جهت حذف پوسته رویی بذر ساییده شدند. سپس کلیه بذور با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و وایتکس ۰/۲ درصد (با افزودن توبین۲۰) به‌مدت ۱۰ دقیقه مجدداً ضدعفونی و به‌دقت آبکشی شدند. کشت بذر در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی آب به همراه ۰/۷ درصد آگار و ۰/۵ درصد ساکارز انجام شد. از هر تیمار حدود ۲۰۰ بذر کشت و در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. پس از سپری‌شدن دوره سرمادهی، درصد آلودگی و جوانه‌زنی بذور تعیین شدند. بذور آلوده یا جوانه‌نزده حذف و بذور جوانه‌زده جهت رشد گیاهچه به محیط‌کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) در پلیت‌های شیشه‌ای منتقل شده و در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

در این آزمایش از گیاهچه‌های دو برگی (لپه ای) یکنواخت برای تهیه ریزنمونه‌های مختلف استفاده شد. به‌منظور بررسی تأثیر برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد، ریز نمونه گره لپه‌ای، محور زیر لپه و ریشه‌چه درمحیط کشت‌های پایه MS دارای نوع و غلظت‌های متفاوت هورمونی به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت شدند. ریز نمونه گره لپه‌ای دارای محور زیر لپه بود و برگ‌های لپه‌ای آن تا حد ممکن حذف شده بود. کشت‌ها به‌مدت حدود ۸ هفته بدون انجام واکشت در اتاقک رشد نگهداری شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به همراه شاهد انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل BAP در ۳ سطح (۰ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، NAA در سه سطح (۰ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و IAA در دو سطح (۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بودند که در سه ریزنمونه مختلف شامل گره لپه‌ای، هیپوکوتیل و ریشه‌چه مورد مقایسه قرار گرفتند.

در این آزمایش پس از حدود ۸ هفته بدون انجام واکشت، واکنش ریزنمونه‌های مختلف از نظر کالوس‌زایی، اندام‌زایی ریشه یا باززایی ساقه در هر یک از محیط کشت‌های مختلف بررسی شدند. میزان کالوس‌زایی با محاسبه وزن‌خشک کالوس بررسی شد. به این منظور ابتدا کالوس‌های به‌دست‌آمده، در

1. Secondary embryonic masses

دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون به‌مدت ۱۸ ساعت خشک و سپس توزین شدند. درصد اندام‌زایی ریشه یا باززایی مستقیم ساقه از هر یک از ریزنمونه‌ها نیز از تقسیم تعداد ریزنمونه با باززایی ریشه یا ساقه بر تعداد کل ریزنمونه به‌دست آمد. جهت انجام مطالعات آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

پس از گذشت ۳ هفته اولین آثار آلودگی باکتریایی در بذوری که ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده بودند مشاهده شد و ظرف مدت ۵ هفته تقریباً تمامی بذور به‌دلیل ظهور آلودگی قارچی و باکتریایی درمحیط کشت‌ها حذف شدند. در مقابل کمترین آلودگی در تیمار ضدعفونی۴۰ دقیقه مشاهده شد که نشان داد افزایش زمان ضدعفونی در کاهش آلودگی مؤثر بوده است. همچنین در مقایسه با آزمایشات مقدماتی که ضدعفونی بذور تنها در یک مرحله صورت گرفته و بذور در سطح پلیت کشت می‌شدند، میزان آلودگی در ضدعفونی دو مرحله‌ای و کشت جداگانه بذور، به‌شدت کاهش یافته و از ۷۵ درصد به حدود ۱۶ درصد (در تیمار ضدعفونی ۴۰ دقیقه) رسید.

