مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات
جلد ١٤، شماره ١، بهار ١٣٩٧، صفحات ٧١-٦٣

ISSN NO: 2008-8485

بهینه‌سازی کالوس‌زایی در گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa* L.)

Optimization of callus induction in black seed (*Nigella sativa* L.)

سحر قره خانی[1]، پریسا عبداللهی[2*]، منصور امیدی[3]

تاریخ دریافت: ١٣٩٦/٠٧/٢١ تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/٠٩/٢٠

چکیده

سیاه دانه یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده آلاله است. این گیاه حاوی ترکیبات دارویی متنوعی می‌باشد که به‌عنوان پیش ماده تولید انواع داروها در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. با در نظر داشتن ارزش دارویی بسیار بالای این گیاه، مطالعات بسیار محدودی در زمینه کشت بافت آن انجام شده است. در مطالعه حاضر، میزان کالوس‌زایی ریزنمونه تهیه شده از برگ، مریستم و ساقه سیاه دانه روی محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D به‌ترتیب در سه سطح ٠/١، ٠/٢ و ١ میلی‌گرم و ١، ٢ و ٤ میلی‌گرم بررسی گردید. اثر هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد به صورت یک آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. پس از هر دوره واکشت صفات وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش عامل تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه برای صفات مورد مطالعه در واکشت اول و دوم معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین حاکی از آن بود که بهترین تیمار در واکشت اول و دوم BAP متعلق به ریزنمونه برگ در غلظت ١ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌ترتیب با وزن تر ٠/٢٦٦ و ٠/٢٢٤ گرم بود. در تنظیم‌کننده رشد 2,4-D بهترین تیمار متعلق به ریزنمونه برگ در غلظت ٤ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب با وزن تر ٠/٢٣٣ و ٠/٧٦٦ گرم مشاهده شد.

کلمات کلیدی :ریزنمونه، تنظیم‌کننده رشد، مریستم، گیاهان دارویی.

www.iapb.kiau.ac.ir

١-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

٢- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

٣- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

*- مکاتبه کننده: E- mail: abdollahi@srbiau.ac.ir

مجله علمی- پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

مقدمه

سیاه دانه گیاهی یک ساله و علفی از راسته گل‌های ساعت (Ranunculales) و تیره آلالگان (Ranunculace) است (فلاح حسینی، ۱۳۹۰). گیاه سیاه دانه در مناطق مختلف جنوب غرب آسیا، اروپا و شمال آفریقا بومی شده و کشت می‌شود و در ایران نیز در اراک و اصفهان می‌روید (فارماکوپه، ۱۳۸۱).

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان دراز ازآن‌ها استفاده نموده است و درحال حاضر نیز نه تنها ارزش خود را در زمنیه تولید دارو ازدست نداده‌اند بلکه اهمیت آن‌ها نیز فزونی یافته است البته روش‌های تکثیر رویشی در شرایط طبیعی در برخی موارد کارآمد نبوده و روش جدیدی ازکشت گیاهان تحت عنوان کشت سلول و بافت گیاهی معرفی و ارائه شده است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲). سیاه دانه از جمله گیاهان دارویی است که می‌توان از آن به‌عنوان جایگزین داروهای شیمیایی همچون متفورمین، اسپیرونولاکتون، آتورواستاتین، کینیدین و ... با عوارض کمتر و در برخی موارد به‌عنوان تنها درمان مؤثر استفاده کرد. داروهای گیاهی استخراج شده از این گیاه به اندازه‌ای فراوان است که از آن به‌عنوان یک گیاه معجزه آسا یاد می‌شود (Huseini *et al*., 2003; Salem, 2000; Mahmoud; 1993). دانه‌های *Nigella sativa* طیف گسترده‌ای از خواص پزشکی را دارا هستند که شامل اثرات ضد آلرژی، ضد التهاب، ضد اکسیدانی، شلی و انقباض ماهیچه‌ها، ضد سرطان و ضد میکروبی می‌باشد (Dahri *et al*, 2005; Boskabady *et al*., 2004; Kalus *et al*., 2003; Mohamed, 2003; Shinwari, 2008). از دانه این گیاه به‌عنوان چاشنی و در طب سنتی در طول تاریخ و در فرهنگ‌های مختلف استفاده شده است (Botnick *et al*., 2012). برای کشت کالوس ضروری است که از محیط کشت حاوی مواد مغذی با غلظت بالای اکسین یا نسبت مناسب اکسین به سایتوکنین استفاده کرد. سایتوکنین‌ها القای تقسیم سلولی را گسترش می‌دهند در صورتی که اکسین برای رشد طولی سلول مساعد است (Sharma *et al*., 2011).

