دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۴، شماره ۶، صفحه ۱۰۰۶-۹۹۷ (۱۳۹۷)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.116837.2225
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735- 0905.1397.34.997.92.6.1662.41

پاسخ‌های بیوشیمیایی به عصاره مخمر و ساکارز در کشت سلولی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

صادق عنبرستانی[۱]، علیرضا رضازاده[۲*] و آیت‌الله رضایی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، پست الکترونیک: rezazadeh@shahed.ac.ir

۳- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی دارویی و متعلق به خانواده آلاله می‌باشد. دانه‌های این گیاه در طب سنتی برای درمان بیماری‌های آسم، التهاب، دیابت و فشار خون بالا استفاده می‌شود. کشت سلولی این گیاه به‌دلیل ترکیب‌های فعال و کاربرد در پزشکی دارای اهمیت است. در این تحقیق، به‌منظور بررسی اثر عصاره مخمر و ساکارز بر ویژگی‌های رشد سلول و صفات بیوشیمیایی کشت سلولی سیاه‌دانه آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول سه غلظت عصاره مخمر (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم سه غلظت ساکارز (۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر) انتخاب گردید. پس از گذشت چهار روز از اعمال تیمارها، میزان رشد، آنتوسیانین، مقدار پروتئین محلول، فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوی فنول، غلظت پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد عصاره مخمر به تنهایی بر رشد سلول‌ها مؤثر بود و عصاره مخمر و ساکارز باعث افزایش معنی‌دار مقدار آنتوسیانین، مقدار پروتئین محلول، محتوی فنول، غلظت پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شد. این در حالیست که فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. نتایج نشان داد احتمالاً ساکارز و عصاره مخمر از طریق تأمین منابع غذایی و القاء تنش اکسیداتیو، آثار خود را بر روی سلول‌های سیاه‌دانه نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)، الیسیتور قارچی، ساکارز، سوسپانسیون سلولی، زیست‌توده، تنش اکسیداتیو.

مقدمه

سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* گیاهی یک‌ساله از خانواده آلاله است که در نواحی مرکزی ایران رشد می‌کند (Zarei *et al*., 2017). این گیاه حاوی روغن، پروتئین، انواع ترکیب‌های ترپنوییدی، آلکالوئیدی، کینون‌ها مانند تیموکوئینون (Thymoquinone)، ساپونین و اسانس فرّار است. در طب سنتی به‌عنوان داروی ضد کرم، برای رفع مشکلات قاعدگی، آسم، دیابت و سرفه بکار می‌رود (Botnick *et al*., 2012). شرایط طبیعی، محیط و آب‌وهوا روی میزان مواد مؤثره گیاه مؤثر است. بنابراین برای مطالعه بهتر است از کشت سلولی استفاده شود. تحقیقات زیادی در زمینه استفاده از کشت تعلیقی سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شده است، زیرا تولید متابولیت ثانویه با خصوصیات دارویی از طریق کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی فواید زیادی در مقایسه با استخراج این ترکیب‌ها به‌صورت مستقیم از گیاهان در شرایط طبیعی دارد.

کنترل دقیق شاخص‌های مختلف سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند (Seyedtabatabaei & Omidi, 2010). برای تولید انبوه گیاه با سطوح بالاتری از متابولیت‌های ثانویه اقدام به استفاده از انواع فرمانتور (بیوراکتور)، روش کشت تعلیقی (Submerged culture) و فنون ویژه مانند افزودن الیسیتور (Elicitor) و پیش‌سازها (Precursor) شده است. الیسیتورها باعث القاء پاسخ‌های دفاعی فیزیولوژیک و مورفولوژیک در سلول و گیاه می‌شود (Namdeo, 2007) که بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهند (Zhao *et al.*, 2005). عصاره مخمر یک الیسیتور است که به طور شگفت‌انگیزی رشد سلولی و تولید پروتئین‌ها را در کشت سلولی افزایش می‌دهد (Mossera *et al.*, 2012). یکی از اثرهای شناخته شده عصاره مخمر ایجاد تنش در گیاهان و تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROS (Reaction Oxygen Species) می‌باشد (Savitha, 2006). البته نقش ROS در القاء بیان برخی از ژن‌های دفاعی و ژن‌های بیوسنتزکننده متابولیت‌های ثانویه ثابت شده است (Karuppanapandian *et al.*, 2011).