جوانه‌زنی بذور به‌طور محدود از هفته پنجم آغاز شد و پس از حدود ۱۰ هفته سرمادهی، به‌طور متوسط ۷۲ درصد بذور جوانه زدند. بیشترین جوانه‌زنی پس از ۳۰ دقیقه ضدعفونی مشاهده شد با این همه اختلاف جوانه‌زنی بذور در تیمارهای ۳۰ و ۴۰ دقیقه کمتر از ۵ درصد بود. ساییدن بذور و حذف پوسته رویی هر چند میزان آلودگی را به کمتر از ۱ درصد کاهش داد با این همه جوانه‌زنی بذور نیز تا حدود ۱۵ درصد کاهش نشان داد. احتمال می‌رود آسیب‌رساندن به پوسته بذر از طریق جذب ماده ضدعفونی‌کننده توسط جنین بذر سبب ممانعت از جوانه‌زنی آن‌ها شده باشد. در مجموع با توجه به نتایج فوق به‌نظر می‌رسد ضدعفونی دو مرحله‌ای و کشت تک بذر در ویال‌های کوچک در کنترل آلودگی شدید که مانع جدی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه بذری در محیط درون‌شیشه‌ای است، مؤثر واقع شده است. همچنین از بین تیمارهای ضدعفونی، تیمار ۴۰ دقیقه با کمترین آلودگی و درصد جوانه‌زنی مناسب برای ضدعفونی سطحی قبل از دوره سرمادهی مرطوب می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

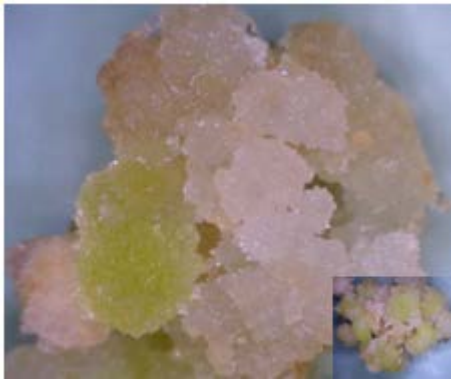
پس از انتقال بذور جوانه زده به محیط کشت پایه MS، ظرف مدت ۱ هفته در اکثر نمونه‌ها برگ‌های لپه‌ای خارج شده و گیاهچه‌های کامل دو برگی با طول متوسط ۴ سانتی‌متر به‌دست آمدند. ریزنمونه‌های گره لپه‌ای، هیپوکوتیل و ریشه‌چه این گیاهچه‌ها، در محیط کشت پایه MS حاوی ترکیبات مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد، واکنش‌های متفاوتی اعم از کالوس‌زایی و سپس ریشه‌زایی یا باززایی ساقه را آشکار نمودند. نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد BA، NAA و IAA بر کالوس‌زایی، ریشه‌زایی یا باززایی ساقه

منبع تغییرات	کالوس‌زایی	ریشه‌زایی	باززایی ساقه
ریزنمونه	6.525 **	301.389**	0.302**
BA	0.395*	214.130**	0.099n.s.
NAA	0.043 n.s.	46.889*	0.191*
IAA	0.302 n.s.	22.222n.s.	0.025n.s.
ریزنمونه * BA	0.052n.s.	119.741**	0.006n.s.
ریزنمونه NAA *	0.562**	35.806*	0.043n.s.
ریزنمونه * IAA	0.043n.s.	8.389n.s.	0.006n.s.
BA * NAA	0.960**	41.046**	0.006n.s.
BA * IAA	0.099n.s.	24.796n.s.	0.173*
NAA * IAA	0.228n.s	8.963n.s.	0.006n.s.
ریزنمونه * BA * NAA	0.376 **	30.157*	0.080n.s.
ریزنمونه * BA * IAA	0.090 n.s.	10.463n.s.	0.043n.s.
ریزنمونه * NAA * IAA	0.025n.s.	6.880 n.s.	0.043n.s.
BA * NAA * IAA	0.164 n.s.	3.620 n.s.	0.099n.s.
ریزنمونه * BA * NAA * IAA	0.127 n.s.	1.870 n.s.	0.025n.s.

