گیاه و زیست فناوری ایران
Iranian Journal of Plant & Biotechnology (IJPB)
واحد گرمسار

نوع مقاله: پژوهشی

تاثیر الیسیتورهای غیرزیستی بر تولید متابولیت کاروون در کشت سوسپانسیون زیره سیاه (*Bunium persicum Boiss*)

زهرا آقامیری[۱]، پریسا عبداللهی (نویسنده مسئول) [۲*] و محمود خسروشاهلی[۳]
۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، zahra.aghamiri2025@yahoo.com
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، abdollahi@srbiau.ac.ir
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، mkhosrowchahli@yahoo.com
تاریخ دریافت: اسفند ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۴

Effect of abiotic elicitors on Carvone metabolite production in cell suspension culture of Black Cumin (*Bunium persicum Boiss*)

Zahra aghamiri[1], Parisa Abdollahi (Corresponding author) [2*] and Mahmood khosrowshahli[3]
1- MS.c student, Department of plant breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, zahra.aghamiri2025@yahoo.com
2- Assistant professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, abdollahi@srbiau.ac.ir
3- Professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, mkhosrowchahli@yahoo.com
Received: March 2025 Accepted: May 2025

Abstract
Black cumin (*Bunium persicum Boiss*) is one of the most important and valuable medicinal plants native to Iran. The use of elicitors in cell suspension culture is an effective strategy for the production of secondary metabolites on *in vitro* condition. In this study, to break dormancy and stimulate germination, black cumin seeds were germinated on agar medium containing BAP at a concentration of 0.25 mg/L after 20 days. Then, explants of cotyledons, hypocotyls and roots of black cumin were placed on MS medium containing 2,4-D growth regulator at three concentrations of 1,2 and 4 mg/L for callus induction. The results showed that 1 mg/L of 2,4-D concentration had the best effect on dry weight, fresh weight and callus size. For carvone metabolite production, black cumin cell suspension culture was prepared using the obtained callus. The elicitors methyl jasmonate, nano titanium oxide and salicylic acid were used in two concentrations of 100 and 150 mg/L and were added to the suspension after 14 days and the cells were harvested 24 hours after the elicitor application. Results showed that Methyl jasmonate increased the amount of carvone to 2399.16 µg/mg of dry mass, which was significantly different from the control sample. Although the amount of carvone production in the treatment with salicylic acid and titanium oxide nanoparticle elicitors was less than its production by methyl jasmonate still was higher than the control and showed a significant difference. In general, the results indicated a positive effect of elicitors on the *in vitro* production of cumin plant.
Key words: In vitro culture, Methyl jasmonate, Salicylic acid, Secondary metabolite, Tio2 nano particle

Iranian Journal of Plant & Biotechnology
Spring 2025, Vol 20, No 1, Pp 1-12

چکیده
زیره سیاه، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی ارزشمند وبومی ایران است. کاربرد الیسیتورها در کشت سوسپانسیون سلولی راهکاری موثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای است. در این پژوهش با شکستن خواب و تحریک جوانه‌زنی بذرهای زیره سیاه روی محیط آگار حاوی بنزیل آمینو پورین ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر پس از گذشت ۲۰ روز شروع به جوانه‌زنی کرد. سپس ریزنمونه کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه برای القای کالوس در محیط کشت MS دارای تنظیم کننده رشد دی کلرو فنوکسی استیک اسید با سه غلظت ۱، ۲ و ٤ میلی‌گرم در لیتر قرارداده شد. نتایج نشان داد غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بهترین تاثیر را روی وزن خشک، وزن تر و اندازه کالوس داشت. برای تولید متابولیت کاروون کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه ایرانی با استفاده از کالوس‌های حاصل شده، تهیه شد. متیل جاسمونات، نانواکسید تیتانیوم و اسید سالسیلیک در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و پس از ١٤ روز به سوسپانسیون، اضافه و سلول‌ها ٢٤ ساعت پس از اعمال الیسیتور برداشت شد. نتایج نشان داد که متیل جاسمونات میزان کارون را تا ٢٣٩٩/١٦ میکروگرم در میلی‌گرم ماده خشک افزایش داد که اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد داشت. میزان تولید کاروون در تیمار با اسید سالسیلیک و نانو ذره اکسید تیتانیوم نیز نسبت به شاهد بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری نشان داد. بطورکلی نتایج حاکی از اثر مثبت الیسیتورها روی تولید درون شیشه‌ای گیاه زیره بود.
کلمات کلیدی: اسید سالسیلیک، کشت درون شیشه‌ای، متابولیت ثانویه، متیل جاسمونات، نانوذره Tio2

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران
بهار ١٤٠٤، دوره ٢٠، شماره ١، صص ١٢-١