کربوهیدرات‌ها در گیاهان علاوه‌بر ایفای نقش‌های ساختمانی و انرژی‌زایی، به‌عنوان علائم فیزیولوژیکی عمل می‌کنند و در تجمع آنتوسیانین تأثیرگذار هستند (Góraj-Koniarska & Saniewski, 2015).

این مطالعه با توجه به اهمیت دارویی گیاه سیاه‌دانه برای دستیابی و تعیین بهترین محیط کشت برای رشد و عملکرد سلول‌های سیاه‌دانه به‌منظور استفاده از متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (به‌عنوان الیسیتور قارچی) همراه با ساکارز انجام شده است.

مواد و روشها

تهیه کالوس

برای تهیه کالوس ابتدا هیپوکوتیل سیاه‌دانه از گیاه جدا گردید. سپس با استفاده از هیپوکلریت سدیم و اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شد. بافت بدست آمده به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) با نسبت هورمونی 2-4-D ۱ میلی‌گرم بر لیتر و کاینتین (Kinetin) ۲ میلی‌گرم بر لیتر و آگارز ۵٪ انتقال داده شد. بعد از القاء کالوس‌ها (۷ روز) و رشد اولیه آنها (۱۴ روز) کالوس‌ها به محیط مایع (MS بدون آگارز) منتقل شدند و با واکشت‌های متناوب و منظم محیط کشت سوسپانسیون سلولی یکنواخت بدست آمد. ۱۴ بار واکشت برای اطمینان از همگن شدن کشت سلول‌ها انجام شد.

آماده‌سازی الیسیتورها

برای تیمار نمونه‌ها، سلول‌ها در معرض سه سطح از الیسیتور مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) خریداری شده از شرکت مرک (Merck) آلمان در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز در سه سطح غلظت ۳۰، ۴۵ و ۶۰ گرم در لیتر قرار گرفتند. سلول‌های تیمار شده درون محیط کشت MS قرار گرفتند. پس از گذشت چهار روز به کمک نایلون مش ۲μm، پمپ خلأ و قیف بیرمن سلول‌های تحت تیمار جدا شد. سپس همه نمونه‌ها با ازت مایع خشک گردید و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس برای انجام بررسی‌های بعدی نگهداری شد.

سنجش رشد و صفات فیزیولوژیک

تعیین رشد سلولی با اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها انجام گردید. بدین‌منظور سلول‌ها بلافاصله بعد از صاف شدن برای تعیین وزن نر توزین شدند. غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976). مقدار کل ترکیب‌های فنلی با اندازه‌گیری جذب توسط اسپکتروفتومتر (مدل Perkinelmer, lambda 25 آمریکا) در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از استاندارد اسید گالیک تعیین شد. عصاره‌گیری سلول‌ها با بافر فسفات سدیم انجام شد و از عصاره برای سنجش فعالیت پراکسیداز طبق روش Dornenborg و Knorr (۱۹۹۷) استفاده گردید. به منظور تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی مقدار مالون دی‌آلدئید

(MDA) Malondialdehyde)) سنجش شد. ابتدا سلول‌ها را با تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ ساییده و عصاره سلولی تهیه شد. سپس جذب آن در طول موج ۵۳۲nm و ۶۰۰nm اندازه گیری شد و مقدار آن با ضریب خاموشی ۱۵۵Mm/cm محاسبه گردید (De Vos *et al*., 1991). مقدار پراکسید هیدروژن در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Hossein Zadeh *et al*., 2009). به‌منظور اندازه‌گیری غلظت آنتوسیانین عصاره سلولی با استفاده از محلول اتانول اسیدی (شامل اتانول: اسیدکلریدریک به نسبت ۱:۹۹) تهیه شد و پس از سپری کردن یک شب در تاریکی جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین، از ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰ cm^{-1} mol^{-1}$ استفاده شد (Merzlyak *et al*., 2003).

تجزیه آماری داده‌های آزمایش

آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول سه غلظت عصاره مخمر (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم سه غلظت ساکارز (۳۰، ۴۵ و۶۰ گرم در لیتر) انتخاب شد. تأثیر فاکتورها بر روی ویژگی‌های رشد و صفات فیزیولوژیک، فیتوشیمیایی و پروتئینی بررسی شد. تجزیه واریانس، مقایسات میانگین و تجزیه‌وتحلیل همبستگی متغیرها با استفاده از نرم‌افزار SPSS v.24 و ترسیم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