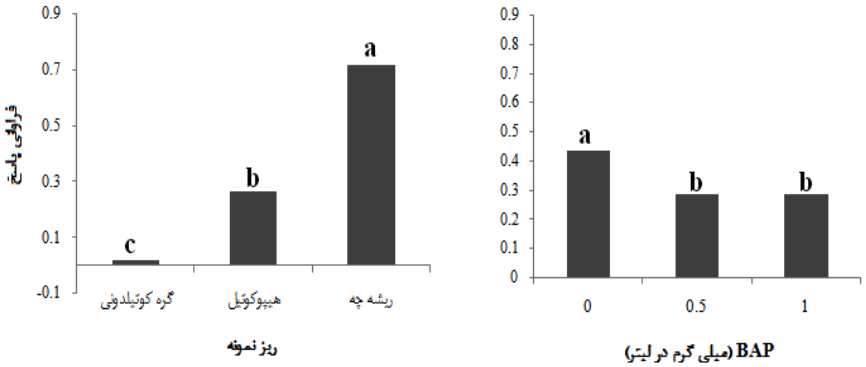
n.s غیر معنی دار؛ * معنی دار در سطح احتمال ۹۵ درصد؛ ** معنی دار در سطح احتمال ۹۹ درصد

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ریزنمونه‌های مختلف موردمطالعه اثر معنی‌داری در القای کالوس، اندام‌زایی ریشه و باززایی ساقه داشتند. همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد بررسی به‌صورت جداگانه یا استفاده هم‌زمان در محیط کشت تأثیر معنی‌داری در کشت درون‌شیشه‌ای زیره سیاه داشتند. با گذشت ۵ روز از کشت ریزنمونه‌های مختلف در تیمارهای مختلف هورمونی ابتدا القای کالوس در ریزنمونه ریشه‌چه مشاهده شد و به‌تدریج سایر ریزنمونه‌ها نیز شروع به کالوس‌زایی نمودند (شکل ۱).



شکل ۱- کالوس‌زایی از ریزنمونه ریشه‌چه در محیط کشت دارای ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و BAP پس از حدود ۴ هفته

براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، اثر ریزنمونه به‌طور معنی‌داری در القای کالوس مؤثر بود به نحوی که بیشترین فراوانی کالوس‌زایی در ریزنمونه ریشه‌چه و سپس در هیپوکوتیل مشاهده شد (شکل ۲). ریزنمونه گره لپه‌ای به‌ویژه در محیط کشت‌های دارای سیتوکنین اغلب رشد نمودند و فراوانی کالوس‌زایی کمی داشتند که با ریزنمونه هیپوکوتیل نیز اختلاف معنی‌داری داشت (شکل۲). Krens *et al.* (1997) در زیره اروپایی نشان دادند که ساقه‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل پس از تولید کالوس رخ داده ولی در باززایی از ریزنمونه گره لپه‌ای، فاز کالوس مشاهده نشد. در مطالعات گذشته در زیره سیاه اغلب از ریزنمونه هیپوکوتیل به‌منظور کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم با واسطه فاز کالوس استفاده شده است (Sharifi *et al.*, 1995; Valizadeh *et al.*, 2007)، این در حالی است که با مطالعه ریزنمونه‌های مختلف در تحقیق حاضر به‌نظر می‌رسد ریشه‌چه ریزنمونه مستعدتری برای کالوس‌زایی باشد.



شکل ۲- مقایسه فراوانی کالوس‌زایی در ریز نمونه‌ها و غلظت‌های متفاوت BAP

میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵).

از بین تنظیم‌کننده‌های رشدی به‌کار رفته در این آزمایش اثر BAP (در سطح احتمال ۵٪) بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها معنی‌دار بود. به نحوی که اضافه‌نمودن BAP به ترکیب محیط کشت، فراوانی القای کالوس از ریزنمونه‌های مختلف را تا حدود یک و نیم برابر به‌طور معنی‌داری کاهش داد. با این همه بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر BAP در کالوس‌زایی ریز نمونه‌ها تأثیر معنی‌داری نداشت (شکل ۲).

