ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحه ۴۷ - ۳۳

بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر الگوی بیان ژن لیمونن سنتاز در کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه اروپایی (*Carum carvi* L.)

The effects of Silver Nanoparticles on the expression pattern of Limonene Synthase gene in Cell culture in *Carum carvi* L.

زهرا دهقانی آغچه کهل[۱]، منصور امیدی*[۲]، رضا عزیزی نژاد[۳]، علیرضا اطمینان[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

Dehghani-Aghchekohal Z[1], Omidi M[*2], Azizinezhad R[3], Etminan A[4]

1- PhD Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۴)

چکیده

زیره سیاه اروپایی (*Carum Carvi* L.)، گونه‌ای مهم از خانواده‌ی چتریان است که دارای ترکیبات ترپنی ارزشمندی می‌باشد. هدف از این مطالعه، ابتدا تعیین اثر تیمارهای مختلف هورمونی در تولید کالوس از ریز نمونه برگ و ریشه و همچنین انتخاب ریز نمونه و تیمار هورمونی برتر جهت کشت سوسپانسیون و سپس بررسی اثر نانوذرات نقره بر تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه و بیان ژن لیمونن سنتاز در کالوس حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی بود. نخست اثر ۶ تیمار هورمونی در محیط کشت MS بر کال‌زایی دو ریز نمونه (برگ و ریشه) با اندازه‌گیری صفات کمی شامل سطح و حجم کالوس و درصد کال‌زایی و صفات کیفی بافت و رنگ کالوس و میزان کال‌زایی در هر یک از تیمارها بررسی شد. با درنظر گرفتن صفات فوق، ریز نمونه برگ در تیمار هورمونی MS2 که شامل IBA (0.1 mg/l), 2IP (0.5 mg/l) and BA (0.5 mg/l) بود، به‌عنوان ریز نمونه و تیمار هورمونی برتر شناسایی شدند. جهت ادامه مطالعات کالوس‌های حاصل از ریز نمونه و تیمارهورمونی برتر به محیط کشت سوسپانسیون سلولی حاوی محیط کشت MS بدون آگار منتقل و نمونه‌ها تحت شرایط تاریکی در دمای ۲۴°C روی شیکر با ۱۲۰ rpm قرار داده شدند. بعد از تکثیر کالوس‌ها و رسیدن به رشد مطلوب، نمونه‌ها با نانوذرات نقره در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ mg/l تیمار شدند و از کالوس‌ها در بازه زمانی صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار نمونه‌گیری انجام گرفت. داده‌های حاصل از GC و GC/MS و نیز بررسی بیان ژن لیمونن سنتاز نشان داد که نانوذرات نقره به‌عنوان یک محرک غیرزنده با تشدید پاسخ‌های دفاعی در زیره سیاه، باعث تغییر در میزان سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند لیمونن، کاروون، کارواکرول، تیمول، پی-سایمن و گاما-ترپینن و همچنین افزایش بیان ژن لیمونن سنتاز شد. به‌طوری‌که در بازه زمانی ۲۴ ساعت و غلظت ۱۰۰ mg/l و بازه زمانی ۴۸ ساعت و غلظت ۵۰ mg/l در مقایسه با نمونه شاهد بالاترین میزان بیان ژن لیمونن سنتاز مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
زیره سیاه اروپایی
کشت سوسپانسیون
لیمونن سنتاز
متابولیت ثانویه

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

مقدمه

زیره سیاه اروپایی[1] با نام علمی (*Carum carvi* L.) و ساختار ژنتیکی 2n=2X=20، متعلق به خانواده‌ی چتریان (*Apiaceae*) و گیاهی عموماً دوساله است (Aghari et al. 2014; Sachan et al. 2016). زیره یک گونه با توزیع جهانی است که از دوران باستان به‌عنوان یک گیاه دارویی و خوراکی شناخته شده است. زیره بومی اروپا، آسیای‌غربی و شمال آفریقا می‌باشد و در مناطق مختلفی از جمله در شمال اروپا تا مدیترانه، روسیه، ایران، اندونزی، شمال آمریکا، سیبری، مصر، استرالیا، چین و ترکیه کشت و مصرف می‌شود (Rao et al. 2011; von Maydell et al. 2021). بذرهای زیره سیاه حاوی ترکیبات مختلفی است. بیشترین ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در روغن فرار زیره سیاه شامل دی-لیمونن[2]، آر-کاروون[3]، سیس-کاروئول، آلفا-پینن[4] و بتا-میرسن[5]، کارواکرول[6]، گاما-ترپینن[7] و لینالول[8] می‌باشد (Fang et al. 2010; Al-Snafi 2015). همچنین ترکیبات شمیایی موجود در روغن فرار زیره سیاه شامل مونوترپن‌های اکسیژن دار، مونوترپن‌ها، سزکویی‌ترپن‌ها[9]، اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، کتون‌ها[10]، آلدئیدها[11] و نمک‌های آلی می‌باشد (Simic et al. 2008; Meshkatal-sadata and Salahvarzib 2012). تحقیقات زیادی بر روی اثرات دارویی زیره سیاه صورت گرفته است و این دانه‌ها دارای توانایی زیادی در عمل به‌عنوان ضد میکروب (Simic et al. 2008)، ضد باکتری و قارچ‌کش (Lacobellis et al. 2005)، کاهش دهنده‌ی قند خون (Eddouks and Lemhadri 2004; Erjaee et al.2015)، کاهش‌دهنده‌ی چربی خون و ضدتومور (Kumar and Singh 2006)، ضد سرطان، ضد عملکرد افلاتوکسین و آنتی‌اکسیدان (Zheng et al. 1992; De-Martino 2009; Wojdylo et al. 2007) می‌باشند.

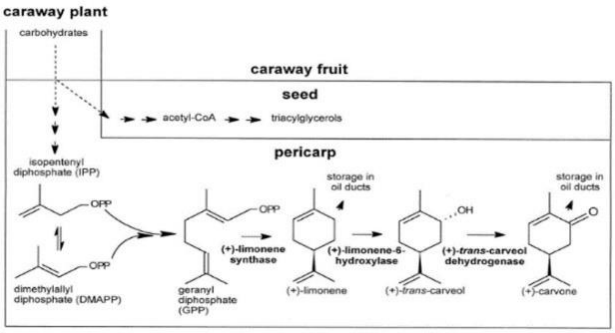
تحقیقات مختلفی با هدف‌های گوناگون در خصوص انواع ریز نمونه‌ها و اثر تیمارهای هورمونی مختلف یا میزان ساکارز یا محیط‌های مختلف کشت سلول در گونه‌های مختلف خانواده چتریان صورت گرفته است، اما به‌طور مشخص تحقیقی در خصوص انتخاب ریز نمونه مناسب در زیره سیاه اروپایی برای تهیه سوسپانسیون سلولی وجود ندارد. در مطالعه‌ای که بر ریز نمونه‌های ریشه جهت تولید کالوس از زیره سیاه ایرانی (*Bunium persicum Boiss*) صورت گرفته است، از محیط MS پایه حاوی ۲ mg/l کینتین[12] و ۰/۵ mg/l نفتالین استیک اسید (NAA) و ۵/۸ mg/l آگار استفاده کردند و بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط سوسپانسیون سلولی حاوی هورمون و فاقد هورمون و مقایسه نتایج، اعلام کردند که تفاوت معنی‌داری در میزان تولید کاروون در اثر متقابل بین دفعات صوت‌دهی با امواج فراصوت و مدت زمان اثر امواج و وجود یا عدم‌وجود هورمون در محیط وجود دارد (Atrashi et al. 2011). در تحقیق دیگری، سیستم کشت توأم سلولی دو گیاه زیره سیاه کوهی و زیره سیاه اروپایی برای رسیدن به حداکثر بیوماس سلولی درمحیط کشت MS جامد و اثر غلظت‌های مختلف ساکارز مورد بررسی قرار گرفته است و بی تأثیر بودن تغییرات ساکارز را بر افزایش وزن تر کالوس اعلام کردند (Ghayor kazemi et al. 2016).