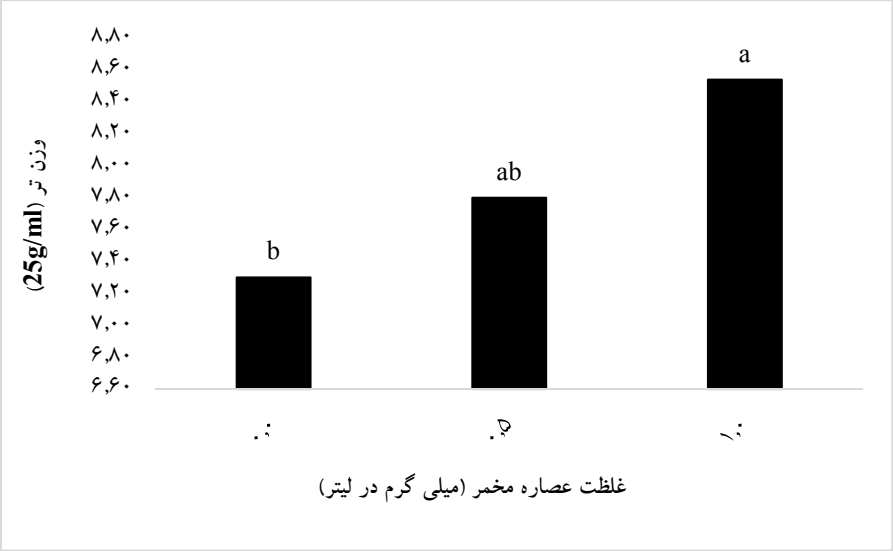
نتایج

براساس جدول تجزیه واریانس اثر متقابل عصاره مخمر و ساکارز بر تمامی صفات بجز وزن تر معنی‌دار شد. وزن تر در تیمار عصاره مخمر به تنهایی معنی‌دار شد و اثر متقابل ساکارز و عصاره مخمر تأثیر معنی‌دار آماری بر وزن تر سلول‌های سیاه‌دانه نداشته است (جدول ۱). نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ در میزان وزن تر شده است. با افزایش غلظت عصاره مخمر تا غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اثر معنی‌داری بر وزن تر نسبت به شاهد دیده نشد، اما در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مخمر افزایش وزن تر مشاهده شد (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر عصاره مخمر و ساکارز بر کشت سلولی سیاه‌دانه (*N. sativa*)

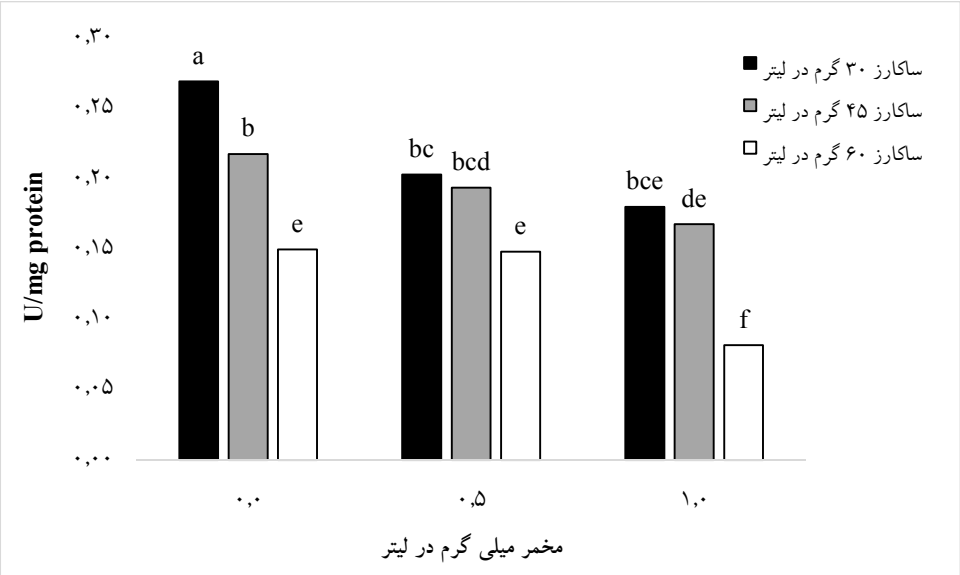
منابع تغییرات	df	میانگین مربعات (MS)						
		پراکسیداز	آنتوسیانین	وزن تر	H_2O_2	پروتئین	مالونیل دی‌آلدئید	فنول
عصاره مخمر	۲	۰/۰۴۵۴**	۰/۰۰۱۳*	۳/۰۵۵۲*	۰/۰۳۳۴**	۹/۳۲۱۶**	۴۵/۱۹۷۷**	۰/۱۸۳۵**
ساکارز	۲	۰/۰۲۶۹**	۰/۰۰۰۴۸**	۰/۵۰۷۲ns	۰/۰۰۸۷**	۶/۹۲۲۷**	۴۲/۳۴۱۴**	۰/۰۰۳۷ns
ساکارز × عصاره مخمر	۴	۰/۰۱۴۹**	۰/۰۰۰۱۶**	۰/۳۴۱۵ns	۰/۰۲۸۹**	۲/۰۰۹*	۳/۲۸۳۶**	۰/۰۱۵۹*
خطای آزمایش	۱۶	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۱۱	۰/۸۲۲۰	۰/۰۰۰۰۹	۰/۵۸۹۰۵	۰/۴۸۵	۰/۰۰۳۷۱
ضریب تغییرات (٪)	-	۱۰/۴۸۷۵	۱۴/۷۱۶۲	۱۱/۴۴۹۷	۹/۹۷۵۴	۱۷/۹۵۵۳	۱۲/۷۳۱۴	۱۷/۴۷۱۴