اولین مشاهدات در زمینه کالوس‌دهی سیاه دانه در کشت‌های آزمایشگاهی مربوط به ریخت‌زایی از بافت‌های مختلف سیاه دانه بود، که برای تولید کالوس از ریزنمونه‌های ریشه، ساقه و برگ سیاه دانه کشت شده در محیط وایت (White) حاوی NAA و شیر نارگیل استفاده شد (Banerjee & Gupta, 1975).

تولید کالوس روش سودمندی برای تولید گیاهان دارویی از جهت حفظ ذخایر ژنتیکی، تکثیر این گیاهان و تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه است. تیمول، تیموکینون و هیدروتیموکینون از مواد مؤثره مهم عصاره دانه سیاه دانه بوده که جزء گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه یعنی ترپن‌ها می‌باشند(Morikawa *et al*., 2004). تیموکینون از ترکیبات اصلی بذر گیاه سیاه دانه است و اثرات درمانی بالایی دارد.

با توجه به ارزش دارویی بسیار بالای این گیاه و اهمیت آن در صنایع داروسازی تاکنون گزارش‌های زیادی در زمینه کشت کالوس و ریزازدیادی آن در شرایط درون شیشه‌ای، ارائه نشده است (AL-Majed *et al*., 2006). در گیاهان عمدتاً به‌منظور کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های برگ، ساقه و مریستم استفاده شده است (عالمی، ۱۳۹۰؛ امیدی، ۱۳۹۳). در اکثر مطالعات برای کالوس‌زایی در انواع گیاهان از تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP در غلظت‌های مختلف استفاده شده است (Salehiyan *et al*., 2012; Faezi *et al*., 2017).

بهینه‌سازی فرآیند کشت بافت می‌تواند برای انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی از جمله دست‌ورزی‌های ژنتیکی مانند تراریختی، تغییر سطوح پلوییدی، مهندسی متابولیک مسیرهای بیوسنتزی انواع متابولیت‌های ثانویه مهم در سیاه دانه مفید باشد. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین شرایط بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP و ریزنمونه‌های مختلف جهت کالوس‌زایی گیاه سیاه دانه در شرایط درون شیشه‌ای پایه‌ریزی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مجتمع آزمایشگاه رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران صورت پذیرفت. بذر سیاه دانه از هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی واقع در کرج تهیه شد. در ابتدا بذرها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول آب و مایع ظرفشویی شسته و سپس به زیر هود لامینار منتقل و ۳۰ ثانیه با الکل ۷۰٪ و ۱۰ دقیقه با وایتکس ۱٪ استریل شدند. سپس چندین بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بذور استریل شده به‌منظور جوانه زنی روی محیط‌های کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد قرار داده شدند و به اتاق کشت با دمای ۲۰-۲۱ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. با سپری شدن حدود ۳۰ روز پس از کشت بذور امکان استفاده از گیاهچه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی میسر گردید (شکل ۱). بعد از جوانه زدن بذور از بخش‌های ساقه، برگ و مریستم گیاهچه برای بررسی کالوس زایی ریزنمونه تهیه شد. این ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و تنظیم‌کننده رشد BAP (۰/۱، ۰/۲و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH ۵/۸ کشت

jpb.kiau.ac.ir

گردیدند. ریزنمونه‌ها پس از قرارگیری در محیط کشت ذکر شده چهار هفته در اتاق کشت قرار داده شدند و سپس واکشت اول ریزنمونه‌ها صورت گرفت و مجدداً بعد از گذشت چهار هفته واکشت دوم ریزنمونه‌ها انجام شد و در هر مرحله وزن تر و خشک کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل برای هر کدام از تنظیم‌کننده‌های رشد در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. از نرم افزار آماری Mstat-C جهت تجزیه-وتحلیل داده‌های حاصل از آزمایش بهره برده شد.