مونوترپن‌ها[13] گروه بزرگی از ترپنوئیدها[14] هستند که از سلول‌های تک‌لپه، دولپه، قارچ‌ها و جلبک‌ها ترشح می‌شوند. مونوترپن‌ها برای خود گیاه نقش دفاعی و حمایتی داشته و در دفع آفات و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی به گیاه کمک می‌کنند این مواد همچنین دارای ارزش صنعتی و دارویی فراوانی هستند و در اقتصاد سلامت انسان‌ها نقش مهمی دارند (Amanlou et al. 2004; Holopainen and Gershenzon 2010). یکی از رایج‌ترین مونوترپن‌ها، لیمونن می‌باشد، که در ابتدای مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها، به‌عنوان یک عامل مهم در تولید ترکیبات شیمیایی بسیار مهم می‌باشد (Toghroli et al. 2016). متابولیت ثانویه مهم و ارزشمند لیمونن از پیش ماده ژرانیل دی‌فسفات[15] (GPP)

[1] Caraway
[2] D-Limonene
[3] R-Carvone
[4] α-Pinene
[5] β-Myrcene
[6] Carvacrol
[7] γ-Terpinene
[8] Linalool
[9] Sesquiterpene
[10] Ketone
[11] Aldehyde
[11] Kinetin
[12] Monoterpen
[13] Terpenoid
[14] Geranyl diphosphate

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

به‌وسیله لیمونن سنتاز[1] به‌وجود می‌آید (شکل ۱). لیمونن سنتاز آنزیم بسیار مهمی در مسیر بیوسنتزی روغن‌های فرار می‌باشد. بنابراین هرگونه دست ورزی در بیان ژن‌های این مسیر بیوسنتزی می‌تواند موجب تغییر ترکیب‌های موجود در روغن‌های فرار گیاهی که مهم‌ترین آن‌ها لیمونن و کاروون است، شود و یا تولید مونوترپن‌ها را در اندام‌هایی از گیاه که آن‌ها را تولید نمی‌کنند سبب شود (Kjonaas et al.1983; Muñoz-Bertomeu et al. 2008).



شکل ۱- مسیر بیوسنتز لیمونن و کاروون (Bouwmeester et al. 1988)

تولید انبوه و با سرعت متابولیت‌های ثانویه در حجم‌های بالا از طریق روش‌های طبیعی مشکل و یا تقریباً غیرممکن است و محدودیت‌های دیگری هم در طبیعت برای تأمین این مواد وجود دارد (Smetanska 2008; Goers et al. 2014; Anjum et al. 2017). تحقیقاتی که در تولید ترکیبات دارویی مهم در محیط کشت سلول از این گیاه و دیگر گیاهان، جهت افزایش ترکیبات دارویی انجام شده است، نشان می‌دهد که کشت سلول یک استراتژی مناسب برای افزایش قابل توجه تولیدات دارویی و ترکیبات فیتوشیمیایی است و می‌تواند گزینه خوبی برای تولید سریع، انبوه و مداوم متابولیت‌های ثانویه و همچنین افزایش میزان این مواد دارویی در زمان کوتاه باشد (Manjkhola et al. 2005; Rani et al. 2017). بیشتر تحقیقات، افزایش کیفیت و کمیت ترکیبات فیتوشیمیایی و پیدا کردن ژنوتیپ‌های برتر را از طریق مطالعه بر روی ژنوتیپ‌های مختلف در کشت سلول را، هدف گرفته‌اند (Rani et al. 2017; Ebrahimi et al. 2012). اگرچه متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی به‌طورمعمول تحت تأثیر ژنوتیپ آن‌ها می‌باشند، اما بیوسنتز این ترکیبات به شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی ازجمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند و همواره استفاده از تنش‌های زیستی و غیرزیستی و تیمار سلول‌های گیاهی یکی از مؤثرترین ابزارهایی است که سنتز متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهند (Khorasaninejad et al. 2011; Roberts and Shuler 1997). نانوذرات (۱-۱۰۰ نانوگرم) می‌تواند به‌عنوان یک محرک جدید و مؤثر برای تحریک تولید ترکیبات فیتوشیمیایی باشد (Zhao et al. 2010). در تحقیقات موجود، نانوذرات نقره (AgNPs) عامل مؤثر در افزایش انباشت فلاونوئیدها، آنزیم‌های استرس، پروتئین‌ها و ترکیبات فنولیک ذکر شده است (Zhao et al. 2010; Ghazal et al. 2018). به‌طوری که می‌دانیم اثر نانوذرات نقره به‌طور گسترده بر روی میزان روغن فرار *C.carvi* بررسی نشده است. این تحقیق با هدف بررسی ریزنمونه و تیمارهورمونی برتر و نیز بررسی میزان تغییرات متابولیت‌های ثانویه در زیره سیاه اروپایی و همچنین بررسی نسبی تغییرات بیان ژن لیمونن سنتاز که یک ژن مؤثر در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها است، در اثر تحریک نانوذرات نقره صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور اجرای آزمایش، از بذور زیره سیاه اروپایی تهیه شده از مزرعه گیاهان دارویی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده شد. جهت جوانه‌زنی بذور، در کشت درون شیشه‌ای، ابتدا بذور جهت شستشو در آب جاری قرار گرفت و سپس طی سه مرحله تحت شرایط استریل در زیر هود با مواد ضدعفونی تیمار شدند. در مرحله‌ی اول، بذور را به مدت یک دقیقه با الکل ۷۰٪ تیمار شدند، سپس به مدت ۲ دقیقه با آب‌مقطر دوبار استریل شستشو و در مرحله‌ی دوم، به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱۵٪ ضدعفونی سطحی شدند و در مرحله‌ی آخر سه بار به مدت ۲ دقیقه با آب‌مقطر دوبار استریل شستشو شدند. بذور ضد عفونی شده در محیط کشت 1/2 MS (Murashinge and Skoog 1962) فاقد هورمون با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار و با PH حدود ۵/۸ کشت شده و برای جوانه‌زنی بهتر بذور و شکستن

[1] Limonene synthase

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

خواب بذور، به مدت ۸ هفته در یخچال نگهداری شدند. بعد از جوانه‌زنی، بذور جوانه‌زده به اتاق کشت با دمای ۲۴ ±۱ °C و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از چهار هفته و دستیابی به گیاهچه‌های متناسب حدود ۱۰-۷ سانتی‌متر، ریز نمونه‌های مناسب از ناحیه برگ و ریشه برای القاء کالوس، انتخاب و به محیط کال‌زایی منتقل شدند. برای این منظور ریز نمونه‌های برگ و ریشه از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای روی محیط کشت MS پایه حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفتند (جدول ۱). کالوس‌های مورد نظر پس از دوبار واکشت سه هفته‌ای، بر اساس صفات کیفی بافت، رنگ و میزان کال‌زایی و صفات کمی حجم، سطح کالوس و درصد کال‌زایی جهت انتخاب ریز نمونه و تیمارهورمونی برتر بررسی شدند (جدول ۲). بررسی داده‌های به‌دست آمده از کال‌زایی برای صفات کمی با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و مقایسات میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت و نتایج با نرم‌افزار SPSS 26 و Excel 2019 ارزیابی شدند. در بررسی صفات کیفی از روش آماری غیرپارامتری استفاده شد و نتایج با آزمون Kruskal-Wallis توسط نرم‌افزار SPSS 26 ارزیابی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، ریز نمونه مناسب و تیمار هورمونی مناسب جهت کشت سوسپانسیون انتخاب و ریز نمونه برتر به محیط سوسپانسیون MS (محیط فاقد آگار) با ترکیب هورمونی برتر منتقل و در شیکر یخچال‌دار در محیط تاریکی با دمای ۲۴ °C و ۱۲۰ rpm نگهداری شدند. پس از تکثیر کالوس‌ها و رسیدن به رشد مطلوب در فاز نمایی (روز ۲۳) تمام نمونه‌ها با نانوذرات نقره[1] موجود در این تحقیق تیمار شدند. بدین ترتیب که ابتدا غلظت مورد نظر از نانوذرات نقره در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ mg/l تهیه شدند، سپس تیمارها در سه بازه زمانی صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار با محرک، نمونه‌گیری شدند. کالوس‌های رشد یافته در سوسپانسیون‌سلولی در سه بازه زمانی صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار برای اندازه‌گیری متابولیت‌ها با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری شدند و بلافاصله در دمای ۸۰°C- جهت ادامه آزمایش‌ها نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری متابولیت‌های این گیاه، کالوس‌های تیمار شده با نانوذرات نقره به میزان ۱۰۰ گرم با دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شدند. به این منظور کالوس‌ها با کاربرد روش تقطیر با بخار آب، در دستگاه کلونجر ریخته شد. عملیات اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت انجام و اسانس جمع شده در فاز رویی در انتهای لوله تقطیر از هر تیمار و شاهد در ظروف شیشه‌ای تیره در یخچال در دمای ۴°C جهت ادامه کار نگهداری شدند. در مرحله بعد برای جداسازی و شناسایی ترکیبات اسانس از دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف نگارجرمی (GC/MS) از شرکت Thermo Quest-Finnigan مدل TRACE MS مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، برای تفکیک و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس استخراج شده از نمونه‌ها استفاده شد. نوع گاز حامل هلیم بود و برنامه حرارتی ستون از ۶۰°C شروع شده و پس از ۵ دقیقه توقف در همان دما، به تدریج با سرعت ۳°C در دقیقه افزایش یافته و تا به ۲۵۰°C رسید. دمای محفظه تزریق ۲۵۰°C بود. نوع طیف سنج جرمی هم Quadrupole بود.