در تحقیق صورت گرفته، استفاده توأم NAA و BAP در محیط کشت توانست در کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها به‌طور معنی‌داری اثربخش باشد (جدول ۱). این افزایش در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP منجر به افزایش کالوس‌زایی به‌ویژه در ریزنمونه ریشه‌چه شده است. گزارش Valizadeh *et al.* (2008) نیز به افزایش رشد کالوس از ریزنمونه محور جنینی در تیمارهای دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin در مقایسه با تیمارهای فاقد سیتوکنین اشاره دارد.

به‌منظور بررسی میزان رشد کالوس در محیط کشت‌های

مختلف، وزن‌خشک کالوس پس از ۸ هفته اندازه‌گیری شد که اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان دادند. از ریزنمونه‌های کشت‌شده در ۹ ترکیب متفاوت محیط کشت، کالوس‌هایی با وزن‌خشک بیشتر از ۱۵۰ میلی‌گرم به‌دست آمد. این محیط کشت‌ها همگی دارای تنظیم‌کننده رشد NAA و یا ترکیب BAP با NAA بودند (جدول ۲). در مطالعه Sharifi (1995) وجود هورمون اکسین NAA و سیتوکنین Kin با غلظت برابر ۲ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش سرعت رشد کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل زیره سیاه گردید.

جدول ۲- مقایسه وزن خشک کالوس در ترکیبات هورمونی مختلف محیط کشت

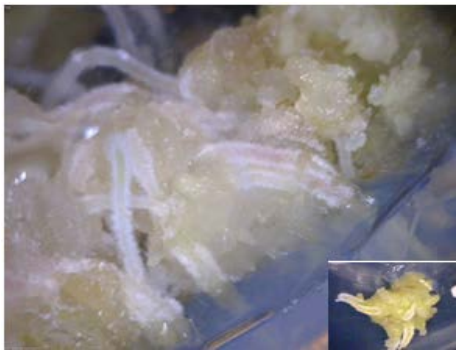
وزن خشک توده کالوس (میلی‌گرم)	تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم در لیتر)		
	IAA	NAA	BAP
90.0 de	0	0	0
110.0 cd	0.5	0	0
190.0 b	0	0.5	0
95.0 cde	0.5	0.5	0
180.0 bc	0	1.0	0
100.0 cd	0.5	1.0	0
65.0 de	0	0	0.5
135.0 cd	0.5	0	0.5
125.0 cd	0	0.5	0.5
200.0 b	0.5	0.5	0.5
186.5 bc	0	1.0	0.5
155.0 bc	0.5	1.0	0.5
6.5 f	0	0	1.0
83.3 de	0.5	0	1.0
290.0 a	0	0.5	1.0
180.0 bc	0.5	0.5	1.0
180.0 bc	0	1.0	1.0
183.3 bc	0.5	1.0	1.0

میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>۰/۰۵$).

ریشه‌زایی از منشاء کالوس بدون تغییر هورمونی و با گذشت زمان در بیشتر محیط کشت‌ها مشاهده شد (شکل ۳).

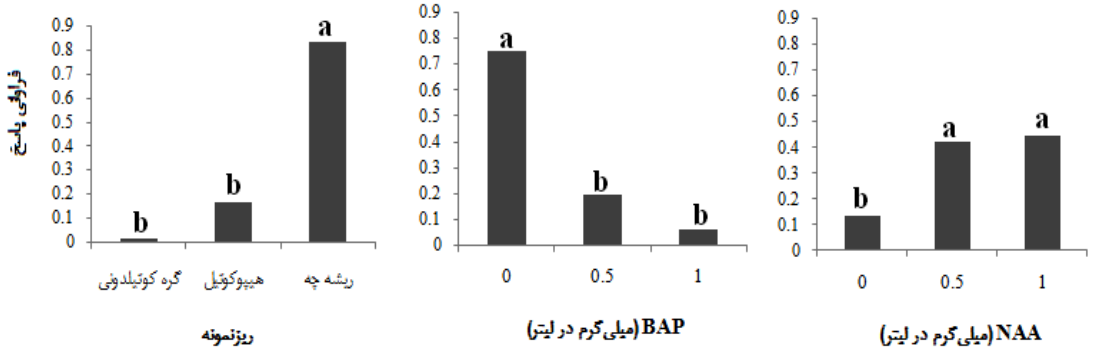
از بین فاکتورهای مورد مطالعه در این تحقیق، تأثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA و نیز اثرات متقابل آن‌ها بر اندام‌زایی ریشه معنی‌دار بود.