شکل۱-گیاهچه‌های حاصل از بذور سیاه دانه در محیط کشت پایه MS جهت تهیه ر یزنمونه

Figure 1. Black seed seedlings for preparation of explant in MS medium.

نتایج

اثر تنظیم‌کننده رشد BAP

نتایج حاصل از انجام تجزیه واریانس صفات مرتبط با کالوس‌زایی تحت تأثیر تنظیم‌کننده رشد BAP در واکشت اول و دوم به‌ترتیب در جدول‌های ۱ و۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی‌داری میان سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد در سطح احتمال ۱ درصد برای صفات مورد بررسی در واکشت اول ملاحظه گردید. که این بیان‌گر متفاوت بودن تأثیر سطوح مختلف BAP روی صفات مذکور تحت این تیمار هورمونی در واکشت اول بود. اما در واکشت دوم این عامل برای تمامی صفات مورد مطالعه غیر معنی‌دار شد (جدول ۲). عامل ریزنمونه در هر دو واکشت برای وزن تر کالوس و وزن خشک کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد و نشان داد که نوع ریزنمونه، کالوس‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (جدول‌های ۱ و ۲). برهمکنش تنظیم‌کننده رشد BAP و ریزنمونه‌ها در واکشت اول و دوم معنی‌دار شد که با توجه به معنی‌دار شدن برهمکنش تنظیم‌کننده رشد با ریزنمونه و اهمیت بالای آن نسبت به اثرات اصلی، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد جهت انجام مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد (جدول‌های ۳ و ۴). نتایج مقایسه میانگین حاکی از آن بود که تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه برگ (۰/۲۶۳ گرم) و تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP با ریزنمونه ساقه (۰/۲۵۲ گرم) برای واکشت اول و تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه برگ (۰/۲۲۴ گرم) برای واکشت دوم درصفت وزن تر کالوس نسبت به سایر ترکیبات تیمارها عکس‌العمل مطلوبی دارند. برای صفت وزن خشک کالوس تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP با ریزنمونه ساقه (۰/۰۱۳ گرم) و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه برگ (۰/۰۱۳۵ گرم) به ترتیب در واکشت اول و دوم بهترین پاسخ را داشتند. صفات وزن تر (۰/۰۶۲ گرم) و خشک (۰/۰۰۲ گرم) در تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ریزنمونه مریستم مطلوب‌ترین عکس العمل را در واکشت اول از خود بروز ندادند. ویژگی وزن تر در واکشت دوم عکس‌العمل مناسبی در تیمارهای ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP با ریزنمونه مریستم (۰/۰۸۳ و ۰/۰۹۸ گرم) نداشت. وزن خشک کالوس (۰/۰۰۴ گرم) نیز عکس‌العمل مشابه با وزن تر در واکشت دوم نشان داد.

اثر تنظیم‌کننده رشد 2,4-D

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات وزن تر و وزن خشک کالوس برای واکشت اول و دوم به‌ترتیب در جدول ۵ و ۶ ارائه شده است. در واکشت اول، عامل 2,4-D برای صفات وزن تر و وزن خشک کالوس به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار شد. در واکشت دوم اختلاف معنی‌داری میان سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در سطح احتمال ۱ درصد برای صفات وزن تر و خشک کالوس ملاحظه گردید (جدول ۵). نتایج حاصل از انجام تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P<0.001$) در عامل ریزنمونه برای صفات وزن تر و خشک کالوس در واکشت اول و دوم وجود دارد به بیان دیگر با تغییر نوع ریزنمونه، صفات ذکر شده پاسخ‌های مختلفی را از خود بروز می‌دهند (جدول‌های ۵ و ۶). برهمکنش تنظیم‌کننده رشد 2,4-D با ریزنمونه‌ها برای تمامی صفات مورد مطالعه در واکشت اول و دوم معنی‌دار شد، در حقیقت سطوح مختلف عامل‌ها بر یکدیگر تأثیر گذار می‌باشند. نتایج مقایسه میانگین (جدول‌های ۷ و ۸) مؤید این بود که برای صفت وزن تر، تیمار ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ریزنمونه ساقه در واکشت اول (۰/۲۳۳ گرم) و دوم (۰/۷۶۶ گرم) به‌عنوان بهترین ترکیب تیماری معرفی شد.