[1] $AgNo_3$

جدول ۱- ترکیبات هورمونی استفاده شده برای کال‌زایی

نام محیط کشت	اکسین mg/l			سیتوکینین mg/l	
	2-4-D	NAA	IBA	2IP	BA
MS1(شاهد)					
MS2			0.1	0.5	0.5
MS3		1			0.2
MS4	1				0.2
MS5			0.1	0.5	0.5
MS6			0.1	1	1
MS7		**0.2**			

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

جدول ۲- کدهای مربوط به صفات کیفی

بافت کالوس	کد	رنگ کالوس	کد	میزان رشد کالوس	کد
ترد	۴	سفید	۵	بسیار عالی	۵
گلوبولار	۳	کرم	۴	عالی	۴
سخت	۲	سبز	۳	متوسط	۳
خیلی سخت	۱	قهوه ای	۲	کم	۲
		قهوه ای تیره	۱	خیلی کم	۱

جدول ۳- اطلاعات مربوط به آغازگرهای ژن‌ها جهت واکنش Real Time PCR

نام ژن	توالی(´3-´5)	Tm (ºC)	%GC	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)
Limonene synthase	GCTTTGGTGTCGAAGATGGT	57.30	50	197
	CACACTGGGATGTTTTGCAG	57.30	50	
Ubiquitin(UBC)	CCAAAGGTTGCATTCAGGAC	51.8	50	241
	ACTTCTGGGTCCAGCTCCTT	53.8	55	

دستگاه GC هم از شرکت سازنده Thermo Quest-Finnigan و مدل TRACE GC بود. دتکتور دستگاه GC از نوع FID بود که دمای آن ۲۸۰°C تنظیم شد. از گاز N_2 به‌عنوان گاز حامل استفاده شد که جریان گاز حامل ml/min ۱/۱ بود. به‌منظور بررسی بیان نسبی ژن لیمونن سنتاز، نخست برای استخراج RNA کل از بافت کالوس حاصل از سوسپانسیون سلولی کالوس‌های برگ زیره سیاه اروپایی از کیت استخراج Total RNA شرکت BIOFACT استفاده شد و از روش ارائه شده این شرکت جهت مراحل کار استفاده شد. به‌منظور حذف آلودگی ژنومی، تیمار آنزیمی DNase شرکت Thermo Scientific بر اساس روش پیشنهادی شرکت اعمال شد. جهت اطمینان از کمیت و کیفیت مطلوب RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Spectrophotometer Systein, BioTek Instruments, USA EpochTM Multi-Volume)، و همچنین الکتروفورز بر روی ژل آگارز (۱/۵٪) استفاده شد. برای ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA، مربوط به شرکت Thermo Scientific به‌نام RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit، از روش پیشنهادی شرکت استفاده شد. از ژن Ubiquitin (UBC) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. (Darvishi et al. 2015) برای انجام واکنش آغازگرهایی برای ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق (لیمونن سنتاز و Ubiquitin (UBC)) بر اساس توالی ژن‌ها از پایگاه اطلاعاتی (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) دریافت و بعد، آغازگر اختصاصی رفت و برگشتی برای این ژن جهت بررسی بیان این ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) طراحی شد (جدول ۳). این آغازگرها، BLAST شده و اختصاصی بودن جایگاه اتصال آن‌ها در گیاه تائید شد. پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به‌منظور تائید سنتز cDNA، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد و نتایج بر روی ژل (۱/۵٪) تعیین شد. در نهایت برای بررسی بیان نسبی ژن لیمونن سنتاز در گیاه زیره سیاه اروپایی در پاسخ به نانوذرات نقره واکنش PCR در زمان واقعی (Real time PCR) با مستر میکس شرکت Ampliqon که دارای رنگ فلورسنت Eva Green به‌نام Real Q Plus 2X Master Mix Green است انجام شد. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌ها و غلظت واکنش‌گرها طبق دستورالعمل شرکت سازنده تنظیم شد. فرآیند Real time PCR با استفاده از آغازگرهای ژن کنترل داخلی (Ubiquitin) UBC و ژن Limonene synthase انجام شد. مقدار نهایی هر نمونه ۲۰µl بود و واکنش در دستگاه Bio-Rad CFX96 real-time PCR Detection machine (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) انجام شد. برنامه دستگاه شامل واسرشته سازی اولیه با دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، و پس از آن ۳۹ چرخه با واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۴°C به مدت ۶۰ ثانیه،

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

دمای اتصال ۵۴/۵°C برای پرایمرهای لیمونن سنتاز و دمای ۶۰/۵°C برای پرایمرهای UBC به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و مرحله تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. با استفاده از روش (Livak and Schmittgen 2001) $2^{-\Delta\Delta Ct}$، میزان بیان ژن مذکور برای هر نمونه محاسبه و میزان تغییرات بیان این ژن تحت تیمار با نانوذرات نقره نسبت به نمونه شاهد سنجیده شد. تجزیه و تحلیل آماری میزان بیان نسبی ژن مذکور در قالب طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای با دو تکرار بیولوژیک و هر تکرار دو مشاهده (تکرار تکنیکال) صورت گرفت. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS26 و براساس ANOVA تجزیه شد و مقایسات میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نمودارها در نرم‌افزار Excel 19 رسم شدند.

نتایج و بحث

پس از جوانه زنی بذور زیره سیاه در محیط 1/2MS فاقد هورمون بعد از گذشت ۸ هفته کشت و نگه‌داری در یخچال و دمای ۴°C و دست‌یابی به گیاهچه‌های مادری مناسب، ریزنمونه‌هایی از ریشه و برگ تهیه و پس از کال‌زایی، صفات کمی درصد کال‌زایی، سطح و حجم کالوس و صفات کیفی رنگ، بافت و میزان رشد کالوس در محیط کشت MS با ۶ تیمار هورمونی (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7) در مقایسه با شاهد بررسی شد. در بررسی‌هایی که بر روی ریز نمونه‌های برگ و ریشه که مورد بررسی قرار گرفتند، مشاهده شد که در ابتدا هر دو ریز نمونه بعد از حدود ده روز که به محیط کال‌زایی منتقل شده بودند، به‌طور محسوسی متورم شدند و رنگ مناسبی داشتند این کال‌ها در ریز نمونه برگ با حجم بیشتری مشاهده شد و به رنگ سفید و نرم ظاهر شد (اشکال ۲-الف و ب). اما در ریز نمونه ریشه به رنگ سفید و گلوبولار و با حجم کمتری نسبت به برگ بود. بعد از هفته دوم ریز نمونه ریشه به جهت بالا بودن مواد فنلی در محیط کشت تغییر رنگ داده و رنگ آن رو به قهوه‌ای شدن رفت (اشکال ۲-ج و د). اما ریز نمونه برگ کال‌زایی مناسبی داشت که البته در بعضی از تیمارهای هورمونی پاسخ بهتری داشت. براساس مصرف مواد مغذی محیط توسط ریز نمونه‌ها، هر سه هفته یک بار عمل واکشت انجام شد.



شکل۲- الف، ب: کالوس به‌دست آمده از ریز نمونه برگ. ج، د: کالوس به‌دست آمده از ریز نمونه ریشه در زیره سیاه.

