ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۲۴۴ - ۲۳۵

تأثیر تیمارهای کیتوزان و نانو ذرات نقره بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز در گیاه زنیان

Effect of Chitosan and Silver nanoparticles on expression of *Beta-amyrin synthase* gene in Ajowan

حفصه واحدی[۱]، لیلا فهمیده*[۲]، براتعلی فاخری[۱]، بهمن فاضلی نسب[۳]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، گروه آموزشی اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- مربی، گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

Vahedi H [1], Fahmideh L[*2], Fakheri BA [1], Fazeli-Nasab B[3]

1- MSc Student, Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3- Assistant, Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:l.fahmideh@gau..ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۳۰)

چکیده

زنیان (*Carum copticum*) (آجغون) از خانواده‌ی چتریان *(Apiaceae)* به‌عنوان یک گیاه دارویی با ترکیباتی از جمله تیمول، سیمن، آلفا پینن، گاماترپنین، بتاپینن، میرسن و کارواکرول در درمان بیماری‌های آنژین، دفع سنگ کلیه، آسم، رماتیسم، آنفولانزا و به عنوان ضدعفونی کننده‌ی قوی و تقویت جهاز هاضمه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، بیان ژن بتاآمیرین سنتاز (*Amirin–βsanthase*)، تحت تیمارهای مختلف نانو ذره نقره (۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ppm)، کیتوزان (۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ppm)، جمعیت (سیستان و پاکستان) و زمان (۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اعمال الیسیتورهای کیتوزان و نانوذرات نقره باعث تغییر در الگوی بیان ژن بتاآمیرین سنتاز شده است. بیشترین بیان ژن، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار با ۱۵۰ppm کیتوزان مشاهده شد و با افزایش غلظت کیتوزان در بازه زمانی ۷۲ ساعت کاهش قابل توجهی در بیان ژن رخ داد در حالی‌که تیمار با نانوذرات نقره با غلظت ۹۰ppm و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار، بیشترین بیان ژن را سبب شد. در تیمار اثرات متقابل کیتوزان (۱۵۰ppm) و نانو ذرات نقره (۹۰ppm) در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار برای هر دو جمعیت مورد مطالعه بیشترین بیان ژن مشاهده شد. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که الیسیتور نانوذرات نقره همراه با کیتوزان در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار تأثیر مثبت بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز داشت و میزان افزایش بیان ژن در این حالت در جمعیت پاکستان نسبت به سیستان بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی

آجغون
الیسیتور زیستی
الیسیتور غیر زیستی
تیمول

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدمه

زنیان (*Carum copticum*) (آجغون) از خانواده‌ی چتریان (*Apiaceae*) و گیاهی یکساله می‌باشد. براساس اطلاعات کروموزمی زنیان مشخص گردید که 2n در این گیاه ۱۸ می‌باشد (Nomani et al. 2019; Chattopadhyay 1990). منشأ این گیاه به احتمال، مصر است و اکنون در سرتاسر خاورمیانه پرورش داده می شود. این گیاه بسیار قدیمی، همانند بسیاری از دیگر ادویه ها، مصرف دارویی داشته است. زنیان را در بلوچستان با نام هندی آن «اجوان» می‌شناسند (Fazeli-nasab and Fooladvand 2016). اثر ضد باکتریایی اسانس زنیان را بر باکتری‌های *Streptococcus haemolyticus*، *Staphylococcus aureus*، *Corynebacterium diphtheria*، *Proteus vulgaris*، *Klebsiella* و *Coli Escherichia* ثابت و گزارش شده که اسانس زنیان به‌ترتیب دارای هاله مهار رشد ۱۰mm و ۱۱ mm بر سطح باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی می‌باشد (Singh et al. 2002).

در میان روش‌های زیادی که به‌منظور افزایش تولید مواد مؤثره گیاهان استفاده می‌شود، موادی ازجمله کیتوزان، جاسمونیک اسید، نانو ذرات نقره، تیتانیوم در قالب الیسیتورها که ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیر زیستی هستند که با القای سامانه‌ی دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Zhao et al. 2005). الیسیتورهای زیستی شامل پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و یا قطعات دیواره سلول قارچ‌ها، گیاهان (سلولز)، پکتین (میکروارگانیسم‌ها) کیتین و گلوکان می‌باشد (Vasconsuelo and Boland 2007).

کیتین خود یک پلی ساکارید متشکل از واحدهای N– استیل– D– گلوکز آمین است که طی داستیلاسیون در محلول غلیظ قلیایی به کیتوزان تبدیل می‌شود. کیتوزان (شکل د–استیله کیتین)، پلی ساکاریدی پلی کاتیونی است که از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه های قارچی است و اثر آن به‌عنوان یک الیسیتور زیستی کارآمد برای بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از گیاهان دارویی تایید شده است (Jesionek et al. 2018Chang ; et al. 1998). الیسیتورهای غیرزیستی یا عوامل تنشی مانند اشعه ماورا بنفش، نمک فلزات سنگین و بعضی از ترکیبات شیمیایی با مکانیسم‌های عمل متفاوت مانند جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید، نیترات نیز به‌منظور افزایش تولید این ترکیبات درکشت بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه از جمله اندول آلکالوئیدها، سزکوئی ترپن‌ها و فنل‌ها را تحریک می‌کند (Yu et al. 2006 Matkowski 2008;).

الیسیتورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه اندازی کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانوی شوند (Zhao et al. 2005 Howlett 2006;). به طور کلی استفاده از الیسیتورها در مطالعات مربوط به زیست فناوری متابولیت‌های گیاهی دو هدف اصلی را دنبال می‌کند :۱– به‌دست آوردن اطلاعاتی در زمینه مسیرهای بیوسنتزی که منجر به تشکیل و تنظیم متابولیت‌های ثانوی می‌شود. ۲– افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی برای کاربرد تجاری (Sobhanizadeh et al. 2015 Fazeli-nasab and Fooladvand 2016;). از موارد دیگری که به‌تازگی به‌عنوان الیسیتور استفاده می‌شود، نانو ذرات هستند و از آنجاکه نانو ذرات قادر به تحریک مکانیسم دفاعی در سلول و تولید متابولیت های ثانویه هستند نتایج قابل‌توجهی را می‌توان انتظار داشت (Bondarian et al. 2013). نانو ذرات نقره ذراتی آب‌دوست با خواص ویژه و قطری در حدود یک تا 100 نانومتر می‌باشند که هسته آن را فلز نقره و اطراف آن را اکسید نقره در بر گرفته است (Park et al. 2006).

تری‌ترپن‌ها یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین گروه‌های تشکیل دهنده ترپن‌ها می‌باشند که این متابولیت‌ها در صنعت دارو سازی دارای اهمیت ویژه‌ای هستند. تجمع این ترکیبات اغلب به فرم گلیکوزیله تحت عنوان ساپونین است. گروهی از آنزیم‌های مهم کاتالیز کننده در مسیر بیوسنتز ساپونین تری‌ترپنوییدها، اکسید و اسکوالن سیکلازها می‌باشند. اکسیدواسکوالن سیکلازها، گروهی از آنزیم‌های مهم کاتالیز کننده در مسیر بیوسنتز تری ترپن ساپونین‌ها می‌باشند که آنزیم *β -amyrin synthase* (*βAS*) از جمله این آنزیم‌ها بوده و به‌عنوان نقطه هماهنگ‌کننده بین متابولیت اولیه (استرول) و متابولیت ثانویه (تری ترپن ساپونین) در این مسیر بیوسنتزی عمل می‌کند (Meesapyodsuk et al. 2007 Cammareri et al. 2008;).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

بتا آمیرین با اسکلت اولئانی توسط آنزیم بتا آمیرین سنتاز با پیش ماده اکسید و اسکوالن ایجاد می‌شود. ژن کدکننده این آنزیم در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله در خانواده *Asteraceae* در دو جنس *Astera* و *Artemisia* توالی‌یابی شده است (Hossein Panahi et al. 2016). در تحقیقی ناحیه پروموتوری ژن بتا آمیرین سنتاز به‌عنوان یک ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز ساپونین‌ها در گیاهان مدل آرابیدوپسیس و برنج بررسی و به این نتیجه رسیدند که پروموتور این ژن در هر دو گیاه، جز پروموتورهای القاپذیر بوده و متاثر از استرس‌های زیستی و غیرزیستی میتواند باعث تغییر در بیان ژن مربوطه شود (Seidi et al. 2017).

در تحقیقی بیان ژن‌های PAL، CAD، CCR و PLR بررسی و نشان دادند که بیان آن‌ها تحت اثر کیتوزان، افزایش یافته و بیشینه‌ی بیان آن‌ها در ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمار بوده اما در ۱۲۰ ساعت بعد از اعمال تیمار بیان کاهش یافته است (Esmaeilzadeh Bahabadi and Sharifi 2013) و در پژوهشی دیگر (Ghassemi et al. 2015) کاهش بیان ژن‌های *DBR* و*SQS* با افزایش غلظت نانو کیتوزان در بازه زمانی 48 ساعت، مشاهده و بیشترین افزایش بیان ژن *SQS* در تیمار با الیسیتور نانو کیتوزان در بازۀ زمانی 8 ساعت مشاهده شد. (Khodayari et al. (2015a افزایش ۴ برابری بیان ژن *DBOX* پس از القای الیسیتور نانو ذرات نقره اعلام کردند، اما در 72 ساعت پس از گذشت اعمال تیمار الیسیتوری، کلیه ژن‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش بیان را نسبت به شاهد نشان دادند و پس از 168 ساعت بیان کلیه ژن‌ها به صفر نزدیک شد.

در این مطالعه نیز سعی شد، تاثیر الیسیتورهای نانو ذره نقره و کیتوزان بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز (*β–Amirin santhase*) در جمعیت‌های پاکستان و سیستان گیاه زنیان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