جدول ۱ هر چند IAA تأثیر معنی‌داری بر ریشه‌زایی نشان نداد با این همه ریشه‌های حاصل اغلب به لحاظ ریخت‌شناختی قطورتر و کوتاه‌تر از سایر ریشه‌ها بودند. این احتمال وجود دارد که با توجه به منشاء طبیعی تنظیم‌کننده رشد IAA، نیاز باشد از غلظت‌های بیشتر آن در محیط کشت استفاده نمود.



شکل ۳- ریشه‌زایی از ریزنمونه ریشه‌چه در محیط کشت دارای ۱ میلی گرم در لیتر NAA پس از ۴ هفته

براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، همان‌گونه که انتظار می‌رفت بیشترین ریشه‌زایی به‌طور غیرمستقیم از ریزنمونه ریشه‌چه به‌دست آمد که با سایر ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). در آزمایش حاضر، متوسط ریشه‌زایی از ریزنمونه ریشه‌چه حدود ۵ برابر هیپوکوتیل بود. ریزنمونه گره لپه‌ای تنها در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA توانست تعداد محدودی ریشه‌چه باززایی نماید که تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سایر ریزنمونه‌ها داشت.



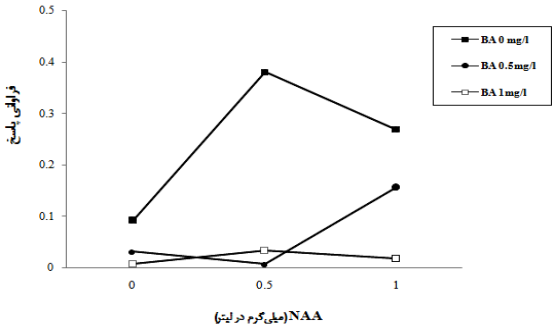
شکل ۴- مقایسه فراوانی ریشه‌زایی در ریزنمونه‌ها و غلظت‌های متفاوت BAP و NAA

میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>۰/۰۵$).

تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA تأثیر معنی‌داری در تولید ریشه داشتند که با نوع ریزنمونه در ارتباط بود. میانگین ریشه‌زایی در تیمارهای دارای تنظیم‌کننده رشدی BAP، در مقایسه با تیمارهای فاقد آن، کاهش معنی‌داری را نشان داد. به نحوی که در محیط کشت‌های فاقد BAP ریشه‌زایی به‌طور متوسط ۶ برابر بیشتر بود. در مقابل NAA با غلظت ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر در افزایش ریشه‌زایی به‌طور معنی‌داری مؤثر واقع شد (شکل ۴). از ریزنمونه ریشه‌چه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حداکثر ۳۰ ریشه و در محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA حداکثر ۲۵ ریشه القاء شد که در مقایسه با سایر تیمارها افزایش چشمگیری داشته است. لذا به نظر می‌رسد NAA نقش مؤثری در افزایش ریشه‌زایی در زیره سیاه دارد.

مطالعه Valizadeh *et al.* (2008) نشان داد که ریشه‌زایی از کالوس حاصل از ریزنمونه محور جنینی زیره سیاه، اغلب در تیمارهای دارای هورمون NAA رخ داده است و همچنین با افزایش غلظت NAA در اکثر موارد ریشه‌زایی افزایش یافته است. گزارش Miao-Miao *et al.* (2009) بر روی *Allium chinense* نیز بیانگر افزایش تشکیل ریشه با افزایش غلظت NAA بود.