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر وزن تر

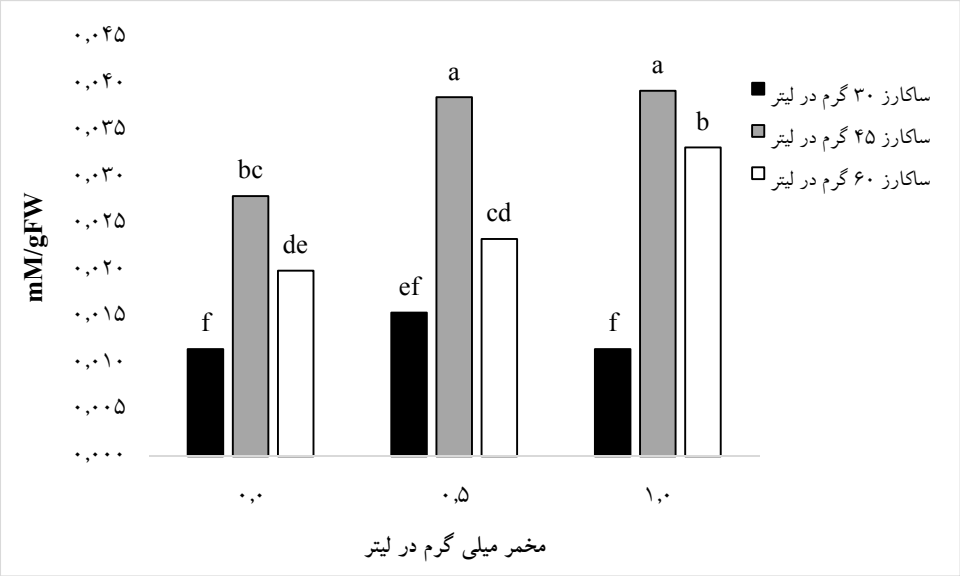
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

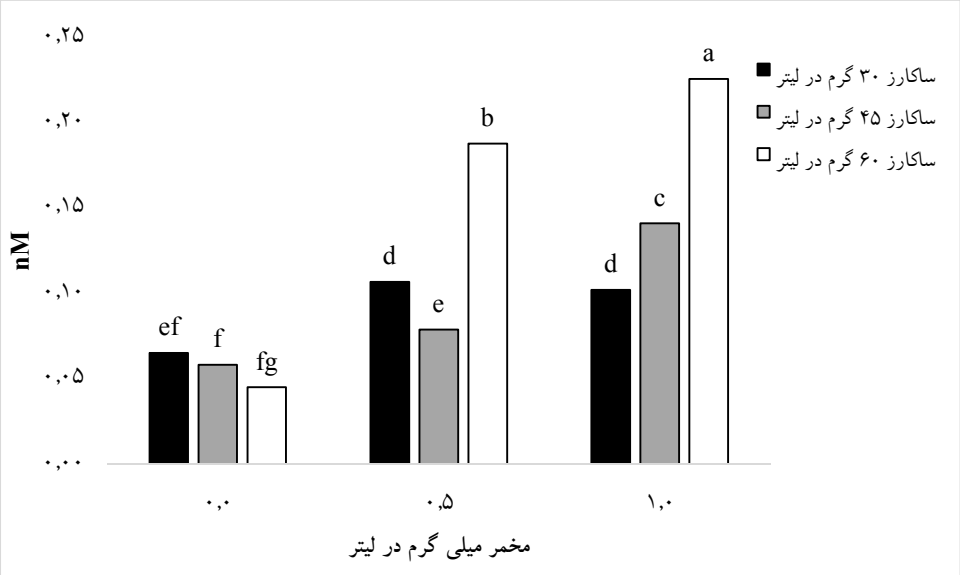
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