بذرهای زنیان (*Carum copticum* L.) مورد استفاده در این پژوهش از توده‌های محلی سیستان (شهرستان زابل) و پاکستان تهیه و در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل مورد آزمایش قرار گرفتند.پرایمرهای ژن‌های بتا آمیرین سنتاز و ژن مرجع (18s rRNA) با استفاده از نرم‌افزار Primer Primier به شرح Betamirin [رفت (5′ACGAGGTAAGTGGAT3′)، برگشت (5′GGGAGAAATGAAGGGAGG3′)] و 18s rRNA [رفت (5′AAACGGCTACCACATAG3′)، برگشت (5′CAACCCAAAGTCCAACTACG3′)] انجام شد. به‌منظور جوانه‌زنی بذرها و تولید گیاهچه، بذرها در گلدان‌های حاوی خاک تقریبا سبک متشکل از مخلوط پیت ماس، خاک جنگلی، گیاه‌خاک و کود به‌صورت فاکتوریل در قالب کامل تصادفی با ۲ ژنوتیپ زنیان به‌همراه تیمار کیتوزان در ۴ سطح (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰، ppm ۲۰۰)، نانو ذرات نقره در ۴ سطح (صفر، ۳۰، ۶۰ و ppm ۹۰)، ۲ بازه زمانی (۴۸ و ۷۲ ساعت) و با ۳ تکرار کشت شدند. اعمال تیمار در مرحله چهار برگی گیاه انجام شد. بدین صورت که ابتدا با آب مقطر و به وسیله افشانه سطح برگ‌ها مورد شستشو قرار گرفت و پس از آن محلول‌پاشی نانو ذرات نقره و کیتوزان انجام شد. نمونه‌ها در دو دوره متوالی، ۴۸ و ۷۲ ساعته، برداشت و در داخل نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج RNA، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA کل با استفاده از روش SDS (Deepa et al. 2014) انجام و سپس برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase شرکت پیشگام استفاده شد. بدین صورت که ۷/۵ ماکرولیتر از RNA نمونه‌ی استخراج شده را در میکروتیوپ ۰/۲ ریخته، ۱ ماکرولیتر بافر ۱۰X و ۱ ماکرولیتر آنزیم DNase افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در هات پلیت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس ۱ ماکرولیتر EDTA ۰/۰۵ مولار اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و نهایت RNA از آلودگی DNA خالص‌سازی شد. به‌منظور بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ خوانده شد. RNAهای استخراجی در نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر عدد ۱/۹ تا ۲ را نشان داد. پس از آن به‌منظور کیفیت مطلوب RNA استخراج شده، RNA کل توسط ژل الکتروفورز بررسی شد. مشاهده‌ی باندهای RNA ریبوزومی 18s و 28s به‌طور مشخص نشان دهنده‌ی کیفیت مناسب RNA استخراج‌شده بود. درنهایت با توجه به غلظت‌های خوانده‌شده، RNAها با آب عاری از RNase رقیق‌شده و بعد با

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

استفاده از غلظت‌های مورد استفاده در RealTime PCR، به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفتند و هیچ تکثیری را که نشان‌دهنده‌ی آلوده بودن نمونه‌ها به DNA ژنومی باشد را نشان ندادند.

cDNA با استفاده از کیت Gene All سنتز شد. بدین صورت که ابتدا ۳µl نمونه RNA تیمار شده با Dnase، ۰/۵µl پرایمر Revers، ۰/۵µl از DNTP MIX و ۳µl از آب بدون نوکلئاز در زیر هود با شرایط کاملا استریل مخلوط و روی هات پلیت با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد سپس به مدت ۱ دقیقه روی یخ گذاشته شد. بعد آن ۱µl از RTase reaction buffer(10x)، ۱µl از DDT ۰/۱مولار، ۰/۵µl از Hyper script و ۰/۵µl از RNase Inhibitor را به تیوپ اضافه و خوب مخلوط کرده و به مدت ۱ ساعت در بن ماری با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گذاشته و در نهایت به مدت ۱ دقیقه در هات پلیت با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن دوباره تیوب‌ها بلافلاصله به فریزر ۲۰-منتقل شدند.

برای اطمینان از سنتز cDNA از الکترفورز ژل آگارز استفاده شد که مشاهده‌ی باندهای اسمیر نشان‌دهنده‌ی سنتز cDNA بود. سپس در مرحله‌ی بعد با استفاده از پرایمرهای ژن رفرنس و استفاده از cDNA به‌عنوان الگو در واکنش PCR از سنتز cDNA اطمینان حاصل شد. علاوه بر این از کنترل منفی هم برای تشخیص آلودگی ژنومی استفاده شد که در واکنش PCR بجای استفاده از cDNA از RNA به‌عنوان الگو استفاده شد و عدم تکثیر باند در این حالت نشان‌دهنده‌ی عدم وجود آلودگی ژنومی بود و درنهایت cDNA ها برای آزمون پرایمرها و RealTimePCR مورد استفاده قرار گرفت.

جهت بهینه‌سازی شرایط PCR ابتدا واکنش در غلظت‌های مختلف cDNA انجام، سپس با استفاده از یک شیب غلظت از Master Mix میزان بهینه مصرف آن تعیین و همچنین با استفاده شیب دمایی، دمای اتصال آغازگرها به توالی مورد نظر تعیین و نهایت مواد واکنش PCR به شرح؛ میزان پرایمر رفت و برگشت (هر کدام ۰/۵µl)، مسترمیکس (۷/۵µl)، cDNA (۱µl) و آب دیس (۵/۵) به‌دست آمد. بعد از بهینه‌سازی شرایط PCR، واکنش Real Time PCR نیز برای آغازگرهای *β -amyrin synthase* و ژن مرجع بهینه و به شرح زیر انجام شد. در این آزمایش مقدار پرایمر رفت و برگشت (هر کدام ۰/۵µl)، cDNA (۱µl)، Hot Tag EvaGreen qPCR master mix (ROX) (۴µl) و آب عاری از نوکلئاز (۱۴µl) به‌دست آمد.