و بعد از واکشت دوم ارزیابی صفات فوق انجام و داده‌های به‌دست آمده از این صفات مورد آنالیز قرار گرفت. در مقایسه انجام شده و نتایج تجزیه‌ی واریانس (جدول ۴) درخصوص اثر متقابل نوع تیمارهورمونی و ریز نمونه بر اندازه سطح کالوس‌ها، مشاهده شد که اندازه سطح کالوس در هر دو ریز نمونه به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر نوع تیمارهای هورمونی و ریز نمونه می‌باشد ($p<0.05$). مقایسه میانگین سطوح مختلف تیمارهورمونی و ریز نمونه‌ها نشان داد که بیشترین سطح کالوس (۴/۱ سانتی‌متر مربع) مربوط به ریز نمونه برگ در تیمار هورمونی MS2 (0.1 mg/l) 2IP (0.5 mg/l) and BA (0.5 mg/l) ثبت شد (شکل ۳-الف). نتایج اندازه سطح کالوس در ریز نمونه ریشه به جهت بالا بودن میزان مواد فنلی و تیره و چوب پنبه‌ای شدن کالوس‌ها با نتایج به‌دست آمده از ریز نمونه برگ بسیار متفاوت بود، به این ترتیب که تیمار هورمونی (NAA 1 mg/l and BA 0.2 mg/l) MS3 بالاترین میانگین سطح کالوس را در ریز نمونه ریشه (۰/۹ سانتی‌متر مربع) نشان داد که تفاوت زیادی با میانگین سطوح به‌دست آمده در ریز نمونه برگ داشت (شکل ۳-الف). بر اساس مقایسه‌ی میانگین‌های نمونه‌ها در به‌دست آوردن میزان حجم بیشتر کالوس، نتایج نشان داد که اثر متقابل بین ریز نمونه و تیمار

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

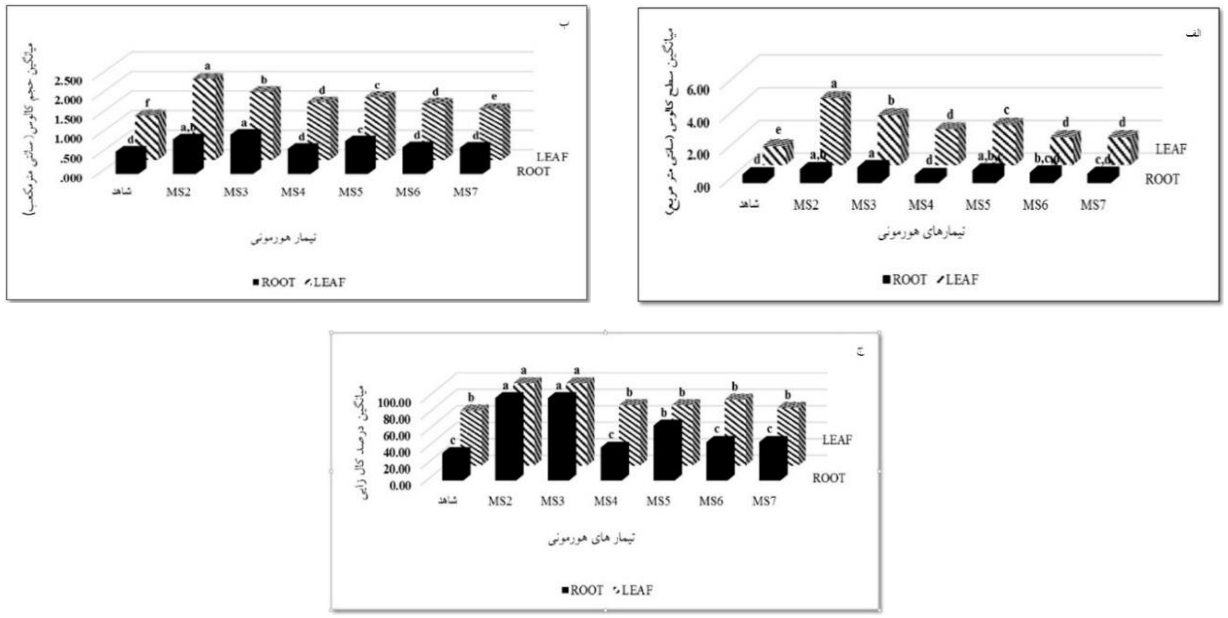
هورمونی هم به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) تحت تأثیر نوع ریزنمونه و تیمار هورمونی به‌کار رفته می‌باشد (جدول ۴) و بیشترین میزان حجم کالوس تولید شده (۲/۰۶۷ سانتی‌متر مکعب) در ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی MS2(0.1 mg/l) 2IP (0.5 mg/l) and BA (0.5 mg/l) بود (شکل ۲–ب) و در ریزنمونه ریشه حجیم‌ترین کالوس (۱ سانتی‌مترمکعب) مربوط به تیمار هورمونی MS3 (NAA 1 mg/l and BA 0.2 mg/l) بود.(شکل۳–ب)

بررسی نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) مربوط به درصد کال‌زایی نیز نشان داد که درصد کال‌زایی نیز به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) تحت تأثیر اثر متقابل نوع ریز نمونه و تیمارهورمونی قرار دارد و بالاترین درصد کال‌زایی (۱۰۰ درصد) مربوط به هر دو ریز نمونه برگ و ریشه در تیمارهای هورمونی MS2 و MS3 ثبت شد. که نتایج حاکی از این بود که تیمارهای هورمونی MS2 و MS3 دارای تفاوت معنی‌داری در درصد کال‌زایی با دیگر تیمارها داشتند (شکل ۳–ج). در بررسی صفات کیفی کالوس، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمار هورمونی MS2 (۳۹/۵) و MS4 (۳۹/۵) در ریزنمونه برگ، دارای بافت ترد که بهترین بافت را برای تهیه سوسپانسیون سلولی دارا می‌باشد، بودند. در خصوص صفت رنگ کالوس بهترین رنگ که کالوس سفید بود در ریزنمونه برگ در تیمارهورمونی MS2 (۴۱) مشاهده شد. اما ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی MS4 (۳۶/۵) و MS6 (۳۶/۵) هم رنگ مناسبی داشت. در خصوص میزان رشد کالوس، تیمارهای MS2 (۴۱) MS4 (۳۶/۵) و MS6 (۳۶/۵) به‌ترتیب دارای رشد بسیارعالی در کالوس بودند.

جدول۴– آنالیز واریانس برای صفات سطح و حجم کالوس و درصد کال‌زایی گیاه زیره سیاه اروپایی *Carum carvi*

منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		
		سطح کالوس	حجم کالوس	درصد کال زایی
ریزنمونه	۱	۳۲/۷۲۶*	۶/۴۰۴*	۳۶۲۱/۴۲۹*
تیمارهورمونی	۶	۱/۸۲۳*	۰/۲۹۱*	۲۵۴۸/۴۱۳*
اثر متقابل ریزنمونه x تیمار هورمونی	۶	۱/۰۲۰*	۰/۰۵۹*	۳۷۶/۹۸۴*
خطای آزمایش	۲۸	۰/۰۱۸	۰/۰۰۶	۶۶/۶۶۷

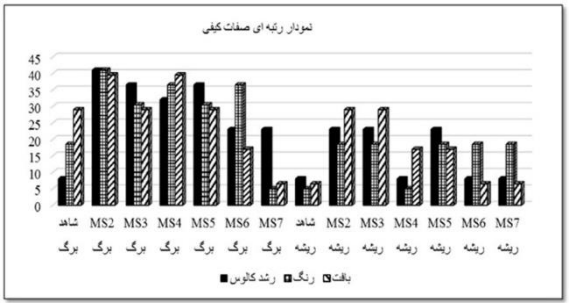
*وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪



شکل ۳– مقایسه میانگین اثر متقابل ریز نمونه‌ها (ریشه و برگ) و تیمارهای مختلف هورمونی (MS2-MS7) در مقایسه با نمونه شاهد در صفات کمی الف: سطح کالوس، ب: حجم کالوس و ج: درصد کال‌زایی

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

به‌طور کلی این سه تیمارهورمونی در ریز نمونه برگ کالوس‌های بسیار پرحجم و رنگ مناسبی را تولید کردند که برترین آن‌ها تیمار هورمونی MS2 بود. اما در ریزنمونه ریشه به جهت تولید مواد فنلی در محیط کشت و تغییر رنگ بسیار زیاد کالوس به قهوه‌ای تیره و همچنین بافت گلوبولار برای تهیه سوسپانسیون سلولی مطلوب نبود (شکل ۴).



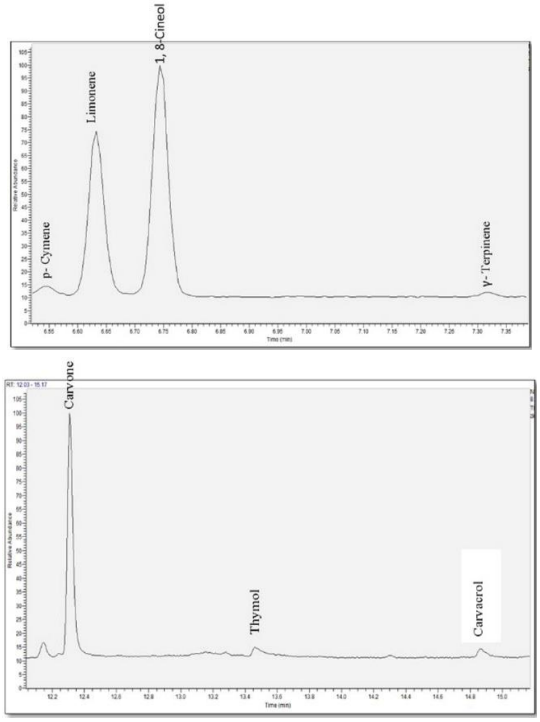
شکل ۴- نمودار رتبه ای صفات کیفی بافت، رنگ و رشد کالوس مربوط به ریز نمونه‌ها (ریشه و برگ) در تیمارهای هورمونی مختلف (MS2-MS7) در مقایسه با نمونه شاهد در زیره سیاه.

