

## باززایی زیره پارسی (*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.) با استفاده از

### ریزنمونه محور جنینی

محمود ولیزاده<sup>۱</sup>، عباس صفرنژاد<sup>۲\*</sup>، قربانعلی نعمت زاده<sup>۱</sup> و سید کمال کاظمی تبار<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۸۵/۱/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۴)

#### چکیده

زیره پارسی که به آن زیره سیاه یا زیره کوهی نیز گفته می‌شود، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی بوده و ارزش اقتصادی بالایی دارد. به‌طور کلی اطلاعات محدودی در ارتباط با کشت این ویترو این گیاه وجود دارد. در این پژوهش برای اولین بار از ریزنمونه محور جنینی برای باززایی زیره پارسی استفاده شد. محیط کشت B5 (گامبورگ) حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA (نفتالن استیک اسید)، 2,4-D (۲-۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید) به تنهایی یا همراه با Kin (کینتین) مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تیمار مختلف و ۱۰ تکرار در هر تیمار انجام شد. بیشترین تعداد ریزنمونه تولید کننده کالوس مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی 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 بود. در تعدادی از تیمارهای فاقد کینتین نیز باززایی صورت گرفت که نشان داد، برای باززایی زیره پارسی وجود هورمون سیتوکینین الزامی نیست. بهترین تیمار از لحاظ میانگین تعداد ساقه باززایی شده، تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. بیشترین فراوانی القای جنین سوماتیکی مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. در این روش به دلیل جوان بودن ریزنمونه و عکس‌العمل مناسب به محیط کشت، کالوس دهی و باززایی فقط در یک نوع محیط کشت و بدون نیاز به هیچ‌گونه واکنشی صورت گرفت که منجر به کوتاه شدن زمان کشت بافت و کم شدن آلودگی و نیاز به مواد مصرفی شد.

واژه‌های کلیدی: باززایی، زیره پارسی (زیره کوهی یا زیره سیاه) *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.، کشت بافت، محور جنینی

#### مقدمه

خراسان، کرمان، شرق زاگرس تا بندر عباس و جنوب البرز به‌طور خودرو وجود دارد. این گیاه از گیاهان دارویی مهم بوده و به‌طور گسترده در صنایع دارویی و آرایشی به‌کار رفته و دارای ارزش ادویه‌ای نیز می‌باشد. خفتگی موجود در بذر زیره

زیره پارسی که به آن زیره سیاه یا زیره کوهی نیز گفته می‌شود، یکی از گیاهان خانواده چتریان (Umbeliferae) و بومی منطقه محدودی از غرب آسیاست. در ایران در نواحی شمالی استان

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری

۲. عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sebre14@yahoo.com

سیاه یکی از موانع گسترش کشت این محصول است. این خفتگی از نوع خفتگی رویان بوده و تنها استفاده از تیمار سرمایی می‌تواند باعث جوانه زنی شود و سایر تیمارها مانند اسید جیبرلیک، سیتوکینین، اتفون، نیترات پتاسیم، آبشویی و تیمارهای نوری نمی‌تواند باعث جوانه زنی بذرها را این گیاه گرداند (۲). عدم رشد دانه‌های این گیاه بعد از رسیدن به مرحله ظهور لپه و هم‌چنین بیماری‌های بلایت و پوسیدگی ریشه که عامل آن فوزاریوم (*Fusarium solani*) می‌باشد، باعث ایجاد محدودیت در کشت این گیاه شده است.

اصلاح گیاهان این خانواده از طریق روش‌های کلاسیک عموماً کند، پر زحمت و زمان بر بوده و تنوع ژنتیکی لازم برای اصلاح برخی ویژگی‌ها محدود می‌باشد (۸).

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 بوده که کالوس‌دهی و باززایی هم‌زمان به این مسأله کمک می‌کند. به‌طور کلی اطلاعات محدودی در ارتباط با کشت این ویترو زیره پاریسی وجود دارد.

واخلو (۱۱) از کشت مریکارپ‌های زیره پاریسی در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin، کالوس به‌دست 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 گردید. 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 ریشه دار ایجاد گردیدند. شریفی (۴) از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای در کشت بافت زیره پاریسی استفاده کرد. کالوس