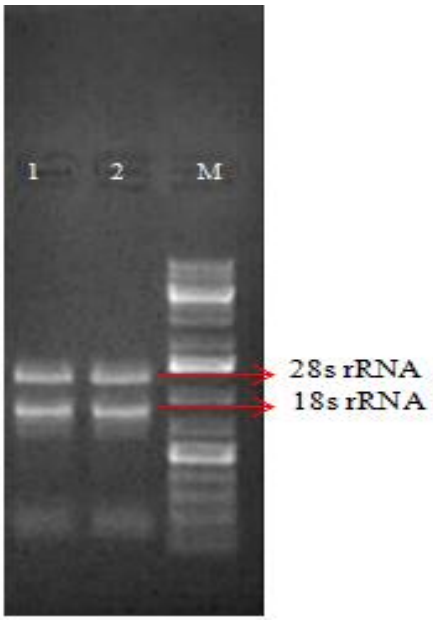
بدین منظور یک سری رقت‌های سریالی ۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۱ از یک نمونه برای هر پرایمر تهیه و واکنش توسط دستگاه (Research RG-300 Corbett) انجام گرفت و سپس منحنی استاندارد توسط نرم افزار دستگاه رسم و بازده واکنش محاسبه شد. در این روش از نمونهٔ RNA با غلظت مشخص برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. غلظت RNA استاندارد با اسپکتروفوتومتر (۲۶۰nm) تعیین می‌شود و سپس از روی وزن مولکولی نمونه به تعداد نسخه‌های آن تبدیل می‌شود. استانداردهای غلظتی ژن‌های معروف به‌صورت تجاری قابل خریداری است هرچند که بسیار گران قیمتند. از نمونه‌های استاندارد سری رقعت تعیین کرده و همراه با نمونه هدف در دستگاه Real-time PCR قرار داده شد. با استفاده از Ct که دستگاه برای هر رقت به ما می دهد یک منحنی رسم کرده که X آن رقت یا تعداد کپی از ژن و Y آن CT باشد، نمودار به‌دست آمده یک نمودار خطی است که با قرار دادن عدد نمونه هدف در نمودار غلظت یا تعداد کپی آن نیز بدست می آید. ترجیحا طول قطعه استاندارد مساوی با طول قطعه هدف باشد.

به‌منظور محاسبات آماری از نرم‌افزار Statistix 10 استفاده شد. میزان بیان ژن مورد مطالعه با استفاده از روش مقایسه‌ای $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح ۵ درصد انجام و همچنین برای رسم شکل‌ها و نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج استخراج RNA در شکل ۱ نشان داده شده است، هم‌چنان‌که مشاهده می‌شود دو باند RNA ریبوزومی 18s و 28s روی ژل کیفیت بالای RNA استخراج شده را تایید می‌کنند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۱- RNA استخراج شده دارای دو باند s ۱۸ و s ۲۸، چاهک شماره ۱ و ۲ به‌ترتیب مربوط به جمعیت پاکستان و سیستان و چاهک M مربوط به مارکر.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی کیتوزان، نانو ذرات نقره، زمان، ژنوتیپ، اثرات متقابل دوگانه (کیتوزان با نانوذرات نقره، کیتوزان با زمان و نانوذرات نقره با زمان) و سه‌گانه (کیتوزان با نانوذرات نقره و زمان) بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند ($P<0.05$) (جدول ۱).

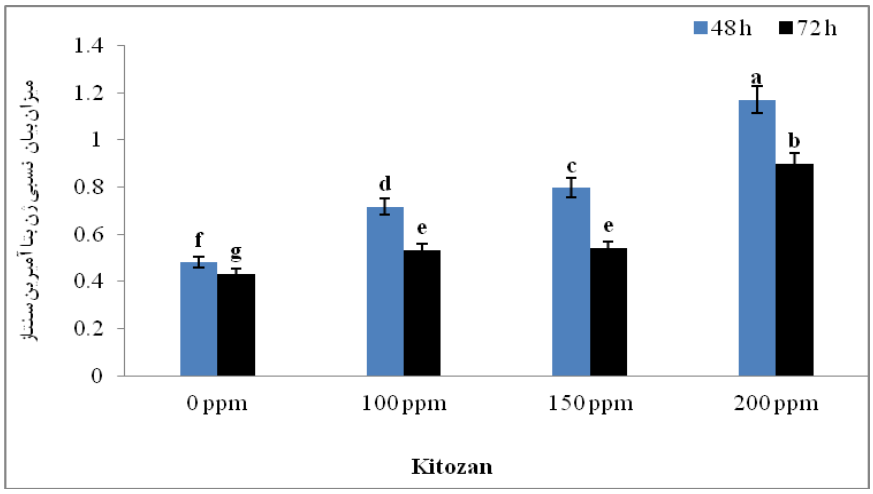
در اثرات اصلی، بیشترین میزان بیان ژن در تیمار کیتوزان (غلظت ۲۰۰ ppm)، نانوذرات نقره (۹۰ppm)، در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار و در ژنوتیپ پاکستان به‌دست آمد. با افزایش غلظت کیتوزان و نانوذرات نقره، بیان ژن بتاآمیرین سنتاز افزایش یافته است اما این سیر صعودی فقط در بازه زمانی ۴۸ ساعته بوده و با گذشت زمان این سیر نزولی شده است به طوری‌که بیشترین میزان بیان ژن در غلظت ۱۵۰ppm کیتوزان در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار (شکل ۲) و در غلظت ۹۰ppm نانوذرات نقره در بازه زمانی ۴۸ ساعته بوده است (شکل ۳). در اثر متقابل سه‌گانه نیز همین امر صادق بوده و بیشترین میزان بیان ژن در غلظت ۹۰ppm ناوذرات نقره، ۱۵۰ ppm کیتوزان و در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بوده و با گذشت زمان میزان بیان ژن کمتر شده است (شکل ۴).