جدول١-نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در واکشت اول BAP

Table 1. Analysis of variance results of studied traits in first subculture BAP

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
BAP	2	0.0064**	0.00002**
Explant	2	0.0215**	0.00009**
BAP×Explant	4	0.0123**	0.00002**
Error	18	0.0004	0.000001
CV (%)		13.66	14.93

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی دار

.*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant respectively

جدول٢-نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در واکشت دوم BAP

Table 2. Analysis of variance results of studied traits in second subculture BAP

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
BAP	2	0.0012ns	0.000007ns
Explant	2	0.0197**	0.00008**
BAP×Explant	4	0.0026**	0.00001**
Error	18	0.0088	0.000001
CV (%)		14.54	14.72

*، ** و ns: معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد وغیر معنی دار

.*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant respectively

جدول٣-نتایج مقایسه میانگین تیمارها در واکشت اول BAP

Table 3. Mean comparison results of treatments in first subculture BAP

BAP	ریزنمونه Explant	وزن تر کالوس Fresh weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1 mg.l^{-1}	Shoot	0.107cde	0.006d
	Leaf	0.263a	0.0126ab
	Meristem	0.062e	0.002e
0.2 mg.l^{-1}	Shoot	0.252a	0.013a
	Leaf	0.168b	0.0105ab
	Meristem	0.147bcd	0.008cd
0.1 mg.l^{-1}	Shoot	0.158bc	0.0116ab
	Leaf	0.163b	0.010bc
	Meristem	0.102de	0.0056d

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

In each column, means with at least one common letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test

جدول۴-نتایج مقایسه میانگین تیمارها در واکشت دوم BAP

Table 4. Mean comparison results of treatments in second subculture BAP

BAP	ریزنمونه Explant	وزن تر کالوس Fresh weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1 mg.l^{-1}	Shoot	0.179abc	0.01bc
	Leaf	0.224a	0.0135a
	Meristem	0.083e	0.004e
0.2 mg.l^{-1}	Shoot	0.156bcd	0.0083cd
	Leaf	0.146cd	0.0083cd
	Meristem	0.114de	0.0063de
0.1 mg.l^{-1}	Shoot	0.198ab	0.011ab
	Leaf	0.173bc	0.0103bc
	Meristem	0.098e	0.00466e

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

In each column, means with at least one common letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test

همچنین در واکشت اول تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ریزنمونه ساقه (۰/۰۱۲۵ گرم) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ریزنمونه برگ (۰/۰۱۲۳ گرم) و در واکشت دوم تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ریزنمونه ساقه (۰/۰۳۵ گرم) دارای وزن خشک

www.iapb.ilau.ac.ir

مطلوبی بودند. ضعیف‌ترین کالوس‌زایی در واکشت اول برای صفت وزن تر کالوس متعلق به تیمار ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با ریزنمونه ساقه به ترتیب به وزن ۰/۰۰۲۱ و ۰/۰۶۳۳ گرم و در واکشت دوم متعلق به ریزنمونه مریستم به ترتیب به وزن ۰/۰۹۵ و ۰/۰۷۴ گرم بود. برای صفت وزن خشک کالوس در واکشت اول تیمار ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D با وزن ۰/۰۰۲۱ گرم و در واکشت دوم تیمار ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به ترتیب به وزن ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۵ گرم با ریزنمونه مریستم عکس العمل مطلوبی از خود نشان نداند.