در نهایت با توجه به اینکه ریز نمونه برگ در تیمارهورمونی MS2، هم از لحاظ صفات کیفی مانند رنگ و بافت کالوس و میزان رشد کالوس دارای برترین میانگین بود و هم از لحاظ صفات کمی حجم و سطح کالوس و درصد کال‌زایی نیز بالاترین میانگین را دارا بود و کالوس‌های یکنواخت با رنگ روشن و بافت ترد و پفکی تولید کرده بود، جهت تکثیر در محیط کشت سوسپانسیون سلولی برای ادامه مطالعه انتخاب شد. نتایج نشان دادند که حضور تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت، باعث افزایش میزان تولید کالوس شده است و نیز حضور همزمان اکسین و سیتوکینین در محیط کشت با نسبت‌های مناسب باعث افزایش حجم کالوس‌ها شد (Amini et al. 2013). بنابراین میزان تولید کالوس بستگی زیادی به ترکیب هورمون‌های رشد به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکینین یک فاکتور تعیین کننده و مهم در تولید کالوس‌های حجیم می‌باشد (Abbasi et al. 2007). البته این موضوع در تحقیقات درخصوص دیگر گیاهان نیز تأکید و گزارش شده است (Neibaur et al. 2008). البته پایین بودن میزان کال‌زایی در تیمارهای هورمونی فاقد سیتوکینین (MS7) بیانگر این است که تناسب در غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد جهت القاء کالوس نقش کلیدی در تولید کالوس‌های متناسب دارد که Thomas (2006) and Maseena نیز اعلام کردند که باید میزان متناسبی از اکسین به‌همراه سیتوکینین جهت کال‌زایی استفاده شود. تغییر در ترکیبات هورمونی و میزان اکسین و سیتوکینین در تیمارهای مختلف در بافت و رنگ و میزان رشد کالوس نیز مؤثر بوده و همچنین رنگ و بافت کالوس‌های حاصل از ریز نمونه ریشه و برگ نیز بسته به هورمون‌های مورد استفاده متفاوت بودند، بنابراین درصد کالوس‌های رشد یافته، رنگ و بافت کالوس‌ها و میزان رشد کالوس و نیز حجم و سطح کالوس‌ها به ترکیبات محیط کشت وابسته است (Abd Elaleem et al. 2009). نوع ریز نمونه نیز در تولید کالوس بسیار مؤثر است که اثر نوع ریزنمونه در تولید کالوس توسط تحقیقات دیگری نیز گزارش شده است به‌طوری که در گیاه *Salsola pestifer* تولید کالوس از ریز نمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ بهتر بود، اما در گونه دیگری از این گیاه، یعنی *Salsola lanata* در تشکیل کالوس ریز نمونه برگ مناسب‌تر بود (Stefaniak et al. 2003). انتخاب یک ریز نمونه مناسب نقش اساسی در ادامه روند مطالعات بازی می‌کند و پیچیدگی‌های مورفولوژیکی یک ریز نمونه به‌همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب تاثیر چشمگیری بر القاء کالوس دارد (Mandal and Gupa 2001). تفاوت فاحشی در قدرت کال‌زایی ریزنمونه برگ و ریشه در این مطالعه وجود داشت که در مطالعه‌ای که جهت بهینه سازی کال‌زایی وکشت سوسپانسیون سلولی در گیاه گل تلگرافی انجام دادند نیز ریز نمونه برگ را به‌عنوان برترین ریز نمونه برای کال‌زایی معرفی شد (Ahmadi et al. 2012). به‌طورکلی با وجود اطلاعات ژنتیکی یکسان همه‌ی سلول‌ها جهت تولید گیاه کامل در همه ریز نمونه‌ها توانایی یکسانی برای تولید کالوس ندارند (Dang et al. 2002) وتشکیل کالوس مناسب وابسته به نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی می‌باشد و تفاوت در توان کال‌زایی ریز نمونه‌ها وابسته به تفاوت متابولیکی و میزان هورمون درون‌زای ریز نمونه‌ها می‌باشد (Shooshtari et al. 2018).

با بررسی نتایج حاصل از GC/MS و GC (داده‌ها نمایش داده نشده است)، متابولیت‌های ثانویه موجود در سوسپانسیون سلولی

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

حاصل از کالوس زیره سیاه ترکیب روغن فرار شناسایی (شکل ۵) و مشخص شدن میزان هر یک در تیمارهای مختلف زمان و غلظت محرک نانوذرات نقره نشان داد که ترکیب روغن فرار تحت تأثیر مدت زمان و میزان غلظت محرک تغییرات مختلفی داشتند. متابولیت‌های اصلی زیره سیاه نظیر لیمونن، گاما-ترپینن و دی هیدروکاروون کاهش و متابولیت‌هایی نظیر کاروون، گاما-پینن، لینالول و جرانیل افزایش داشتند (جدول ۵). متابولیت لیمونن که از ترکیبات اصلی روغن فرار زیره سیاه به شمار می‌رود تحت تأثیر محرک نانوذرات نقره کاهش قابل توجهی از خود نشان داده است به‌طوری که به میزان ۱/۲۴٪ در کمترین حالت رسیده است (شکل ۶)، اما متابولیت کاروون که یکی از متابولیت‌هایی است که پیش سازش لیمونن می‌باشد بعد از محرک افزایش یافته است و بالاترین افزایش را در بازه زمانی ۲۴ در هر دو غلظت mg/l ۵۰ و ۱۰۰ از خود نشان داده و به‌ترتیب ۲۳/۱۴ و ۲۳/۷۴ ٪ شده است (شکل ۷).



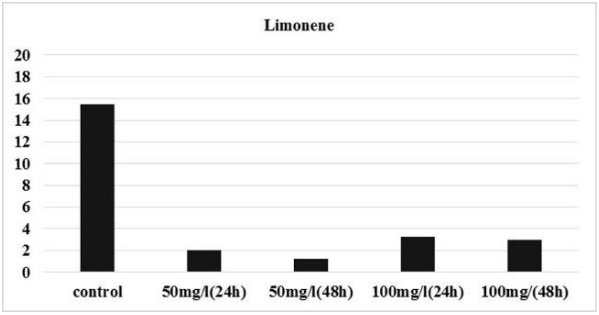
شکل ۵- گراف GC/MS مربوط به متابولیت‌های p-cymene, Limonene, 1,8-Cineol, γ-Terpinene, Carvone, Carvacrol, Thymol در کالوس زیره سیاه

جدول ۵- ترکیب روغن فرار (٪) در سوسپانسیون زیره سیاه تیمارشده با AgNPs (۵۰ mg/l و ۱۰۰) بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار

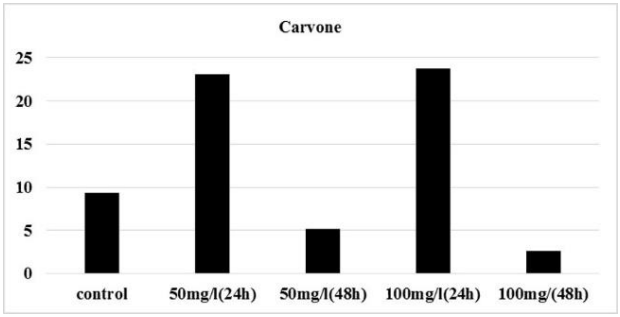
ترکیبات	RI	شاهد	۵۰		۱۰۰	
			۲۴	۴۸	۲۴	۴۸
α-Pinene	۹۳۶	۴/۴۴	۹/۱۹	۷/۰۹	۰	۰
Camphen	۹۵۲	۲۸/۶۶	۰	۰	۰	۰
p-Cymene	۱۰۲۹	۰	۲/۰۸	۱/۹۸	۰/۵۵	۰/۷۴
Limonene	۱۰۳۲	۱۵/۴۴	۲/۰۱	۱/۲۴	۳/۲۵	۲/۹۴
1,8-Cineol	۱۰۳۶	۴/۶۴	۰/۳	۰/۰۶	۳/۲۶	۲/۳۸
γ-Terpinene	۱۰۶۰	۱/۸۸	۰/۱۹	۰/۱	۰	۰
Linalool	۱۱۰۵	۲/۲۶	۵/۴۳	۲/۳۹	۰/۰۹	۰
Iso phorone	۱۱۳۱	۱/۵	۲/۵۲	۰/۹	۸/۶۶	۶/۳۲
α-Terpineol	۱۲۰۰	۳/۰۸	۴/۹۸	۲/۰۳	۳/۱۴	۱/۸۹
Cis-Dihydrocarvone	۱۲۰۸	۵/۱۸	۰/۴۱	۰/۳	۱/۳۷	۱/۱۴
Trans-Dihydrocarvone	۱۲۱۱	۰	۱/۳۲	۰/۳۱	۰/۵۱	۰
Neral	۱۲۴۹	۰	۵/۷۸	۱/۲۷	۱/۵۲	۰/۷۳
Pulegone	۱۲۵۲	۱/۹	۲/۳۶	۰/۵۲	۰/۴۸	۰