غلظت‌های مختلف ساکارز و عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز شده است. بیشترین مقدار پراکسیداز مربوط به اثر متقابل غلظت ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت صفر بر لیتر مخمر بود. با افزایش غلظت الیسیتورها میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاهش یافت و در حداکثر غلظت الیسیتورها به پایین‌ترین حد فعالیت رسید (شکل ۲).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر میزان آنتوسیانین

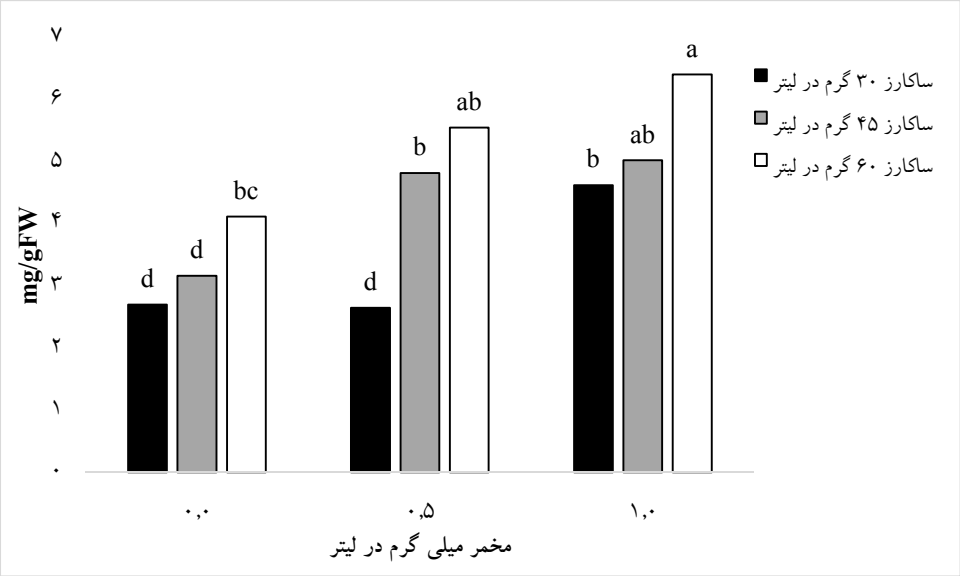
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر میزان پراکسید هیدروژن

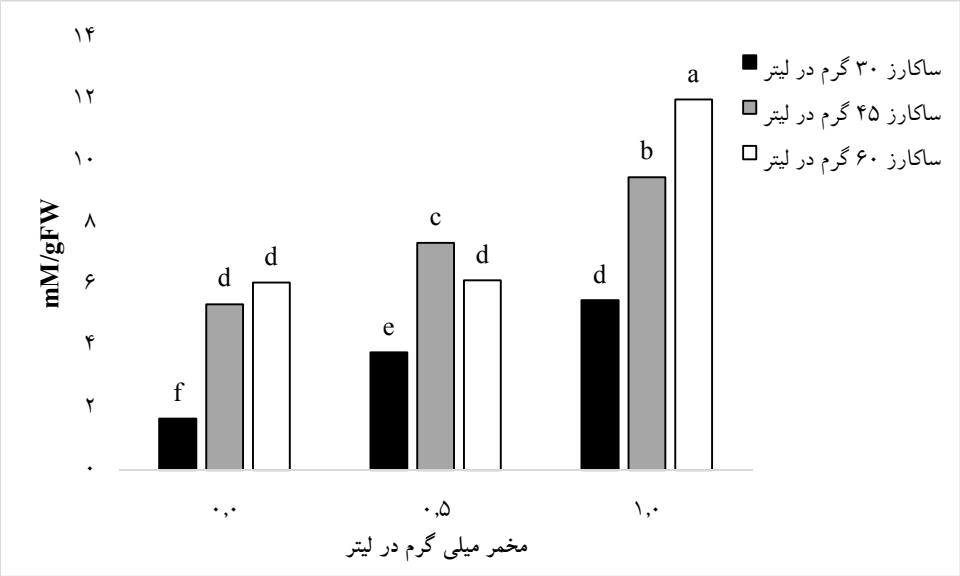
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.