جدول۵-نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در واکشت اول 2,4-D

Table 5. Analysis of variance results of studied traits in first subculture 2,4-D

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
2,4-D	2	0.0024^{ns}	0.00001**
Explant	2	0.0348**	0.00011**
2,4-D×Explant	4	0.0075**	0.00001**
Error	18	0.0003	0.000001
CV (%)		13.29	14.26

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

.*, ** and ^{ns}: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant respectively

جدول۶-نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در واکشت دوم 2,4-D

Table 6. Analysis of variance results of studied traits in second subculture 2,4-D

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	وزن خشک Dry weight
2,4-D	8	0.1565**	0.0003**
Explant	2	0.1884**	0.0004**
2,4-D×Explant	4	0.0804**	0.0001**
Error	18	0.0009	0.000002
CV (%)		11.18	11.65

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و غیر معنی‌دار

.*, ** and ns: Significant at 5 percent, 1 percent and non- significant respectively

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین تیمارها در واکشت اول 2,4.D

Table 7. Results of comparison of mean treatments in first subculture 2,4-D

2,4-D	ریزنمونه Explant	وزن تر کالوس Fresh weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1 mg.l^{-1}	Shoot	0.125cd	0.0073cd
	Leaf	0.211ab	0.0123a
	Meristem	0.049e	0.0021e
2 mg.l^{-1}	Shoot	0.215ab	0.012ab
	Leaf	0.166bc	0.0115ab
	Meristem	0.0633e	0.0048de
4 mg.l^{-1}	Shoot	0.233a	0.0125a
	Leaf	0.138cd	0.0086bc
	Meristem	0.112d	0.0066cd

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

In each column, means with at least one common letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین تیمارها در واکشت دوم 2,4-D

Table 8. Results of comparison of mean treatments in second subculture 2,4-D

2,4-D	ریزنمونه Explant	وزن تر کالوس Fresh weight	وزن خشک کالوس Dry weight
1 mg.l^{-1}	Shoot	0.178d	0.0111c
	Leaf	0.23cd	0.012c
	Meristem	0.095e	0.004d
2 mg.l^{-1}	Shoot	0.28bc	0.014c
	Leaf	0.336b	0.02b
	Meristem	0.074e	0.005d
4 mg.l^{-1}	Shoot	0.766a	0.035a
	Leaf	0.305bc	0.018b
	Meristem	0.192d	0.011c

در هر ستون اعداد دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

In each column, means with at least one common letter are not significantly different based on Duncan's multiple range test

www.iapti.ut.ac.ir

بحث

یکی از مراحل اساسی در استفاده موفق از روش‌های مدرن در اصلاح ژنتیکی گیاهان دارویی، تولید کالوس‌های با کیفیت (کالوس‌های سبز رنگ و سفت) می‌باشد (Khalafalla *et al*., 2010). در این تحقیق کالوس‌های به‌دست آمده از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D سبز رنگ و با ساختار کروی و سفت بودند. تولید کالوس را می‌توان در سیاه دانه در یک دوره زمانی کوتاه و در شرایط کنترل شده به‌دست آورد که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ جوان گیاهان اغلب دارای میزان رشد مناسب و قابل قبولی می‌باشند (Alemi *et al*., 2013). در گیاه سیاه دانه ریزنمونه‌های حاصل از بافت برگ دارای سرعت کالوس‌زایی بیشتری نسبت به سایر قسمت‌ها می‌باشد (Chand & Roy, 1980) که نتایج آزمایش حاظراین موضوع را مورد تأیید قرار داد.

جهت کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های برگ، ساقه و مریستم سیاه دانه، وجود تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین ضروری است که تمام ترکیبات هورمونی در این تحقیق برای ریزنمونه‌های مذکور کالوس‌دهی را به‌همراه داشت و تغییر مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D، تفاوت چشم‌گیری در روند کالوس‌زایی اعمال می‌کند که مطالعات متعددی در این رابطه وجود دارد که تأیید کننده نتایج آزمایش حاضر است (ایزدی صادق ابادی و همکاران، ۱۳۹۲؛ سبحانی‌زاد و همکاران، ۱۳۹۶؛ حسین پناهی و همکاران، ۱۳۹۵).