جدول ۱- تجزیه واریانس حاصل از تاثیر الیسیتورهای کیتوزان و نانوذره نقره در دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر بیان ژن بتا امیرین سنتاز دو جمعیت سیستان و پاکستان گیاه زنیان

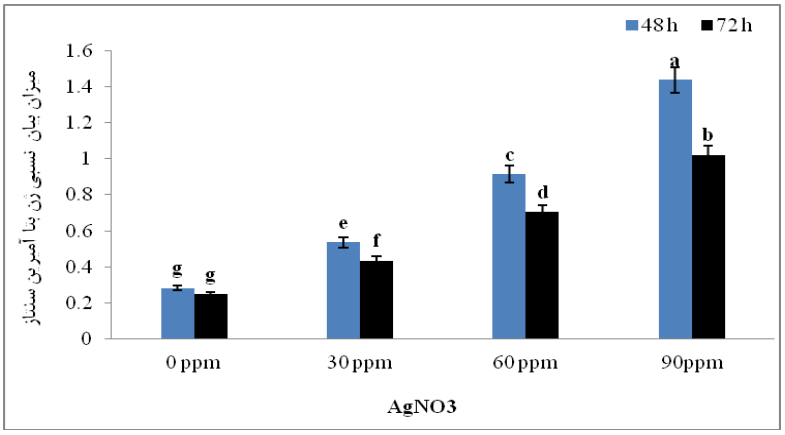
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
جمعیت(ج)	۱	۰/۰۴۳	۰/۰۴۳	۷/۴۲**
کیتوزان(ک)	۳	۸/۵۴	۲/۸۵	۴۹۲/۲**
نانوذرات نقره(ن)	۳	۲۵/۲۸	۸/۴۳	۱۴۵۶/۲**
زمان (ز)	۱	۱/۷۲	۱/۷۲	۲۹۷/۸ **
ج*ک	۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۲۲ ns
ج*ن	۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۶	۰/۱۱ns
ج*ز	۱	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۵	۰/۱ns
ک*ن	۹	۹/۳۷	۱/۰۴۱	۱۷۹/۹**
ک*ز	۳	۰/۳۷	۰/۱۲۴	۲۱/۴ **
ن*ز	۳	۱/۰۰۰۹	۰/۳۳۳	۵۷/۶**
ج*ک*ن	۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۵	۰/۱ns
ج*ک*ز	۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۶	۰/۱۱ns
ج*ن*ز	۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۱۸ ns
ک*ن*ز	۹	۰/۸۷۶	۰/۰۹۷	۱۶/۸۳**
ج*ک*ن*ز	۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۸	۰/۱۵ ns
خطا	۱۲۸	۰/۷۴	۰/۰۰۶	-
کل	۱۹۱	۴۷/۹۷	-	-

ns، * و **: به‌ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

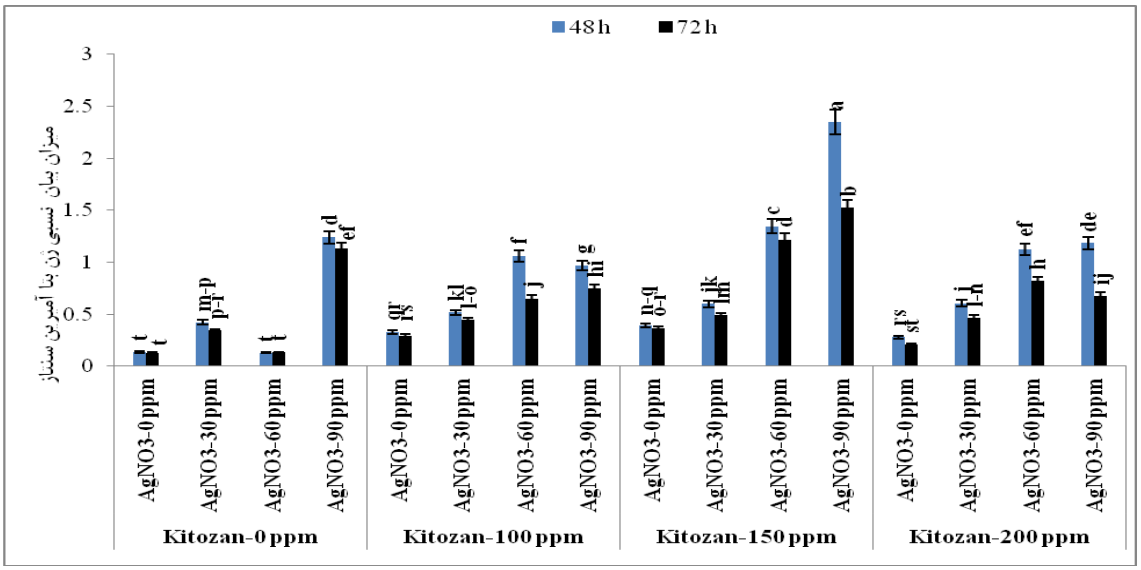
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل دو گانه کیتوزان و بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز گیاه زنیان