در این مطالعه براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، هر چند افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد NAA از ۰/۵ به ۱ میلی‌گرم در لیتر در افزایش ریشه‌زایی اثر معنی‌داری نداشت (شکل ۴) با این همه اثر متقابل ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP فراوانی ریشه‌زایی را در محیط کشت افزایش داد (شکل ۵) که در سطح احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).



شکل ۵- اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA بر فراوانی ریشه‌زایی

پس از گذشت ۲ تا ۳ ماه از کشت ریزنمونه‌ها، باززایی ساقه در برخی از تیمارهای هورمونی بدون نیاز به واکشت مشاهده شد (شکل ۶). در این مطالعه ریزنمونه‌های مختلف در سطح احتمال ۹۹ درصد بر باززایی اندام برگی یا ساقه مؤثر بودند. همچنین استفاده توأم از تنظیم‌کننده‌های رشد BA و IAA در محیط کشت اثر معنی‌داری (در سطح احتمال ۹۵ درصد) بر باززایی ساقه داشت. علاوه بر این تنظیم‌کننده رشد NAA باززایی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (جدول ۱).

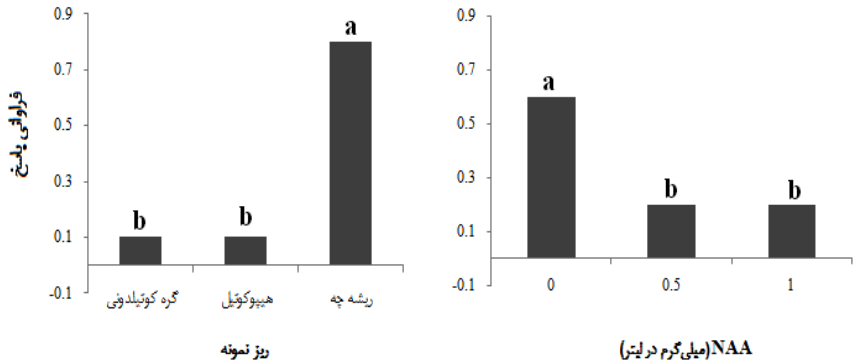
شکل ۶- باززایی از ریزنمونه ریشه‌چه در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و IAA پس از حدود ۱۰ هفته

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که باززایی از ریزنمونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۷). بیشترین باززایی در ریزنمونه ریشه‌چه مشاهده شد که در حدود ۱۰ برابر سایر ریزنمونه‌ها بود. در این آزمایش علی‌رغم اینکه انتظار می‌رفت با حذف برگ‌های لپه‌ای که احتمالاً بازدارنده رشد جوانه میانی گره لپه‌ای باشند ریزنمونه‌های گره لپه‌ای بتوانند باززایی نمایند با این‌همه باززایی محدودی در این ریزنمونه مشاهده شد. ریزنمونه‌های گره لپه‌ای و هیپوکوتیل تنها در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA باززایی نمودند (شکل۷).

در مطالعه حاضر با مقایسه میانگین‌ها نشان داده شد که افزودنNAA به ترکیب محیط‌کشت سبب کاهش معنی‌داری در باززایی شد (شکل ۷). لذا به‌نظر می‌رسد که تنظیم‌کننده رشد NAA در باززایی نقش مؤثری نداشته و افزایش NAA موجب کاهش یا ممانعت از باززایی می‌شود.