همان طورکه گفته شد غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و BAP بر تولید کالوس در محیط کشت پایه MS تأثیر به‌سزایی دارد و پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به تنظیم کننده‌های رشد متفاوت است که علت این امر می‌تواند وجود سیتوکینین یا هورمون‌های طبیعی داخلی گیاه و همچنین تفاوت پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف بذر سیاه دانه باشد. طبق مطالعات انجام شده مهم‌ترین سیتوکینین در القاء کالوس BAP می‌باشد که اغلب غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، برای تولید کالوس استفاده می‌شود (Omidi and Seyed Tabatabaie, 2009). در این پژوهش نیز غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تولید کالوس دارای کارایی بالایی بود و بهترین کالوس‌دهی در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BAP در واکشت اول و دوم متعلق به ریزنمونه برگ (شکل۳) بود. مجد و همکاران (۱۳۹۴) اذعان نمودند با افزایش غلظت BAP در ریزنمونه برگ میزان کالوس دهی افزایش می‌یابد این نتایج تا حدودی با نتایج حاصل از آزمایش حاضر مطابقت داشت. به‌طور کلی کاربرد BAP تأثیر مثبتی بر روی ایجاد کالوس و حتی وزن تر کالوس داشت تا جایی که با افزایش غلظت این سایتوکینین مقدار وزن تر کالوس افزایش یافت.

در پژوهشی که توسط منا و همکاران (Meena *et al*., 2017) روی سیاه دانه انجام شد، مشاهده شد که محیط کشت حاوی 2,4-D به تنهایی جهت تولید کالوس مؤثر است و بهترین کالوس‌دهی در تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در واکشت اول و دوم متعلق به ریزنمونه ساقه (شکل۲) بود.

شکل۲-کالوس حاصل از ریزنمونه ساقه در ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
Figure 2. Callus of stem explant in 4 mg/l 2,4-D

شکل ۳- کالوس حاصل از ریز نمونه برگ در ۱ میلی‌گرم BAP
Figure 3. Callus of leaf explant in 1 mg/l BAP

در این رابطه مطالعات متعددی وجود دارند که صحت این نتیجه را تأیید می‌کنند (Sujatha *et al*., 2007; Basalma *et al*., 2008; Georges *et al*., 1993; Raha *et al*., 2003; Mandal 2001).

با توجه به ارزش بالای گیاه سیاه دانه در زمینه پزشکی و داروسازی می‌توان از طریق کشت بافت برای تولید بیشتر این گیاه بهره برد. با توجه به کوتاه بودن دوره زمانی تولید کالوس در سیاه دانه، استفاده از تکنیک کشت بافت برای تولید ماده مؤثره تایموکینون از لحاظ اقتصادی و زمانی بسیار مقرون به‌صرفه می باشد. به‌طوری که با استفاده از کشت درون شیشه‌ای این گیاه، دسترسی به منبع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و تولید و افزایش ترکیبات جدید نیز امکان‌پذیر می‌گردد و لازمه این فرایند دستیابی به یک روش مناسب جهت کالوس‌دهی در سیاه دانه می‌باشد.

www.ppb.kiau.ac.ir

فهرست منابع **References**

حسینی، ا.ح. امیری فدردی، ر و رستم پورکاریزکی. ۱۳۹۲. نقش کشت بافت در بهبود تکثیر گیاهان دارویی.سیلویکیا.۹

ایزدی صادق آباد، ع. خلیقی، ا. قاسمی پیربلوطی، ع و تقی پوردهکردی. ۱۳۹۲. ریز ازدیادی (کشت درون شیشه) کلیماتیس. داروهای گیاهی. سال چهارم. شماره ۱. ص ۴۸-۴۳.

فلاح حسینی، ح. محتشمی، ر. صادقی، ز. سعیدی، ی و فلاح حسینی. ۱۳۹۰. مروری بر اثرات فارماکولوژیک دانه گیاه سیا ه دانه. فصلنامه گیاهان دارویی ۳۸.