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

Carvone	۱۲۵۷	۹/۳۷	۲۳/۱۴	۵/۲	۲۳/۷۴	۲/۶۲
Cumin aldehyde	۱۲۶۷	۰	۱/۲۵	۰/۱۷	۲/۹۵	۰/۸۲
Geranial	۱۲۷۷	۰	۹/۰۷	۱/۶۷	۲/۶۵	۲/۰۲
E-Anethol	۱۲۹۴	۱۴/۷۷	۰	۰	۰	۰
Thymol	۱۳۰۲	۰	۸/۵۵	۶۳/۹۶	۷/۶۶	۵۱/۲۷
Carvacrol	۱۳۴۹	۰	۱۴/۳۹	۱/۸۷	۱۹/۳۱	۱/۱۵
Trans-Caryophyllene	۱۴۲۲	۰	۲/۰۸	۱/۶	۱/۴۱	۰



شکل ۶- مقایسه درصد لیمونن در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ mg/l در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء محرک در کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه در مقایسه با نمونه شاهد (Control).



شکل ۷- مقایسه درصد کاروون در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ mg/l در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از القاء محرک در کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه در مقایسه با نمونه شاهد (Control).

نکته قابل توجه اینکه میزان متابولیت‌های کارواکرول وتیمول که دو مونوترپن فنولیک بوده و ایزومر یکدیگر هستند و متابولیت پی-سایمن که پیش‌ساز این دو متابولیت می‌باشد نیز در اثر القاء نانو ذرات نقره افزایش یافته است، در صورتی که در نمونه شاهد به مقدار ناچیزی قابل مشاهده بودند. به‌طورکلی نانوذرات نقره در تیمارهای مختلف بعد از القاء باعث افزایش حجم متابولیت‌های تولیدی توسط گیاه شد و این افزایش میزان متابولیت در تیمول، در ۴۸ ساعت بعد از القاء محرک در غلظت ۵۰ mg/l افزایش چشمگیری داشته و ۶۳/۹۶٪ از حجم متابولیت تولیدی در این تیمار را به خود اختصاص داده است. در متابولیت کارواکرول این افزایش در تیمار، ۲۴ ساعت بعد از القاء محرک و غلظت mg/l ۱۰۰ اتفاق افتاده که به میزان ۱۹/۳۱٪ رسیده است. متابولیت پی-سایمن نیز که در نمونه شاهد بسیار ناچیز بوده است در غلظت ۵۰ mg/l در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از محرک افزایش داشته و میزان آن به ۲/۰۸٪ رسیده است. میزان تولید متابولیت ارزشمند گاما-ترپینن که به‌عنوان یک پیش ساز بسیار کلیدی در تولید متابولیت‌های پی-سایمن، کارواکرول و تیمول به حساب می‌آید، در اثر القاء نانوذرات نقره نسبت به نمونه شاهد کاهش داشت و در غلظت mg/l ۱۰۰ بعد از ۲۴ ساعت میزان آن کاهش یافته و تولید آن بسیار ناچیز بوده است.

به‌کار بردن روش کشت بافت گیاهی یک گزینه مناسب برای تولید پایدار متابولیت‌ها است و یک روش خوب برای دستیابی به

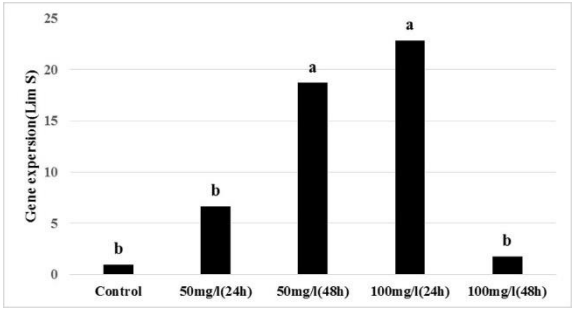
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

مقدار زیادی متابولیت‌های ثانویه، در کمترین زمان ممکن بود. زیرا زیره سیاه یک گیاه دوساله است و استخراج متابولیت از گیاهانی مانند زیره سیاه به جهت سختی جوانه‌زنی و خواب بذر بسیار سخت و هزینه‌بر است (Sasheva et al 2013, Anjum et al 2017). نتایج تحقیقات حاکی از آن است که گیاهان اغلب در شرایط تنش‌های محیطی از رشد کمتری برخوردار هستند، چرا که در حضور تنش‌ها مواد موجود را به افزایش سنتز ترکیبات ثانویه اختصاص می‌دهند تا بقای خود را در شرایط سخت محیطی تضمین نمایند (Rezai 2011; Rebey et al. 2012). در تحقیق حاضر با اعمال نانوذرات نقره میزان کاروون، پی-سایمن و کارواکرول و تیمول افزایش یافتند، در صورتی‌که عموماً در زیره سیاه تیمول و کارواکرول جز ترکیبات اصلی نبوده و۲۴ ساعت بعد از استفاده از محرک میزان آن‌ها افزایش یافته است که نشان از مصرف پیش ماده لیمونن جهت تولید کاروون و گاما-ترپینن جهت تولید پی-سایمن، کارواکرول و تیمول در ۲۴ ساعت بعد از استفاده از محرک و کاهش نسبی این پیش ماده‌ها در ۲۴ بعد از القاء محرک نسبت به نمونه شاهد می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی زنیان صورت گرفته است، نیز این موضوع را تائید می‌نمایند و نتایج مشابهی در قسمت شناسایی ترکیبات به‌دست آورده‌اند (Jamshidi et al. 2019). نتایج به دست آمده از تحقیقات گذشته (Moola et al. 2021; Ibralin et al. 2011; Simic et al. 2008; Laribi et al. 2013; Lasram et al. 2019) در زمینه افزایش یا کاهش میزان متابولیت‌ها بعد از تیمار با محرک‌های مختلف وجود دارد و نانوذرات به‌عنوان گروه جدیدی از محرک‌ها شناخته شده‌اند و علی الرغم تحقیقات کمی که در خصوص به‌کار بردن نانو ذرات در سوسپانسیون سلولی جهت افزایش یا کاهش متابولیت‌ها صورت گرفته است (Zaho et al. 2010; Lasram et al. 2019)، نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند تولید ROS را در سوسپانسیون سلولی بالا ببرند و بنابراین پاسخ گیاه فعال شدن تولید متابولیت‌ها است که درنهایت از طغیان اکسیداتیو جلوگیری به‌عمل می‌آورد (Ghazal et al. 2018; Ali et al. 2019). به‌طور کلی نتایج بررسی مقادیر متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر نانوذرات نقره بر گیاه زیره سیاه اروپایی نشان داد که این نانوذرات می‌توانند محرکی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه به خصوص پی-سایمن، تیمول، کارواکرول و کاروون باشد. به‌علاوه نتایج کاهش میزان لیمونن و گاما-ترپینن نشان می‌دهد که این هم پاسخی به اثر نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد می‌باشد و نقش کلیدی لیمونن و گاما-ترپینن را در تولید متابولیت‌های بسیار مهم در زیره سیاه نشان می‌دهد. از سوی دیگر نتایج نشان می‌دهد که غلظت ۵۰ mg/l نانوذرات باعث تولید متابولیت‌های زیادی از جمله ترنس- کاریوفیلن، جرانیل، نرال، کومین-آلدئید و ترنس-دی‌هیدروکاروون شده است در حالی‌که این متابولیت‌ها در گیاه شاهد وجود نداشتند و یا به میزان بسیار ناچیزی وجود داشتند، که این نتایج شبیه به گزارشی است که (Gazal et al. 2018) در بررسی نانوذرات در تولید متابولیت‌های ثانویه در *Stevia rebaudiana* اعلام کردند می‌باشد، که در نتایج نشان دادند که نانوذرات به‌صورت خیلی ساده می‌تواند روش بسیار مؤثری برای تولید بالای مواد دارویی در این گیاه بشود. از سوی دیگر گزارش کردند که میزان مؤثر و مناسب نانوذرات به گونه‌ها، سن گیاه، مرحله فیزیولوژیکی آن و نوع ریزنمونه بستگی دارد. از آن‌جایی که لیمونن و کاروون و گاما-ترپینن و پی-سایمن جز اصلی‌ترین ترکیبات گیاه دارویی زیره سیاه اروپایی است، هر عاملی که باعث افزایش تولید یا تغییر در میزان پیش‌سازهای آن شود که در نتیجه منجر به افزایش تولید مونوترپن‌ها شود، حائز اهمیت است و با توجه به اینکه تیمول و کارواکرول جز ترکیبات اصلی گیاه زیره سیاه نبوده و اعمال این محرک باعث تولید این ترکیبات در ادامه مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها شده و باعث شده که درصد قابل توجهی تیمول و کارواکرول در تیمارهای مختلف به‌دست آید و این دو ماده بسیار ارزشمند جز ترکیبات اصلی و با میزان بالا در زیره سیاه قرار گیرد و به نوعی این مسیر بیوسنتزی را فعال کند، نتایج بسیار مهم و ارزشمندی است.