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل دو گانه نانو ذرات نقره و بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز گیاه زنیان



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه کیتوزان و نانوذرات نقره در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعته بر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز گیاه زنیان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

بحث

بررسی‌ها نشان داد است که نوع و غلظت الیسیتور نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و بر شدت پاسخ مؤثر است (Trontin et al. 2016)، همچنین Nair et al. (2010) معتقدند که در مطالعات بیان ژن، خصوصیات نانو ذره، غلظت آن و بافت مورد استفاده بسیار حائز اهمیت‌اند، به دلیل این‌که اطلاعات زیادی از موارد استفاده‌ی نانو ذرات و اثرات آن‌ها بر گیاهان در دسترس نیست، لذا تصمیم‌گیری در مورد عملکرد آن‌ها در سلول‌های گیاهی نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است. در تحقیق حاضر مشخص شد که با افزایش نانوذرات نقره میزان بیان ژن بتاآمیرین سنتاز بیشتر شده اما این سیر صعودی فقط تا بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بوده و با گذشت زمان این سیر نزولی شده است از طرفی در هر حالت کیتوزان نتوانسته است در غلظت بالای ۱۵۰ppm باعث افزایش بیان شود بلکه بر میزان بیان ژن تاثیر منفی نیز داشته است. در پژوهش Babaei et al. (2018) بیشینه‌ی بیان ژن *Hyp-1* در غلظت ۵۰ppm از کیتوزان دیده شده است. همچنین غلظت مؤثر الیسیتور بر حسب گونه‌ی گیاهی متفاوت بوده به طوری‌که غلظت بهینه الیسیتوری که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، ممکن است بر گیاهی دیگر اثر نداشته باشد لذا در تحقیقی گزارش شده که غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان باعث القای بیشترین میزان تولید آنتراکوئینون در *Rubia akane* شده است (Jin et al. 1999). در حالی‌که غلظت بهینه برای تولید منتانول *Mentha piperita* غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، بوده است (Chang et al. 1998). به‌نظر می‌رسد علاوه بر غلظت الیسیتور، مدت زمان قرارگیری در معرض الیسیتور نیز بر بیان ژن مؤثر است، به‌دلیل این‌که میزان بیان ژن *Hyp-1* در بازه‌ی ۴۸ ساعت بیش از بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت بود (Babaei et al. 2018).

Esmaeilzadeh Bahabadi and Sharifi (2013) طی بررسی بیان ژن آنزیم‌های PLR، CCR، CAD و PAL بیشترین میزان بیان را در روز سوم اعلام کردند و در روز پنجم پس از اعمال تیمار بیان ژن آنزیم‌های مذکور کاهش یافت که این نتایج با کاهش بیان بتاآمیرین سنتاز زنیان طی بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت در این تحقیق مطابقت دارد. افزایش بیان ژن‌های مسیر فنیل‌پروپانوئیدی و تولید پودوفیلوتوکسین با اثر کیتوزان در کشت سلول کتان سفید در بازه زمانی ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار بررسی و گزارش شده که کیتوزان با اثر بر بیان ژن آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین، باعث افزایش میزان پودوفیلوتوکسین شده و اوج بیان آن‌ها پس از ۳ روز دیده شده است اما با گذشت زمان بیان آن کمتر شده است (Esmaeilzadeh Bahabadi et al. 2013). در تحقیق حاضر نیز کیتوزان باعث افزایش بیان ژن بتاآمرین سنتتاز شده و با افزایش غلظت کیتوزان بیان ژن نیز بیشتر شده اما در غلظت های بالا و همچنین با گذشت زمان این میزان بیان کمتر شده است، به طوری‌که بیشترین بیان ژن در غلظت ۱۵۰ppm و بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار به‌دست آمده است. اثر کیتوزان (با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ppm) بر بیان ژن چاویکول – O– متیل ترانسفراز و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی ریحان بنفش *L. Ocimum basilicum* تحت تنش خشکی (نرمال، تنش ملایم و متوسط) بررسی و گزارش شده که میزان اسانس، میزان بیان ژن چاویکول–O– متیل‌ترانسفراز و ترکیب متیل‌چاویکول تحت تأثیر تنش خشکی و الیسیتور کیتوزان در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری یافته؛ به طوری‌که بیشترین میزان آن با به‌کارگیری غلظت ۴۰۰ppm از کیتوزان در تنش ملایم یعنی آبیاری در ۳۰ تخلیه رطوبتی از ظرفیت زراعی به‌دست آمده است (Malekpoor et al. 2017). تاثیر متفاوت کیتوزان در بیان ژن گزارش شده است به طوری‌که در برخی تحقیقات با افزایش غلظت کیتوزان بیان ژن نیز زیاد شده (Malekpoor et al. 2017) اما در برخی تحقیقات دیگر (Esmaeilzadeh Bahabadi et al. 2013) و همچنین تحقیق حاضر این میزان کاهش پیدا کرده است، که این امر می‌تواند به‌دلیل شرایط حاکم بر آزمایش و نوع گونه‌های گیاهی و مدت زمان اعمال تیمار مورد استفاده باشد که برخی شرایط و گونه‌ها متاثرتر از کیتوزان و برخی نیز کم اثرتر باشند.