حسین پناهی، س. مجدی، م و میرزاقادری. ۱۳۹۵. اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه سیاه دانه. مجله تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. دوره ۲۴. شماره ۲. ص ۲۴۲-۲۳۲

سبحانی‌زاد، ع. سلوکی، م و فاضلی نسب. ۱۳۹٦. بهینه‌سازی کالوس‌زایی و تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی سیاه دانه در شرایط آزمایشگاهی. مجله سلول و بافت. جلد ۸ شماره ۲. ص ۱۸۵-۱۶۵

سبحاوی ساد، ع. سلوکی، م و فاضلی نسب. ۱۳۹٦. بهینه سازی کالوس زایی و تاثیر الیسیتور های زیستی و غیر زیستی برمیزان ترکیبات فنولی وفلاونوییدی سیاه دانه در شرایط آزمایشگاهی. مجله سلول و بافت، جلد۸، شماره۲

فارماکوپه‌ی گیاهان ایران. ۱۳۸۱. بخش دوم، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، ، ص ۴۶۸-۴

عالمی، م. سنجریان، ف. حق بین، ک. ا و صابونی. ۱۳۹۰. بررسی کالوس زایی از بخشهای مختلف گیاه سیاه دانه. سیلویکیا.۶

مجدی، م. ۱۳۹٤. القای درون شیشه‌ای تتراپلوییدی در گیاه دارویی سیاه دانه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه کردستان.

خدایاری، م. امیدی، م. شاهنجات بوشهری، ع. ا. نقوی، م. ر. داراب یزدانی و کد خدا. ۱۳۹۳. "اثر الیسیتور زیستی و نانوالیسیتور بر افزایش تولید برخی آلکالوییدها دها در گیاه خشخاش"(*Papaver somniferum* L). *علوم باغبانی ایران*, پاییز: ۲۹۵-۲۸۷.

میرنیام، ا. ۱۳۸۹. بررسی تنظیم برخی تنظیم‌کننده‌های رشد بر اندام زایی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) .پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی .دانشگاه شهرکرد.

Alemi, M., F. Sabouni, F. Sanjarian, K. Haghbeen and S. Ansari. 2013. Anti-inflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. AAPS PharmSciTech, 14:160-167.

Al-Majed, A. A., F. A. Al-Omar and M. N. Nagi. 2006. Neuroprotective effect of thymoquinone against directshoot bud differentiation on hypocotyl segment scientia Horticulture, 99: 89-98

Banerjee, S and S. Gupta. 1975. Morphogenesis in tissue cultures of different organs of *Nigella sativa*. Physiologia plantarum, 33: 185-187

Basalma. D., S. Uranbey, S. Mirici and O. Kolsarici. 2008. TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African J. Biotech. 7(8): 960-966

Boskabady M. H., B. Shirmohammadi, P. Jandaghi and S. Kiani. 2004. Possible mechanism (s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. BMC. Pharmacol; 4: 3 - 7.

Botnick, I., W. Xue, E. Bar, M. Ibdah, A. Schwartz, D. M. Joel, E. Lev, A. Fait and E. lewinsohn. 2012. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. Molecules, 17:10159-10177

www.iapb.kiau.ac.ir

Chand, S., and S. C. Roy. 1980. Study of callus tissues from different parts of *Nigella sativa* (Ranunculaceae). Experientia, 36: 305-306.

Dahri, A .H., A. M. Chandiol, A. A. Rahoo and R. A Memon. 2005. Effect of *Nigella sativa* (kalonji) on serum cholesterol of albino rats. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad; 17 (2): 72 - 4

Faezi, E., M. Omidi and P. Abdollahii. 2017. Effect of growth regulators on callus induction in Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). Journal of Agronomy and Plant Breeding. 13(1): 83-93

Georges, D., J. C. Chenieux and S.J. Ochatt. 1993. Plant regeneration from aged callus of the woody ornamental species, *Lonicera japonicacv*. 'Halls Prolific', Plant Cell Reproduction, 13: 91–94

Huseini, H.F., B. Larijani, H. Fakhrzadeh, B. Radjabipour, T. Toliat and M. Reza. 2003. The efficacy of *Silybum marianum* Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Photother. Res.; 20 (12) 1036 – 9

Kalus, U., A. Pruss, J. Bystron, M. Jurecka, A. Smekalova and J. J. Lichius. 2003. Effect of *Nigella sativa* (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. Phytother. Res; 17: 1209 – 14.