حاصل از هیپوکوتیل زیره پاریسی در محیط B5 حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin رشد سریعتری داشت. تشکیل جوانه و ساقه در هیپوکوتیل، در ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و تشکیل جنین‌های سوماتیکی در محیط MS حاوی ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشتر بود. زیارت نیا (۳) برای ایجاد کالوس‌های جنین‌ها از غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D و NAA به‌طور 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 غیر جنسی 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. ابراهیمی و همکاران (۶) از محور جنینی (جنین برش یافته) در کشت بافت زیره سبز استفاده کردند و در زمان کوتاه و بدون هیچ‌گونه واکنشی، به باززایی مناسبی دست یافتند. بهترین محیط کشت، B5 با ترکیب هورمونی ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر IAA (ایندول استیک اسید) و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (بنزیل آمینوپورین) یا ترکیب هورمونی ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

همان‌طور که ذکر شد در روش‌های قبلی در ارتباط با باززایی زیره پاریسی، معمولاً از ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون استفاده شده است که به‌دلیل مسن بودن بافت نسبت به جنین، عکس‌العمل خوبی نسبت به محیط کشت نشان نداده و باعث طولانی شدن مدت کشت بافت، آلودگی بالا و نیاز به محیط‌های مختلف کالوس‌دهی و باززایی و مصرف بالای مواد شده که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. هدف از این آزمایش استفاده از محور جنینی در کشت بافت زیره پاریسی و ارائه محیط کشت مناسب جهت القای کالوس و باززایی می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

بذرهای زیره پاریسی جمع‌آوری شده از منطقه کلات واقع در

دانکن با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

## نتایج

اولین کالوس‌ها یک هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت مشاهده شدند و ۲۰ روز بعد باززایی رخ داد (شکل‌های ۱-۱ و ۱-۲). 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، بیشترین تعداد ریزنمونه تولید کننده کالوس مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin یا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ یا ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. بیشترین مقدار باززایی، هم از نظر تعداد گیاهچه باززایی شده در هر ریزنمونه و هم از لحاظ میانگین تعداد ساقه باززایی شده مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. در این تیمار در یکی از تکرارها تا ۲۰ گیاهچه شمارش شد. بهترین تیمار برای القای کالوس و باززایی و ریشه زایی به‌طور توأم، ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بود. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ریشه زایی اغلب در تیمارهای دارای هورمون NAA رخ داده است و در تیمارهای دارای هورمون 2,4-D ریشه زایی یا رخ نداده و یا میزان آن بسیار ناچیز است. هم‌چنین با افزایش غلظت هورمون NAA در اغلب موارد ریشه زایی افزایش یافته است. بیشترین مقدار ریشه زایی نیز در تیمار با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و یا ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin مشاهده شد (جدول ۱). هم‌چنین بیشترین جنین سوماتیکی در تیمار با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد (جدول ۱). جنین‌های سوماتیکی پس از انتقال به محیط کشت فاقد هورمون، رشد یافته و تولید ساقه نمودند (شکل ۱-۳). نتایج نشان داد که تأثیر تیمارها بر روی میزان القای کالوس و باززایی معنی دار بود (جدول ۲). در

استان خراسان رضوی، روی کاغذ صافی استریل مرطوب در داخل پتری دیش قرار گرفتند و به مدت ۲۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شدند. این دوره سرمادهی جهت رشد جنین و امکان پذیر شدن خروج آن از داخل بذر، ضروری است. پس از این مدت بذرها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سه بار در آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس نوک بذر با اسکالپل شماره ۱۰ استریل برش داده شده و با فشار روی وسط بذر، جنین به راحتی خارج گردید. در این آزمایش، با توجه به مطالعات قبلی (۴ و ۶) و پاسخ بهتر ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به سایر ریزنمونه‌ها، فقط قسمت هیپوکوتیل جنین برش داده شد و مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها روی محیط کشت B5 حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و هم‌چنین هورمون‌های تنظیم کننده رشد با غلظت‌های مختلف شامل NAA (۰، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا همراه با Kin (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. سپس کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و شدت روشنایی ۲۵۰۰ لوکس و به مدت ۱۶ ساعت در روز نگه‌داری شدند. در این تحقیق هیچ‌گونه واکنشی صورت نگرفت. در واقع القای کالوس و باززایی و تولید ریشه در یک نوع محیط کشت صورت گرفت. ۸ هفته پس از انتقال، تعداد ریزنمونه‌های تولید کننده کالوس و باززایی و تعداد ریشه‌ها و ساقه‌های باززایی شده در هر ریزنمونه در محیط کشت‌های مختلف ثبت شد. سپس فراوانی القای کالوس و باززایی، از تقسیم تعداد کالوس‌ها و باززایی به تعداد کل ریزنمونه‌ها به دست آمد و میانگین تعداد ریشه و ساقه باززایی شده نیز در تکرارهای مربوط به هر تیمار محاسبه شد.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۰ تیمار مختلف و ۱۰ تکرار در هر تیمار انجام گرفت. تجزیه آماری طرح و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم افزار SAS و Excel صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای



شکل ۱. القای کالوس، جنین سوماتیکی، ریشه و اندام زایی در ریزنمونه محور جنینی. ۱- گیاهچه باززایی شده از ریزنمونه محور جنینی پس از ۲۵ روز، ۲- کالوس حاصل از ریزنمونه محور جنینی پس از دو هفته، ۳- رشد جنین‌های سوماتیکی پس از انتقال به محیط فاقد هورمون، ۴- القای هم‌زمان کالوس، باززایی و ریشه (فلش)

جدول ۱. اثر تیمارهای هورمونی بر فراوانی القاء کالوس، ساقه، ریشه، جنین سوماتیکی و میانگین تعداد ساقه و ریشه

تیمار هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	فراوانی القاء ریشه	فراوانی باززایی ساقه	میانگین تعداد ریشه	میانگین تعداد ساقه	فراوانی القاء کالوس	فراوانی جنین سوماتیکی
۰/۱ NAA	۰/۵۸ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۱۷ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۵۸ <sup>a-e</sup>	۰/۱۷ <sup>bc</sup>
۰/۱ NAA+۰/۵ Kin	۰/۴۲ <sup>abc</sup>	۰/۱۷ <sup>ab</sup>	۱/۹۲ <sup>a-d</sup>	۰/۱۷ <sup>b</sup>	۰/۷۵ <sup>a-d</sup>	۰/۵ <sup>ab</sup>
۰/۱ NAA+۱ Kin	۰/۲ <sup>dc</sup>	۰/۲ <sup>ab</sup>	۰/۹ <sup>bcd</sup>	۰/۴ <sup>b</sup>	۰/۵ <sup>b-c</sup>	۰/۳ <sup>abc</sup>
۰/۱ NAA+۲ Kin	۰/۱۸ <sup>dc</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۷۳ <sup>dc</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۴۵ <sup>b-c</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>
۰/۱ NAA+۴ Kin	۰/۵ <sup>abc</sup>	۰/۳ <sup>ab</sup>	۱/۵ <sup>a-d</sup>	۴/۱ <sup>a</sup>	۰/۷ <sup>a-e</sup>	۰ <sup>c</sup>
۱ NAA	۰/۲۵ <sup>bdc</sup>	۰/۲۵ <sup>ab</sup>	۴/۳۳ <sup>a</sup>	۰/۷۵ <sup>b</sup>	۰/۷۵ <sup>a-d</sup>	۰/۲۵ <sup>abc</sup>
۱ NAA+۰/۵ Kin	۰/۴۵ <sup>abc</sup>	۰/۰۹ <sup>ab</sup>	۳/۵۵ <sup>abc</sup>	۰/۳۶ <sup>b</sup>	۰/۷۳ <sup>a-e</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>
۱ NAA+۱ Kin	۰/۴۴ <sup>abc</sup>	۰/۲۲ <sup>ab</sup>	۱/۶۷ <sup>a-d</sup>	۰/۶۷ <sup>b</sup>	۰/۷۸ <sup>a-d</sup>	۰ <sup>c</sup>
۱ NAA+۲ Kin	۰/۶ <sup>a</sup>	۰ <sup>b</sup>	۴/۳ <sup>a</sup>	۰ <sup>b</sup>	۱ <sup>a</sup>	۰/۲ <sup>bc</sup>
۱ NAA+۴ Kin	۰/۵۵ <sup>ab</sup>	۰/۱۸ <sup>ab</sup>	۲/۸۲ <sup>a-d</sup>	۰/۳۶ <sup>b</sup>	۱ <sup>a</sup>	۰ <sup>c</sup>
۲ NAA	۰/۴۵ <sup>abc</sup>	۰/۲۷ <sup>ab</sup>	۳/۷۳ <sup>ab</sup>	۰/۶۴ <sup>b</sup>	۰/۹۱ <sup>abc</sup>	۰ <sup>c</sup>
۲ NAA+۰/۵ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۴۴ <sup>cde</sup>	۰/۳۳ <sup>abc</sup>
۲ NAA+۱ Kin	۰/۵ <sup>abc</sup>	۰/۳ <sup>ab</sup>	۲/۴ <sup>a-d</sup>	۰/۷ <sup>b</sup>	۰/۸ <sup>abc</sup>	۰ <sup>c</sup>
۲ NAA+۲ Kin	۰/۲۵ <sup>bdc</sup>	۰/۴۲ <sup>a</sup>	۱/۹۲ <sup>a-d</sup>	۰/۹۲ <sup>b</sup>	۰/۹۲ <sup>ab</sup>	۰ <sup>c</sup>
۲ NAA+۴ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰/۱۱ <sup>ab</sup>	۰ <sup>d</sup>	۱/۳۳ <sup>b</sup>	۰/۵۶ <sup>a-e</sup>	۰/۲۲ <sup>bc</sup>
۰/۱ 2,4-D	۰/۰۹ <sup>d</sup>	۰/۲۷ <sup>ab</sup>	۰/۳۶ <sup>d</sup>	۰/۸۲ <sup>b</sup>	۰/۷۳ <sup>a-e</sup>	۰/۳۶ <sup>abc</sup>
۰/۱ 2,4-D+۰/۵ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۳۳ <sup>de</sup>	۰/۱۱ <sup>c</sup>
۰/۱ 2,4-D+۱ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰/۲۷ <sup>ab</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰/۷۳ <sup>a-e</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>
۰/۱ 2,4-D+۲ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰/۳۶ <sup>a</sup>	۰ <sup>d</sup>	۱/۱۸ <sup>b</sup>	۱ <sup>a</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>
۰/۱ 2,4-D+۴ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰/۰۹ <sup>ab</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰/۰۹ <sup>b</sup>	۰/۲۷ <sup>e</sup>	۰ <sup>c</sup>
۱ 2,4-D	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۶۷ <sup>a-e</sup>	۰/۲۵ <sup>abc</sup>
۱ 2,4-D+۰/۵ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۹ <sup>abc</sup>	۰/۲ <sup>bc</sup>
۱ 2,4-D+۱ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۷۳ <sup>a-d</sup>	۰/۰۷ <sup>c</sup>
۱ 2,4-D+۲ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰/۱۸ <sup>ab</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰/۹۱ <sup>abc</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>
۱ 2,4-D+۴ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۷۵ <sup>a-d</sup>	۰/۱۷ <sup>bc</sup>
۲ 2,4-D	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۹ <sup>abc</sup>	۰/۶ <sup>a</sup>
۲ 2,4-D+۰/۵ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۴۴ <sup>cde</sup>	۰ <sup>c</sup>
۲ 2,4-D+۱ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۴۴ <sup>cde</sup>	۰/۳۳ <sup>abc</sup>
۲ 2,4-D+۲ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰ <sup>b</sup>	۰/۸ <sup>abc</sup>	۰/۱ <sup>c</sup>
۲ 2,4-D+۴ Kin	۰ <sup>d</sup>	۰/۱۴ <sup>ab</sup>	۰ <sup>d</sup>	۰/۱۴ <sup>b</sup>	۰/۵۷ <sup>a-e</sup>	۰/۱۴ <sup>bc</sup>