تنظیم‌کننده رشد BAP اثر معنی‌داری در باززایی ساقه از ریزنمونه‌های مختلف نشان نداد (جدول ۱). مطالعات گذشته نشان داده که این گیاه و برخی از گونه‌های خانواده چتریان (هویج، رازیانه و کرفس)، از سطوح بالای متابولیت‌های ثانویه و تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی به‌ویژه سیتوکنین برخوردارند (Rout *et al.*, 2000). احتمال می‌رود بالابودن سیتوکنین داخلی در این گیاه، موجب شده که دیگر الزامی بر استفاده از BAP برای باززایی در زیره سیاه نباشد. Valizadeh *et al.* (2008) نیز وقوع باززایی در برخی از تیمارهای فاقد کینتین

را دلیل بر این مدعی دانسته‌اند. Ebrahimie *et al.* (2006) گزارش نموده اند که اگرچه سیتوکینین‌هایی مانند BAP موجب افزایش ساقه‌زایی می‌شوند ولی آن‌ها در حقیقت با افزایش القای‌کالوس سبب کاهش باززایی مستقیم می‌شوند.



شکل ۷- مقایسه فراوانی باززایی ساقه در ریز نمونه‌ها و غلظت‌های متفاوت NAA
میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری ندارند (p>۰/۰۵).

تنظیم‌کننده رشد IAA هر چند به تنهایی در باززایی اثر معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱) با این همه هر سه ریزنمونه مورد مطالعه، در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی گرم در لیترIAA باززایی نمودند که منجر به افزایش فراوانی باززایی در مقایسه با شاهد شد. همچنین در حضور IAA، باززایی منجر به تولید برگ‌های ۴ برگچه‌ای شده است که از برگ‌های تکی کاملاً متمایز و به شرایط رشدی گیاه در محیط برون‌شیشه‌ای نزدیک‌تر است. در مطالعات صورت گرفته در مسیرهای مورفوژنزی مختلف زیره سبز نیز به نقش کلیدی تنظیم‌کننده رشد IAA در باززایی یا جنین‌زایی مستقیم اشاره شده است (Ebrahimie *et al.*, 2007). احتمال می‌رود با افزایش غلظت IAA در محیط کشت بتوان به نتایج مطلوب‌تری دست یافت.

مطالعات گذشته، تلاش‌های محدودی را برای بهینه‌سازی باززایی زیره سیاه در حضور Kin و NAA نشان داده است. در گزارش Valizadeh *et al.* (2007) بالاترین فراوانی باززایی ساقه ۴۲ درصد بود که در حضور ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شده است. در این مطالعه، فراوانی باززایی از ۵۰ درصد بیشتر بود. همچنین مشاهده شد که ریزنمونه‌های بازرا در محیط کشت‌های دارای IAA، کالوس بسیار کمی تولید نمودند. ساقه‌های باززایی شده در محیط‌کشت‌های دارای IAA بر خلاف مطالعات گذشته از نوع اندام‌زایی برگی نبوده و به ساقه‌های گیاه طبیعی شباهت داشتند. احتمال می‌رود با غلظت‌های بیشتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در محیط کشت، به تنهایی یا در ترکیب با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد بتواند مسیر باززایی این گیاه را همان‌گونه که در زیره سبز نیز مشاهده شده است به سمت باززایی مستقیم هدایت نماید. از آنجا که روش‌های باززایی غیرمستقیم از طریق کالوس، احتمال وقوع تنوع سوماکلونال و تغییر در ماده ژنتیکی را افزایش می‌دهد، تلاش برای توسعه روش‌های باززایی معتبر، مؤثر و مستقل از ژنوتیپ که تکرارپذیر باشند گامی مهم در توسعه سیستم تراریزش گیاه محسوب می‌شود و لذا ضروری است بهینه‌سازی روش‌های باززایی بدون واسطه‌گری کالوس به‌عنوان پیش نیاز هرگونه اقدام مهندسی ژنتیک صورت گیرد.