در این تحقیق تغییرات نسبی بیان ژن لیمونن سنتاز با استفاده از نانوذرات نقره در محیط کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه نیز بررسی شد. برای این منظور تیمارهای با غلظت ۵۰ mg/l و ۱۰۰ در لیتر در روز بیست و سوم (فازنمایی) اعمال و نمونه‌برداری در سه بازه زمانی (صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت) انجام شد. براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از Real-Time PCR جهت بررسی اثر زمان و غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر بیان ژن

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

لیمونن سنتاز، نتایج نشان داد که میزان mRNA به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر زمان و غلظت مورد استفاده از این محرک قرار گرفته است و ۲۴ ساعت بعد از القاء محرک نانوذرات نقره میزان بیان ژن لیمونن سنتاز تغییرات قابل ملاحظه ای داشت، به‌طوری که در نمونه تیمار شده با هر دو غلظت mg/l ۵۰ و ۱۰۰ از محلول نانوذرات نقره بعد از ۲۴ ساعت افزایش بیان ژن مشاهده شد و بالاترین میزان بیان نسبی در نمونه با غلظت mg/l ۱۰۰ و ۲۴ ساعت بعد از تیمار با محرک دیده شد که البته این تیمار با تیماری که دارای غلظت mg/l ۵۰ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار با نانوذرات نقره بود، تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۸)، اما با نمونه شاهد و بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. همان‌طور که قبلاً اعلام شد یکی از مونوترپن‌های افزایش یافته، کاروون بود که در اثر القاء محرک میزان آن افزایش یافته بود. به‌نظر می‌رسد این افزایش در نتیجه افزایش بیان نسبی ژن لیمونن سنتاز و ساخته شدن و تجمع متابولیت ثانویه و ارزشمند لیمونن می‌باشد که پیش ماده ساخت کاروون می‌باشد و باعث تحریک این مسیر بیوسنتزی و افزایش تولید متابولیت کارون بعد از ۲۴ ساعت از القاء محرک شده است.



شکل ۸- نمودار بیان نسبی ژن لیمونن سنتاز در تیمارهای غلظت ۵۰ و ۱۰۰ mg/l و بازه زمانی ۲۴ و۴۸ ساعت بعد از القاء محرک در مقایسه به شاهد (Control)

نتایج کلی نشان می‌دهد که محرک استفاده شده بر روی مسیرهای بیوسنتزی تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه زیره سیاه مؤثر بوده است. از طرفی تفاوت در میزان تجمع متابولیت‌های ثانویه مختلف به عامل زمان و غلظت و برهم‌کنش آن‌ها مربوط می‌شود. میزان تولید متفاوت مونوترپن‌ها در این تیمارها را می‌توان با بیان مختلف ژن‌های مولد مونوترپن‌ها و بیان مختلف ناقل‌های مؤثر در ترشح مونوترپن‌ها مرتبط دانست. در مجموع باید گفت شبکه متابولیک، در گیاهان بسیار پیچیده است که نمی‌توان به راحتی و یا مستقیم آن را پیش بینی کرد. به‌عنوان مثال هرچند شاید به‌نظر برسد که تغییر در محصول واکنش بیان ژن‌هایی نظیر لیمونن سنتاز بتواند اثر به‌سزایی در تجمع مونوترپن‌ها داشته باشد اما باید توجه کرد که محصول این ژن به مسیرهای مختلف هدایت می‌شود که در نتیجه به راحتی نمی‌توان گفت که کدام متابولیت به‌طور حتم به مقدار بیشتری در سوسپانسیون تولید می‌شود. علاوه بر آن تعداد زیادی مسیر ناشناخته دیگر موجود می‌باشد که در آن هر یک از متابولیت‌ها مثلاً لیمونن در ترکیب با دیگر مولکول‌ها موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه‌ی دیگر می‌شود. نتایج تحقیق حاضر با توجه به نبود مشابهی از آن در زیره سیاه اروپایی نتایج بسیار خوبی را در زمینه افزایش متابولیت‌ها با استفاده از نانوذرات نشان می‌دهد و نتایج آن مطابق با تحقیقات مختلف در مورد افزایش عملکرد متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دیگر مانند *Caralluma tuberculata, Stevia rebaudiana, Momordica charantia and Helianthus annuus* با استفاده از نانوذرات می‌باشد که آن‌ها نیز تأثیر نانوذرات را در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه بسیار مؤثر دانستند (Gazal et al. 2018; Moola et al. 2021; Vannini et al. 2013; Batool et al. 2021; Chung et al. 2018; Ghannati and Bakhtarian 2014).

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباط افزایش تولید مونوترپن‌ها در اثر استفاده از محرک‌ها را به تجمع رونوشت‌های ژن مورد مطالعه در برخی موارد و تغییر در میزان متابولیت‌های تولیدی را به تغییر در میزان رونویسی مرتبط نمود ولی در مواردی دیگر نیز این ارتباط ممکن است قابل مشاهده نباشد، زیرا محرک و زمان و غلظت استفاده از آن می‌تواند اثرهای متفاوتی بر بیان ژن‌ها بگذارد و از این روی نمی‌توان به‌طور دقیق افزایش یا کاهش یک متابولیت خاص را به‌طور قطعی پیش‌بینی کرد.

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

منابع

Abbasi B, Saxena PK, Mureh SJ, Lin CZ (2007) Echinacea biotechnology: challenges and opportunities In Vitro cell. Dev, Biol-Plant 43:481-492.

Abd Elaleem KG, Modawi RS, Khalafalla MM (2009) Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in luber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal Biotech 8:2529-2534.

Agrahari P, Singh DK (2014) A review on the pharmacological aspects of *carum carvi*. Journal of Biology and Earth Sciences 4:1-13.

Ahmadi J, Mohammadi R, Garousi Gh, Hosseini R (2012) Optimization of Callus Induction and Cell Suspension in *Catharanthus roseus*. Journal of Agricultural Biotechnology 4:170-187.

Ali A, Mohammad S, Khan MA, Raja NI, Arif M, Kamil A, Mashwani ZR (2019) Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. Artificial cells Nanomedicine, and biotechnology 47:715-724.

Al-Snafi AE (2015) the Chemical Constituents and Pharmacological Effects of *Carum carvi* - A Review. Indian Journal of Pharmaceutical Science and Research 5:72-82.

Amanlou M, Fazeli MR, Arvin A, Amin HG, Farsam H (2004) Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja Khuzistanica*. Fitoterapia 75:768-770.

Amini F, Ganbarzade Z, Askary Mehrabasi M (2013) Optimization of Callus Production and Plant Regeneration in *Salsola arabuscula* pall. Journal of cell and Tissue 4:129-137 (In Farsi).

Anjum S, Abbasi BH, Hano C (2017) Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 129:73-87.

Atrashi M, Tavakoli-dinani E, Darzi MT, Hashemi J, Rozbeh SH, Masomi A (2011) The Effect of ultrasonic waves on Carvone in callus obtained from black cumin (*Bunium persicum Boiss*) tissue culture. Journal of Herbal Drugs 2:129-135.