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس مشاهدات مربوط به فراوانی القای کالوس، ساقه، ریشه، جنین سوماتیکی و میانگین تعداد ساقه و ریشه

منابع تغییر	درجات آزادی	میانگین مربعات				
		فراوانی القای جنین سوماتیکی	میانگین تعداد ساقه	میانگین تعداد ریشه	فراوانی القای کالوس	فراوانی القای ریشه ساقه
تیمار	۲۹	۰/۲۵*	۶/۴۲**	۲۲/۶۳**	۰/۴۲**	۰/۴۸**
خطای آزمایشی	۲۸۷	۰/۱۲	۲/۸۰	۸/۵۴	۰/۱۹	۰/۱۱
						۰/۱۹*
						۰/۱۰

تعدادی از تیمارها، کالوس دهی، باززایی و ریشه دهی به طور توأم رخ داد که این امر به میزان قابل توجهی از طول زمان کشت بافت کاست (شکل ۱-۴). باید توجه داشت که نتایج فوق ۸ هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت به دست آمده است و می‌توان با قطعه قطعه کردن کالوس باززایی شده و واکشت آن و صرف زمان بیشتر، تعداد باززایی را به ازای هر ریزنمونه، به مقدار قابل توجهی افزایش داد.

#### بحث

تشکیل جنین سوماتیکی در مرحله القای کالوس در تعدادی از گیاهان خانواده چتریان از جمله رازیانه و هویج، معمول می‌باشد (۸). مکمل 2,4-D و NAA به تنهایی یا همراه با Kin برای تداوم القاء کالوس مورد نیاز است و کاهش آنها باعث القای فرایند اندام‌زایی و تولید جنین‌های نابجا در زیره پارسی می‌گردد. وقوع باززایی در تعدادی از تیمارهای فاقد کینتین نشان داد که برای باززایی زیره پارسی مانند سایر گونه‌های خانواده چتریان (هویج، رازیانه و کرفس) وجود هورمون سیتوکینین الزامی نیست، در صورتی که در مورد زیره سبز وجود سیتوکینین برای باززایی ضروری است (۶). مطالعات قبلی نیز نشان دادند که انتقال کالوس به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۱۱) و یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (۱) منجر به تولید جنین‌های سوماتیکی می‌گردد. به هر حال تأثیر ترکیب هورمون‌های اکسین و سیتوکینین بر اندام‌زایی (Organogenesis) و جنین‌زایی (Embryogenesis) سایر گیاهان نیز مشاهده شده است (۷). در بعضی از گونه‌های گیاهی دیگر جنین‌های سوماتیکی القای شده