نتایج این مطالعه در مجموع نشان داد که استفاده از سیستم باززایی تک‌مرحله‌ای و نیز اجتناب از غلظت‌های بالای تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه سیتوکنین‌ها در بافت‌های جوان که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند احتمالاً بتواند با کاهش تغییرات اپی‌ژنتیک برای باززایی از گیاهان تراریخته در زیره سیاه یا گونه‌های نزدیک آن مورد استفاده قرار گیرد. همچنین استفاده از IAA در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی این گیاه بدون یا با واسطه کالوس بسیار کم در شرایط درون‌شیشه‌ای مؤثر تر شناخته شده و اغلب، گیاهان حاصل به لحاظ مورفولوژی با گیاهان حاصل در محیط برون‌شیشه‌ای انطباق بیشتری را نشان دادند.

سپاسگزاری

اعتبار این طرح از محل طرح تحقیقاتی معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به شماره ۱۶۲۳۵/۳ تأمین شده است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Bahadori, F, Javanbakht A (2006) Effect of pre-treatments on seed germination and seedling growth of *Bunnium persicum* of semnan. Iranian J. Rangelands and Forests Plant Breed. Genet. Res. 14(3):163-169.

Ebrahimie E, Habashi AA, Ghareyazie B, Ghannadha M, Mohammadie M (2003) A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 75:19-25.

Ebrahimie E, Habashi AA, Mohammadie-Dehcheshmeh M, Ghannadha MR, Ghareyazie B, Yazdi-Amadi B (2006) Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and genotype-independent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes. In Vitro Cell. Dev. Biol.-plant 42(5):455-460.

Ebrahimie E, Naghavi MR, Hosseinzadeh AA, Behamta MR, Mohammadi-Dehcheshmeh M, Sarrafi A, Spangenberg G (2007) Induction and comparison of different *in vitro* morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 90(3):293-311.

Grewal S, Rani M (1999) Repetitive somatic embryogenesis in aggregated liquid culture of *Bunium persicum Boiss.* J. Exp. Biol. 37:70-75.

Habashi AA (2001) Efficient protocol for plant regeneration from 3 masses of cumin and use them to transfer Gox14 gene for resistance to Fusarium Alternaria. Final Report of Project ABRII. Karaj.

Krens FA, Keizer LCP, Capel IEM (1997) Transgenic caraway, *Carum carvi* L: a model species for metabolic engineering. Plant Cell Rep. 17(1):39-43.

Miao-Miao Y, Chan X, Chun-Hwan K, Yeong-Cheol U, Amadou Apho B, De-Ping G (2009) Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Sci. Hort. 123:124-128.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth of and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.

Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M (2008) Synergistic antibacterial activity of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* essential oils. Planta Med. 74(9): 1197-1198.

Padmapriya H, Karthikeyan AVP, Jahir Hussain G, Karthi C, Velayutham P (2011) An efficient protocol for in vitro propagation of *Solanum nigrum* L. from nodal explants. Agric. Technol. 7:1063-1073.

Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnol. Adv. 18: 91-120.

Sharifi M (1995) Comparative investigation of essences of *Bunium persicum* and *Cuminum cyminum* seed and explant fragments. M.Sc. thesis, Agricultural College, Tehran University.

Simic A, Rancic A, Sokovic MD, Ristic M, Grujic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD (2008) Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. Pharm. Biol. 46(6):437-441.

Smykalova I, Smirous P, Kubosiova M, Gasmanova N, Griga M (2009) Doubled haploid production via anther culture in annual, winter type of caraway (*Carum carvi* L.). Acta Phsiol. Plant 31:21-31.

Tawfik AA, Noga G (2001) Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and internodal stem explants of cumin. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 66(2): 141-147.

Valizadeh M, Tabar SKK, Nematzadeh GA (2007) Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Med. Plant 1(2): 48-53.

Valizadeh M, Safarnejad A, Nematzadeh G, Kazemitabar SK (2008) Regeneration of plantlets from embryo explants of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Sci. Technol. Agric. Nat. Resour. 11(42(A): 33-39.

Valizadeh M, Tabar SKK (2009) Investigation of Plant Growth Regulators Effects on Callus Induction and Shoot Regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Agric. Sci. and Technol. 11(4): 481-486.