غلظت‌های مختلف ساکارز و عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ در میزان آنتوسیانین شد. با افزایش غلظت الیسیتورها ابتدا مقدار آنتوسیانین افزایش پیدا کرد ولی با افزایش بیشتر مقدار آن کاهش یافت. بیشترین مقدار آنتوسیانین مربوط به اثر متقابل غلظت ۴۵ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر مخمر بود (شکل ۳). غلظت‌های مختلف ساکارز و عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ در میزان پراکسید هیدروژن شد.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر میزان پروتئین

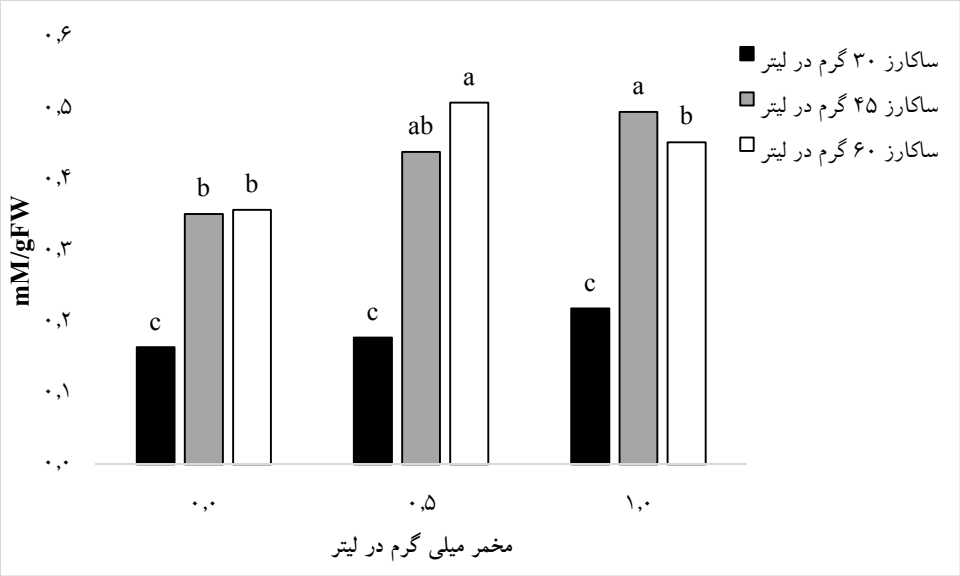
حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر میزان مالونیل دی‌آلدئید

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.

با افزایش غلظت الیسیتورها میزان پراکسید هیدروژن افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار پراکسید هیدروژن مربوط به اثر متقابل غلظت ۶۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر مخمر بود (شکل ۴). نتایج نشان داد غلظت های مختلف ساکارز و عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ در میزان پروتئین شد. با افزایش غلظت الیسیتورها مقدار پروتئین افزایش یافت. بیشترین مقدار پروتئین مربوط به اثر متقابل غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز و غلظت یک میلی‌گرم مخمر بود (شکل ۵).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر و ساکارز بر میزان فنول

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد.

غلظت‌های مختلف ساکارز و عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪ در میزان مالونیل دی‌آلدئید گردید. با افزایش غلظت الیسیتورها مقدار مالونیل دی‌آلدئید افزایش یافت. بیشترین مقدار مالونیل دی‌آلدئید مربوط به اثر متقابل غلظت ۶۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر مخمر بود (شکل ۶). غلظت‌های مختلف ساکارز و عصاره مخمر سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار در میزان فنول شد. با افزایش غلظت الیسیتورها میزان فنول افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار فنول مربوط به اثر متقابل غلظت ۶۰ گرم بر لیتر ساکارز و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر مخمر بود (شکل ۷).