احتمالاً" به میزان کمی سیتوکینین یا سایر مکمل‌های تنظیم کننده رشد برای جوانه زنی و رشد گیاه نیاز دارند (۹). این روش نسبت به روش‌های قبلی که تا کنون گزارش شده دارای مزیت‌هایی از جمله افزایش تعداد گیاهان باززایی شده، کالوس دهی و باززایی هم‌زمان و کوتاه شدن طول دوره کشت بافت، آلودگی پایین و عدم نیاز به واکشت‌های مکرر و کاهش مواد مصرفی می‌باشد. با توجه به استفاده از ریزنمونه جوان محور جنینی و عکس‌العمل مناسب آن به محیط کشت، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده نسبت به روش‌های قبلی که از ریزنمونه‌های نسبتاً مسن هیپوکوتیل و کوتیلیدون استفاده شده بود، بیشتر می‌باشد (۴ و ۱۰). در این روش می‌توان پس از گذشت ۳۰ روز از انتقال ریزنمونه، بدون هیچ‌گونه واکشتی به گیاه کامل و ریشه دار دست یافت که با احتساب دوره سرمایی، طول کل دوره ۵۰ تا ۶۰ روز می‌باشد. در صورتی که بخواهیم از هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه استفاده نماییم، با احتساب دوره سرمایی ۹۰ روزه برای جوانه زنی بذر، طول کل دوره برابر ۲۱۰ روز خواهد بود که در طول این مدت چندین بار واکشت باید صورت گیرد. نتایج فوق اهمیت نوع ریزنمونه انتخابی را روشن می‌سازد. کشت جنین به‌عنوان یک سیستم ریزازدیادی در زیتون و زنبق نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۵). از این روش می‌توان در مورد سایر گیاهان دارویی از جمله زیره سفید (*Cuminum setifolium*) استفاده کرد.

همان‌طور که قبلاً" نیز اشاره شد به دلیل وجود مشکلاتی از جمله خفتگی بذر و بیماری‌های قارچی، کشت و تولید زیره پارسی دچار محدودیت فراوانی می‌باشد که با استفاده از تکنیک

### سیاسگزاری

کشت بافت و انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری و آفات، می‌توان تعداد زیادی از گیاهان عاری از پاتوژن را در مدت کوتاهی تولید نمود. بدین وسیله از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع مورد استفاده

۱. بنیان پور، ع. ۱۳۷۴. بررسی افزایش جنسی زیره سیاه و سبز و انگیزش پینه در زیره سبز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
۲. پوراسماعیل، م. و م. شریفی. ۱۳۸۱. شکستن خواب بذور زیره سیاه توسط تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ویژه و استریتیفیکاسیون. جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران.
۳. زیارت نیا، س. م. ۱۳۷۹. جنین زایی زیره سیاه (*Bunium persicum*). سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز خراسان.
۴. شریفی، م. ۱۳۷۴. بررسی مقایسه‌ای اسانس‌ها در بذر زیره‌های سیاه و سبز و قطعات جداگشت. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
5. Canas, LA., J. Aliva, M. Vicente and A. Benbadis. 1992. Micropropagation of olive. *Biotechnol. Agric. and Forestry* 18: 493-505.
6. Ebrahimie, E., A. A. Habashi, B. Ghareyazie, M. Ghannadha and M. Mohammadi. 2003. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 19-25.
7. 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.
8. Hunault, G., P. Desmarest and JD. Manoir. 1989. *Foeniculum vulgare* Miller: cell culture, regeneration and the production of anethole. PP. 185-212. *In: Bajaj YPS (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 7: Medicinal and Aromatic Plants II*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
9. Kumar, SA., OL. Gamborg and MW. Nabors. 1988. Plant regeneration from long-term cell suspension cultures of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Plant Cell Rep.* 7: 322-325.
10. Tawfik, A. and A. Noga. 2002. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended Kinetin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 35-40.
11. Wakhlu, A. K., S. Nagari and K. S. Barna. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Bunium persicum* Bioss. *Plant Cell Rep.* 9: 137-138.