Batool SU, Javed B, Zehra SS, Mashwani ZR, Raja NI, Khan T, Alhaithloul HAS, Alghanem SM, Al-Mushhin AAM, Hashem M, Alamri S (2021) Exogenous Applications of Bio-fabricated Silver Nanoparticles to Improve Biochemical, Antioxidant, Fatty Acid and Secondary Metabolite Contents of Sunflower. Nanomaterials 11:17-50.

Bouwmeester HJ, Gershnzon J, Konings MC, Croteau R (1988) Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. Plant Physiology 117:901-912.

Chung IM, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M (2018) Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter gourd. 3 Biotech 8:1-12.

Dong JZ and Dunstan N (2002) Molecular biology of somatic embryogenesis in conifers. Molecular Biology of Woody Plants 1:51-87.

Darvishi Zeidabadi D, Jalali Javaran M, Dehghani H, Rashidi Monfared R, Baghizadeh A (2015) Selection of suitable housekeeping genes for gene expression study in caraway (*Bunium persicum*). Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 7:50-58.

De Martino L, De Feo V, Fratianni F, Nazzaro F (2009) Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. Nat Prod Commu 4:1741-50.

Ebrahimi M, Farajpour M, Hadavand H, Bahmani K, Khodaiyan F (2012) Essential oil variation Amon give *Achillea millefolium* ssp. elbursensis collected from different ecological regions of Iran. Annals of Biological Research 3:3248-3253

Eddouks M, Lemhadri A, Michel JB (2004) Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. Journal Ethnopharmacol 94:143-148.

Erjaee H, Rajaian H, Najafi S (2015) The Effect of caraway (*Carum carvi* L.) on the blood antioxidant enzymes and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. Comp ClinPathol 24:1197-1203.

Fang R, Jiang CH, Wang XY, Zhang HM, Liu ZL, Zhou L, Du SS, Deng ZW (2010) Insecticidal activity of essential oil of Carum carvi fruits from China and its main components against two grain storage insects. Molecules 15:9391-9402.

Ghanati F and Bakhtiarian S (2014) Effect of methyl jasmonate and silver nanoparticles on production of secondary metabolites by *Calendula officinalis* L (*Asteraceae*). Tropical Journal of Pharmaceutical Research 13:1783-1789.

Ghazal B, Saif S, Farid K, Khan A, Rahman S, Reshma A… Rahman L (2018) Stimulation of secondary metabolites by copper and gold nanoparticles in submerge adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). IET Nano biotechnology 12:569-573.

Ghayoor Kazemi M, Ziaratnia SM, Rajabian M (2016) Evaluation of Cumin aldehyde Production as an Odorant via Co-culture of Black Zira (*Bunium persicum* Boiss.) and Caraway (*Carum carvi* L.) Cells. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology 5:197-210 (In Farsi).

Goers L, Freemont P, Polizzi KM (2014) Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. Journal of the Royal Society Interface 11:1-13.

Holopainen JK, Gershenzon J (2010) Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. Trends in plant Science 15:176-184.

Ibraliu A, Mi X, Elezi F (2011) Variation in essential oils to study the biodiversity in *Satureja montana* L. Journal of Medicinal Plants Research 5:2978-2989.

Jamshidi M, Sadat Nori SA, Mortazavian SMM (2019) Study the Quantitative Expression Pattern of Some Involved Genes on Monoterpenoid Biosynthesis Pathway and Identification of Essential Compounds Affected by

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

Methyl jasmonate in Ajowan Plant. Agricultural Biotechnology Journal 11:133-152 (In Farsi).
Khorasaninejad, S, Mousavi A, Soltanloo H (2011) The Effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). Journal Med Plant Res 5:5360-5365.
Kjonaas R, Croteau R (1983) Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other Mentha species. Archives of Biochemistry and Biophysics 220:79-89.
Kumar P, Singh DK (2006) Molluscicidal activity of *Ferula asafoetida*, *Syzygium aromaticum* and *Carum carvi* and their active components against the snail *Lymnaea acuminata*. Chemosphere 63:1568-1574.
Lacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F (2005) Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal Agric Food Chem 53:57-61.
Laribi B, Kouki K, Bettaieb T, Mougou A, Marzouk B (2013) Essential oils and fatty acids composition of Tunisian, German and Egyptian caraway (*Carum carvi* L.) seed ecotypes: A comparative study. Industrial Crops and Products 41:312-318.
Lasram S, Zemni H, Hamdi Z, Chenenaoui S, Houissa H, Tounsi MS, Ghorbel A (2019) Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against Aspergillus flavus. Industrial crops and products 134:11-18.
Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25:402-408
Mandal AK and Gupta SD (2001) Direct shoot oranganogenesis and plant regeneration in safflower. In Vitro Cell. Dev Bio-Plant 37:50-54.
Manjkhola S, Dhar U, Joshi M (2005) Organogenesis, embryogenesis, and synthetic seed production in Arnebia euchroma-A critically endangered medicinal plant of the Himalaya. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 41:244-248.
Meshkatal-sadata MH, Salahvarzib S (2012) Identification of essential oil constituents of caraway (*Carum Carvi*) using ultrasonic assist with headspace solid phase microextraction (UA-HS-SPME). Dig Nanometr Bios 7:637-640.
Moola AK, Kumar TS, Kumari BDR (2021) Enhancement of Celastrol compound by silver nanoparticles and acetosyringone in Celastrus paniculatus Willd. through adventitious and hairy root culture. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 31:429-434.
Muñoz-Bertomeu J, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2008) Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. Metabolic Engineering 10:166-177.
Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
Neibaur I, Gallo M, Altpeter F (2008) The Effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant inflorescence segments of seashore paspalum (*paspalum vaginatum* Swartz). In Vitro Cell Dev Bio-Plant 44:480-486.
Rani R, Khan MA, Kayani WK, Ullah S, Naeem I, Mirza B (2017) Metabolic signatures altered by in vitro temperature stress in Ajuga bracteosa Wall. Ex Benth. Acta Physiologiae Plantarum 39:97.
Rao GV, Annamalai T, Sharlene C, Mukhopadhyay T, Madhavi MSL (2011) Secondary metabolites and biological studies of seeds of *Carum Carvi* L. Journal Pharn Res 4:2126-2128.
Rebey B, Jabri-Karoui I, Hamroumi-Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B (2012) Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. Ind Crops Prod 36:238- 245.
Rezaei-Chiyaneh E (2011) Effects of different irrigation treatments on essential oil accumulation, its composition and some ecophysiological traits in Fennel *(Foeniculum vulgare)*. PhD thesis Department of Plant of Eco-physiological, Faculty of Agriculture,university of Tabriz 329-338 (In Farsi).
Roberts SC, Shuler ML (1997) Large-scale plant cell culture. Curr Opin Biotechnol 8:154-159.
Sachan AK, Das DR, Kumar M (2016) *Carum carvi* -An important medicinal plant. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 8:529-533.
Sasheva P, Letkarska G, Ionkova I (2013) Biotechnological production of podophyllotoxin and podophyllotoxin-related lignans in cultures of *Linum thracicum* Degen. Comptes Rendus de l'Academie bulgare des Sciences 66:1445-1450.
Shooshtari L, Omidi M, Qaderi A, Zare Karizi AR, Mehrafarin A (2018) Genomic and Phytochemical Assessment of Chavir (*Ferulago angulate*) under Different in vitro Conditions. Journal of Medicinal plant 17-2:176-190 (In Farsi).
Simic A, Ranci CA, Sokovi MD (2008) Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. Pharm Biol 46: 437-441.
Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell culture. Advances in Biochem Eng Biotech 111:187-228.
Stefaniak B, Wozny A, Li V (2003) Plant micropropagation and callus induction of some annual Salsola spccies. Biologia plantarum 46:305-308.
Toghroli M, Vatandoost J, Asadi MH (2016) Study of zinc effect on limonene synthase gene expression in cumin by Real Time PCR. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 24:190-198 (In Farsi).
Thomas TD, Maseena EA (2006) Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* L. an important medicinal plant. Scientia Horti 108:332-336.
Vannini C, Domingo G, Onelli E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, Bracale M (2013) Morphological and proteomic responses of Eruca sativa exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. PloS one 8:68752.

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

Von- Maydell D, Brandes J, Lehnert H, Junghanns W, Marthe F (2021) Breeding synthetic varieties in annual caraway: Observations on the outcrossing rate in a polycross using a high through put genotyping system. Euphytica 217:1-15.
Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105:940-949.
Zhao JL, Zhou LG, Wu JY (2010) Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in Salvia miltiorrhiza cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology 87:137-144.
Zheng G, Kenney PM, Lam LKT (1992) Anethofuran, carvone, and limonene: potential cancer chemo-preventi veagents from dill weed oil and caraway oil. Planta Med 58:338-341.

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