در تحقیق حاضر نانو ذرات نقره باعث افزایش بیان ژن بتا آمیرین سنتتاز شده ولی با افزایش زمان روند کاهشی بیان ژن به شکل شدیدتری هویدا شده است. Khodayari et al. (2015b) در مورد تأثیر بازه‌ی زمانی و اعمال نانو ذرات نقره در بیان تعدادی از

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

ژن‌های گیاه پاپاور به نتایج مشابهی دست یافتند، چنان‌که اظهار دارند تمام ژن‌های مورد مطالعه بیشترین تغییرات بیانی را در ساعت‌های اولیه پس از تیمار با نانو الیسیتورها نشان دادند و پس از گذشت زمان، بیان آن‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به نظر می‌رسد می‌توان از نانو الیسیتورها برای افزایش بیان ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی استفاده کرد اما باید به این نکته توجه داشت که از مدت زمان بهینه الیسیتور استفاده کرد، زیرا وجود مستمر الیسیتور خود باعث کاهش ژن‌های مطلوب مورد نظر شده (Khoshnodi et al. 2013; Khodayari et al. 2015) و ازآنجایی‌که متابولیت های تولیدشده عمدتاً در واکنش‌های دفاعی سلول تولید می‌شوند، افزایش آن‌ها منجر به یک سری تغییرات سلولی، واکنش‌های فوق حساسیت و درنهایت مرگ سلولی می‌شود (Khodayari et al. 2015b). همچنین کاربرد نانو ذرات ممکن است ایجاد استرس‌های اکسیداتیو کرده و با آزادسازی رادیکال‌های اکسیژن خسارت‌هایی را به مولکول‌های زیستی وارد سازند و خود این ذرات نیز ممکن است یون‌هایی را به محیط وارد می‌کنند (Chomoucka et al. 2010). به‌نظر می‌رسد نانو ذرات نقره بسته به اندازه می‌توانند به دیواره سلولی، حتی غشای پلاسمایی نفوذ کنند (Manios et al. 2003) البته مکانیسم عمل ذرات نانو نقره در میکروارگانیسم‌ها هنوز به‌روشنی مشخص نشده ولی پیشنهاد شده است که ذرات نانو نقره می‌تواند به آهستگی یون‌های نقره (+Ag) را رها کنند و +Ag می‌تواند ساختار سلولی میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرد (Lubick 2008). محققان نشان دادند که +Ag از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن بر فسفولیپیدها اثر گذاشته و باعث پر اکسیداسیون آن‌ها شده و غشا سلولی میکروارگانیسم‌ها را تخریب می‌کند. از این گذشته +Ag ممکن است با سولفورو در گروه‌های SH– غشا سلولی میکروارگانیسم‌ها جانشین گردد و آن‌ها را تخریب کند (Dibrov et al. 2002).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق چنین استنباط می شود که هر چند اعمال الیسیتورهای کیتوزان و نانوذرات نقره سبب تغییر بیان ژن بتاآمیرین سنتاز شده اما این تغییر در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار کیتوزان در غلظت ۱۵۰ppm و نانوذرات نقره با غلظت ۹۰ppm پاسخ بهتری برای افزایش بیان ژن مورد مطالعه داشت. بیشترین کاهش بیان ژن مورد مطالعه با افزایش غلظت برای تیمار کیتوزان تا ppm ۲۰۰ و همچنین استفاده از بازه‌ی زمان بیشتر (بازه‌ی ۷۲ ساعت) با کاربرد هر دو الیسیتور، مشاهده شد. همچنین نوع جمعیت نیز نقش به‌سزایی در بیان ژن‌های موثر در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه داشته که مشخص شد جمعیت پاکستان سطح بیان ژن بیشتری در مقایسه با جمعیت سیستان داشته است.

منابع

Babaei Z, Solouki M, Fazeli-Nasab B (2018) Investigating The Effect of Biological and non-Biological Elicitor on Expression of Hyp-1 Gene in Hypericum perforatum. Modern Genetics 13:543-549. (In Farsi).

Bondarian F, Torabi S, Omidi M, Bahreini M (2013) Study of callus induction and regeneration of *Papaver somniferum* L. Current opinion in biotechnology S28-S41.

Cammareri M, Consiglio MF, Pecchia P, Corea G, Lanzotti V, Ibeas JI, Tava A, Conicella C (2008) Molecular characterization of β-amyrin synthase from Aster sedifolius L. And triterpenoid saponin analysis. Plant Science 175:255-261.

Castiglione MR, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R (2011) The effects of nano-tio2 on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. And *Zea mays* L. Journal of Nanoparticle Research 13:2443-2449.

Chang JH, Shin JH, Chung IS, Lee HJ (1998) Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of Mentha piperita. Biotechnology letters 20:1097-1099.

Chattopadhyay D (1990) Chromosome studies and estimation of nuclear DNA in different varieties of Cuminum cyminum L. And Carum copticum Benth. And Hook. Cytologia 55:631-637.

Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J (2010) Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. Pharmacological Research 62:144-149.