بحث

عصاره مخمر دارای انواع اسید آمینه است و از طریق اثر تغذیه‌ای می‌تواند باعث افزایش وزن تر (رشد سلولی) در تیمارهای مخمر نسبت به نمونه‌های شاهد گردد. عصاره مخمر رشد و فعالیت سلول و تولید پروتئین را افزایش می‌دهد (Mossera *et al*., 2012). عصاره مخمر در گیاه *Coleus blumei* و *Salvia miltiorrhiza* باعث افزایش محتوای رزمارینیک اسید، اسیدهای فنولی و وزن خشک گیاه گردید (Chen *et al*., 2001). عصاره مخمر رشد سلولی را در گیاه بادنجان افزایش داد (Loc *et al*., 2014). تیماردهی با عصاره مخمر باعث افزایش محتوای سیلی‌مارین در محیط‌های کشت سلولی گیاه خار مریم شد. به‌طوری که سرعت رشد و وزن خشک کلیه محیط‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره مخمر نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (Rahimi Ashtiani *et al.,* 2009). از سوی دیگر عصاره مخمر با اعمال تنش اکسیداتیو در سلول‌های سیاه‌دانه، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و پراکسید هیدروژن افزایش یافت. البته میزان پراکسید هیدروژن در کشت سلولی خارمریم افزایش یافته بود (Rahimi Ashtiani *et al.,* 2009). برخی از مطالعات نشان می‌دهد که تنش اکسیداتیو القاء شده توسط قارچ در فعال‌سازی ژن‌های درگیر در متابولیسم ثانویه مؤثر است (Yuan *et al*., 2002). الیسیتورها با القاء تنش اکسیداتیو باعث افزایش تولید تاکسول شده‌اند (Yuan *et al*., 2002). الیسیتور قارچی در گیاهان دارویی *Catharanthus roseus*، *Hyoscyamus niger*، *Arabidopsis thaliana*،

Dacus carota و *Rauwolfia canescens* باعث افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به نمونه کنترل شده است (Yue *et al*., 2016). این الیسیتور باعث افزایش محتوای تاکسول در گیاهان *Taxus chinensis* و *Taxus brevifolia* شده است (Namdeo, 2007).

ساکارز در گیاهان به‌عنوان یک مولکول سیگنالی شناخته می‌شود و گستره زیادی از فرایندهای تکاملی را در سرتاسر چرخه زندگی گیاهان کنترل می‌کند (Tognetti *et al*., 2013). تعداد بسیار زیادی از آنزیم‌ها در زمان افزایش غلظت این دی‌ساکارید ساخته می‌شوند (Pollock *et al*., 2003). ساکارز بر تمام متابولیسم‌های گیاه اثر می‌گذارد و در تمام بافت‌ها و ارگان‌ها نقش محرک دارد. ساکارز در تقسیم سلول‌های جنینی هویج و صنوبر نقش بارزی دارد (Wind *et al*., 2010). ساکارز کنترل‌کننده ساخت کلروفیل، القاءکننده بیوسنتز آنتوسیانین و بیشتر ژن‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئید می‌باشد. همچنین این دی‌ساکارید سطح کاروتنوئید را افزایش می‌دهد و پاسخ‌های واکنشی مرتبط با پراکسید هیدروژن را القاء می‌کند (Tognetti *et al*., 2013). با توجه به یافته‌های این پژوهش و دستاوردهای محققان پیشین، این چنین برداشت می‌شود که عصاره مخمر در کشت سلولی سیاه‌دانه احتمالاً باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و تحریک سلول‌ها برای ساخت مواد ثانویه شده است. از سویی مواد آلی موجود در عصاره مخمر و ساکارز منبع انرژی، نیتروژن و سایر پیش‌ماده‌های لازم برای برخی از مسیرهای زیستی درگیر در رشد سلول‌ها، تولید آنتوسیانین و سایر مولکول‌های ارزشمند شده است. البته برای بررسی اثر ساکارز بر ژن‌های کلیدی این مسیرها نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که استفاده توأم ساکارز و عصاره مخمر بر میزان ترکیب‌های ارزشمند سیاه‌دانه اثرهای بهتری داشته است.