Khalafalla, M. M., K. G. Elaleem, and R. S. Modawi. 2010. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Almera. Journal of Phytology,2:40–46.

Sarýhan, K. M. E., C. Sevimay and S. Cocu. 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Period Biol. 107: 113-116.

Mahmoud B. 1993. The relaxing effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on vascular smooth muscle. Dirasat Series B Pure Appl. Sci.;19;91-100

Mandal, A. K. H and S. D. Gupta. 2001. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. In Vitro Cell. Dev. Bio-Plan. 37: 50-54.

Meena, R., M. K. Meena, N. Singh, P. Mishra and V. Patni. 2017. Callus Induction and its Comparative Biochemical Studies from Seeds of *Nigella sativa* L. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives 2017; 8(3): 23-27.

Mohamed, A., A. Shoker., F. Bendjelloul, A. Mare, M. Alzrigh and H. Benghuzzi. 2003. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. Biomed. Sci. Instrum; 39: 440 – 5

Morikawa, T., F. Xu. K. Ninomiya, H. Matsuda and M. Yoshikawa. 2004. Nigellamines A3, A4, A5, and C, new dolabellance-type diterpene alkaloids,with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin, chemical and pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 52:494-497.

Omidi, M., and B. A. Seyed-Tabatabaie. 2009. Plant Cell and Tissue Culture, Tehran University Press,Tehran, 376 pp.

Raha, S and S. C. Roy. 2003. Efficient plant regeneration in *Holarrhena antidysenterica* Wall., from shoot segment derived callus, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 39: 151–155.

Salehiyan Aghbal, H., N. A. Babaiean Jelodar, Gh.A. Ranjbar and N. A. Bagheri. 2012. The effect of growth regulators on callus and regenerated several varieties of plant breeding rice. Modified Crops Research 10 (4) 93-80.

Salem, M.L and M. S. Hossain. 2003. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. Int. J. Immunopharmacol; 22 (9): 729 – 40.

Sharma, S., N. Kumar and M. P. Reddy. 2011. Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of in vitro regeneration. Industrial Cropsand Products 1-9: doi:10.1016/j.indcrop.2011.02.017.

Shinwari, N., J. Arif, N. Al-Sanea, A. A. Jabbar, R. El-Sayed, A. Mashhour, G. Billedo, I. El-Doush and I. Al-Saleh. 2008. Role of *Nigella sativa* and a number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats. Phytother. Res; 22 (10): 1311 – 23

www.iarb.kiau.ac.ir

ISSN NO: 2008-8485

Journal of Agronomy and Plant Breeding
Vol 14. No. 1, 2018

Optimization of callus induction in black seed (*Nigella sativa* L)

S. Gharekhani[1], P. Abdollahii[2*], M. Omidi[3]

Received date: 11 October 2018 Accepted date: 13 December 2017

Abstract

Black seed is one of the most important medicinal plant in the family Alaleh. This plant content of different medicinal compounds which is used to produce a variety of medications for the treatment of diseases. According to the value of the medications of this plant, limited studies have been done on tissue culture. In the present study, the rate of callus induction was provided of leaf, meristem and shoot of black seed on medium culture MS containing of growth regulator BAP and 2,4-D, respectively in three levels of 1, 2 and 4 mg/l of 2,4-D hormone and 0.1, 0.2 and 1 mg/l of BAP hormone was investigated. Each of growth regulator was studied as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications on MS medium. After each subculture period traits fresh weight and dry weight were measured. The result of analysis of variance showed that interaction of growth regulators and explant for the studied traits first and second subculture were significant. The result of comparison of mean showed that the best treatment in first and second subculture BAP hormone belongs to leaf explant in concentration 1 mg/1 were fresh weight 0.266 and 0.224 g respectively. In growth regulator 2.4-D was observed the best treatment belongs to leaf explant in concentration 4 mg/l were fresh weight 0.233 and 0.766 g respectively.

Keywords: Growth regulators, Meristem, Medicinal plant, Explant

www.iapb.kiau.ac.ir

1- MSc student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agricultural and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran.
* Corresponding author: abdollahi@srbiau.ac.ir

Iranian Journal of Agronomy & Plant Breeding Islamic Azad University, Karaj Branch