Deepa K, Sheeja T, Santhi R, Sasikumar B, Cyriac A, Deepesh P, Prasath D (2014) A simple and efficient protocol for isolation of high quality functional RNA from

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

different tissues of turmeric (Curcuma longa L.). Physiology and Molecular Biology of Plants 20:263-271.
Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC (2002) Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag+ in Vibrio cholerae. Antimicrobial agents and chemotherapy 46:2668-2670.
Esmaeilzadeh Bahabadi S, Sharifi M (2013) Increasing the Production of Plant Secondary Metabolites Using Biotic Elicitors. Journal of Cell and Tissue 4:119-128. (In Farsi).
Esmaeilzadeh Bahabadi S, sharifi M, behmanesh M (2013) Increased the genes expression of phenylpropanoid biosynthesis pathway and production of podophyllotoxin by chitosan in cell cultures of Linum album. Modares Journal of Biotechnology 4:58-64. (In Farsi).
Fazeli-nasab B, Fooladvand Z (2016) A Review on Iranian *Carum copticum* (L.): Composition and Biological Activities. European Journal of Medicinal Plants 12:1-8.
Ghassemi B, Hosseini R, Dehghan nayeri F (2015) The Effect of Nano Cobalt and Nano Chitosan on Artemisinin production and expression of SQS and DBR2 genes in Artemisia annua. Genetic Engineering and Biosafety Journal 4:25-39. (In Farsi).
Hossein Panahi Z, Maroufi A, Bahramnejad B (2016) Isolation and Expression Pattern of β-amyrin Synthase in Chicory (*Cichorium intybus* L.). Modern Genetics 11:399-409. (In Farsi).
Howlett BJ (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. Current Opinion in Plant Biology 9:371-375.
Jesionek A, Kokotkiewicz A, Krolicka A, Zabiegala B, Luczkiewicz M (2018) Elicitation strategies for the improvement of essential oil content in Rhododendron tomentosum (Ledum palustre) bioreactor-grown microshoots. Industrial Crops and Products 123:461-469.
Jin JH, Shin JH, Kim JH, Chung IS, Lee HJ (1999) Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (Rubia akane Nakai) cell culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering 4:300.
Khodayari M, Omidi M, Shah Nejat Bushehri A, Yazdani D, Naqvi MR, Kadkhoda Z (2015b) Effect biological elicitor and nano elicitor on increasing the production of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum*). Iranian Horticultural Science 45:287-295. (In Farsi)
Khodayari M, Omidi M, Shah-Najat-Bushehri A, Shit M (2015a) Biological Elistor and Nano-Elistor Effect on Gene Expression of Some Populonic Alkaloids. Iranian Horticultural Science 45:287-295. (In Farsi).
Khoshnodi S, Ghesemi hagh Z, Ghanbarpor P (2013) Investigating the stress of silver in two nano sizes on germination and growth of cauliflower seeds. In: Proceedings of the 2nd National Conference on Sustainable Agriculture and Environment|. Conference Location|. (In Farsi)
Lubick N (2008) Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both?(ed)^(eds). ACS Publications.
Malekpoor F, Ghasemi Pirbalouti A, Salimi A, Momtaz H (2017) Effects of chitosan on gene expression of chavicol-O-methyl transferase and phenylpropanoid components of *Ocimum basilicum* (purple cultivar) under water defici. Journal of Cellular and Molecular Researches 30:282-294.
Manios T, Stentiford EI, Millner PA (2003) The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. Ecological Engineering 20:65-74.
Matkowski A (2008) Plant in vitro culture for the production of antioxidants-a review. Biotechnology advances 26:548-560.
Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed DW, Covello PS (2007) Saponin biosynthesis in Saponaria vaccaria. Cdnas encoding β-amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. Plant physiology 143:959-969.
Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science 179:154-163.
Nomani M, Noori SAS, Tohidfar M, Ramshini H (2019) Overexpression of TPS2 gene to increase thymol content using Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation in Trachyspermum ammi (Qom ecotype). Industrial Crops and Products 130:63-70.
Park H-J, Kim S-H, Kim H-J, Choi S-H (2006) A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. The Plant Pathology Journal 22:295-302.
Sargazi A, Fakheri B, Soloki M, Fazeli-Nasab B (2016) Genetic diversity of some population of medicinal Ajowan (*Carum copticum*) using RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Biotechnology 2:22-36. (In Farsi).
Seidi M, Kamaladini H, Haddadi F (2017) Bioinformatics Analysis of Chicory Beta Amyrin Synthase Promoter in Arabidopsis and Rice model plants. The First International Conference on New Findings in Biotechnology, Article COI: BIOTECH01-021. (In Farsi).
Singh G, Kapoor I, Pandey S, Singh U, Singh R (2002) Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 16:680-682.
Sobhanizadeh A, yadegari H, Fazeli-Nasab B, Fakheri B, Shahpesandi S (2015) Introduction on application of herbal medicine. In: Proceedings of the The 1st Anuual Iranian Agricultural Research Conference|. Conference Location|. Pp. Pages|. (In Farsi).
Trontin J-F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A (2016) Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In Vitro Embryogenesis in Higher Plants 167-207.
Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science 172:861-875.
Yu Z-Z, Fu C-X, Han Y-S, Li Y-X, Zhao D-X (2006) Salicylic acid enhances jaceosidin and syringin production in cell cultures of Saussurea medusa. Biotechnology letters 28:1027-1031.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology advances 23:283-333.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]