منابع مورد استفاده

- Botnick, I., Xue, W., Bar, E., Ibdah, M., Schwartz, A., Joel, D.M., Lev, E., Fait, A. and Lewinsohn, E., 2012. Distribution of primary and specialized metabolites in *Nigella sativa* seeds, a spice with vast traditional and historical uses. Molecules, 17(9): 10159-10177.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Chen, H., Chenaa, F., Chiub, F.C.K. and Lob, C.M.Y., 2001. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Enzyme and Microbial Technology, 28(1): 100-105.
- De Vos, C.H.R., Schat, H., De Waal, M.A.D., Vooijs, R. and Ernst, W.H.O., 1991. Increased resistance to copper-induced damger of the root plasma membrance in copper tolerant *Silene cucubalus*. Physiology Plant, 82: 523-528.
- Dornenborg, H. and Knorr, D., 1997. Evaluation of elicitor- and high-pressure-induced enzymatic browning utilizing potato (*Solanum tuberosum*) suspension cultures as a model system for plant tissues. Agriculture Food Chemistry, 45: 4173-4177.
- Góraj-Koniarska, J. and Saniewski, M., 2015. The effect of sugars in relation to methyl jasmonate on anthocyanin formation in the roots of *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.). Acta Agrobotanica, 68(2): 173-178
- Hossein Zadeh, M., Kiarostemi, K.H., Elkhanizadeh, M. and Sabora, O., 2009. Investigation on allelopathic effects of wild barly on protei, carbohydrate contents and some wheat enzyme activities. Iranian Journal of Biology, 22: 392-406.
- Karuppanapandian, T., Moon, J., Kim, C. and Manoharan, K., 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian Journal of Crop Science, 5(6): 709-725.
- Loc, N.H., Anh, N.H.H.T., Khuyen, L.T.M. and An, T.N.T., 2014. Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. Bioscience Biotechnology, 3(1): 1-6.
- Merzlyak, M.N., Solovchenko, A.E. and Gitelson, A.A., 2003. Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. Postharvest Biology and Technology, 27(2): 197-211.
- Mossera, M., Kapela, R., Aymesa, A., Bonannob, L.M., Olmosa, E., Chevalota, I., Marca, I. and Marc, A., 2012. Chromatographic fractionation of yeast extract: A strategy to identify physicochemical properties of compounds promoting CHO cell

culture. Process Biochemistry, 47(7): 1178-1185.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews, 1: 69-79.
- Pollock, C., Farrar, J., Tomos, D., Gallagher, J., Lu, C. and Koroleva, O., 2003. Balancing supply and demand: the spatial regulation of carbon metabolism in grass and cereal leaves. Journal of Experimental Botany, 54: 489-494.
- Rahimi Ashtiani, S., Hasanloo, T. and Bihamta, M.R., 2009. Using yeast extract as an approach to increase flavonolignans content in cell suspension culture of milk thistle plant via elicitation mechanism. Journal of Medicinal Plants, 4(32): 108-119.
- Savitha, B.C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. and Ravishankar, G.A., 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biochemistry, 41(1): 50-60.
- Seyedtabatabaei, E. and Omidi, M., 2010. Plant Cell and Tissue Culture. Tehran University Press, 392p.
- Tognetti, J.A., Pontis, G.H. and Martínez-Noël, M.A., 2013. Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. Plant Signaling & Behavior, 8(3): e23316-1-10.
- Wind, J., Smeekens, S. and Hanson, J., 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. Phytochemistry, 71(14-15): 1610-1614.
- Yuan, Y., Li, Ch., Hu, Z. and Wu, J., 2002. A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysprum*. Enzyme and Microbial Technology, 30(6): 774-778.
- Yue, W., Ming, Q.L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J., Han, T. and Qin, L.P., 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. Critical Reviews in Biotechnology, 36(2): 215-232.
- Zarei, A., Zohrabi, S. and Boomeh, F., 2017. Evaluation of different growth stages of *Nigella sativa* L. and assessment of crop coefficient (Kc). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 33(4): 597-607.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23: 283-333.

Biochemical responses to yeast extract and sucrose in black cumin (*Nigella sativa* L.) cell culture

S. Anbarestani[1], A.R. Rezazadeh[2*] and A. Rezaei[3]

1- M.Sc. graduated of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran, E-mail: rezazadeh@shahed.ac.ir
3- Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

Received: December 2017 Revised: May 2018 Accepted: October 2018

Abstract

Black cumin (*Nigella sativa* L.) is a medicinal plant belonging to the Ranunculaceae family. The seeds of *Nigella sativa*, also known as black seed, are used in traditional medicine as a natural remedy for several illnesses including asthma, inflammation, diabetes, and hypertension. The cell culture of this plant is important because of its active ingredients and significance in medicine. In this research, the effects of fungal elicitor (zero, 0.5 and 1 mg/L), and sucrose (30, 45 and 60 g/L) on the cell culture of black cumin was investigated as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. The cell growth characteristics and biochemical traits were assayed. The results showed that fungal elicitor and sucrose increased the membrane lipid peroxidation, protein concentration, phenol contents, hydrogen peroxide, and anthocyanin whereas peroxidase activity was significantly decreased compared to control. Generally, sucrose and fungal elicitor increased the growth and activity of the cell and increased the protein production by increasing oxidative stress in cells and increasing the entry of substances into the cell and stimulating metabolism.

Keywords: *Nigella sativa* L., fungal elicitor, sucrose, suspension cultures, biomass, oxidative stress.