مقدمه و کلیات

زیره سیاه پارسی با نام علمی *Bunium persicum Boiss* از تیره چتریان (*Apiacea*) است. زیستگاه طبیعی زیره سیاه در سطح جهان آسیای مرکزی، غربی، اروپای جنوب شرقی بوده و در ایران به‌صورت وحشی در نواحی مانند ارتفاعات البرز، خراسان و کرمان می روید (Nourihosseini and Zabihi, 2015). زیره سیاه ایرانی به علت خواب بذر و سختی جوانه زنی به میزان کمی در ایران کشت می شود و تولید اصلی آن مربوط به رویشگرهای طبیعی می باشد. بررسی فنولوژیکی زیره سیاه نیز نشان داده است که جوانه زنی بذر زیره در بهار پس از گذراندن دوره سرمایی صورت می‌گیرد. این گیاه به دلیل خواص دارویی و ادویه‌ای دارای ارزش اقتصادی بالایی بوده و در سال های اخیر، کشت زیره سیاه در نقاط مختلف کشور به‌صورت زراعی رواج پیدا کرده است (Zabihi and Nourihoseini, 2019). اسانس زبره سیاه شامل مواد موثره بسیاری است که در صنایع دارویی و غذایی کاربرد فراوان دارد. کاروون نوعی هیدروکربن مونوترپنی و عضوی از خانواده ترکیبات بیوشیمیایی ترپنوئیدها است که از مهمترین اجزای اسانس ها یا روغن های معطر گیاهی بوده و به طور طبیعی در بسیاری اسانس ها از جمله میوه و اندام هوایی زیره، نعناع، شوید و میوه مرکبات یافت می شود. بیشترین میزان آن در بذور زیره و شوید است (De Carvalhoand *et al*., 2006). گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند که پراکنش محدودی در سلسله گیاهان دارند و میزان آن‌ها اغلب کمتر از یک درصد وزن خشک است. این ترکیبات معمولا دارای وزن مولکولی کمتر از ۱۵۰ کیلودالتون هستند و تاکنون بیش از صد هزار متابولیت ثانویه شناسایی شده‌اند. متابولیت‌های ثانویه منحصر به گونه یا حتی نژاد هستند و اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان هستند. در گیاهان دارویی این متابولیت ها بعنوان ترکیبات مفید و جهت مصارف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Wink, 2010). تولید این ترکیبات همواره تحت تاثیر عوامل مختلف چون سطح پایین تولید، غیر یکنواختی کیفیت و تامین مواد اولیه مواجه می‌شود. تولید گیاهان دارای ترکیبات ثانویه به شکل زراعی به دلیل شرایط اقلیمی محدود است و ایجاد صنایع پایدارتر برای تولید این مواد ضروری به نظر می رشد (Omidi and Abdollahi, 2015). کشت سلول، بافت و اندام گیاهی امکان تولید سریع و انبوه ژنوتیپ های مطلوب با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت، در زمان کوتاه تر و فضای محدود را فراهم می سازد. امروزه تعداد زیادی از گیاهان دارویی از طریق ریزازدیادی قابل تکثیر هستند. راهکارهای مختلفی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی استفاده می‌شود که شامل استفاده از الیسیتورها، افزودن پیش سازها، بهینه سازی محیط کشت، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت می‌باشد (Omidi and Abdollahi, 2015). الیسیتورها مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی و تجمع فیتوالکسین را القا کنند (Zhao *et al*., 2005). الیسیتور به مولکول‌هایی با منشأ زیستی

یا غیرزیستی اطلاق می‌شود که با تحریک سیگنال‌های سلولی، و برهمکنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی یا سیتوپلاسمی و الیسیتور موجب شناسایی آن‌ها می‌شوند. در نتیجه سیگنال در یافتی توسط سلول‌های گیاهی بیان ژن‌های مرتبط در مسیر را تحریک می‌کنند و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یا کشت سلولی آن‌ها می‌شوند (Zhao *et al*., 2003). الیسیتور متیل جاسمونات و اسید سالسیلیک از الیسیتورهای غیرزیستی موثر در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه هستند و اثر مثبت آنها روی تولید متابولیت‌های ثانویه ارشمند در گیاهان دارویی از جمله تریگونلین در شنبلیله (Aghili*et al.*, 2021)، تولید اسید کلروژنیک در آنغوزه (Razavi *et al*.,2023)، لیمونن در به لیمو (Daneshmanpour *et al*., 2022)، تبائین و سنگوئینارین در خشخاش (Dastmalchi *et al*., 2019) گزارش شده است. نانوذرات به علت داشتن ویژگی‌های انحصاری بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی، ورود گسترده‌ای به دنیای بیولوژی و کشاورزی داشته اند (Oberdorster *et al*., 2005). تحقیقات حکایت از گزارش هایی در مورد اثرات مثبت گیاهان به نانوذره اکسید تیتانیوم (Tio2) یکی از عناصر مفید برای گیاه است و می تواند باعث جذب عناصری مانند نیتروژن، فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی شود که این امر به برخی خصوصیات بیولوژیک و خاک مثل گونه و رقم گیاه، pH، رطوبت و وضعیت عناصر غذایی در خاک بستگی دارد. نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم با افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن اثر گذاشته و منجر به افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شود. همچنین به دلیل اندازه کوچک آنها به سرعت وارد سلول شده و منجر به افزایش میزان پروتئین و تحریک بیان ژن در سلول های گیاهی می شود (Young *et al*., 2008, Klancnik *et al*., 2011). این پژوهش به منظور شناسایی بهترین غلظت تنظیم کننده های رشد 2,4-D جهت القای کالوس و تهیه سوسپانسیون سلولی گیاه زیره سیاه و همچنین بررسی اثر الیسیتورهای مختلف غیرزیستی بر افزایش تولید کاروون در شرایط درون شیشه ای انجام شده است.

فرآیند پژوهش

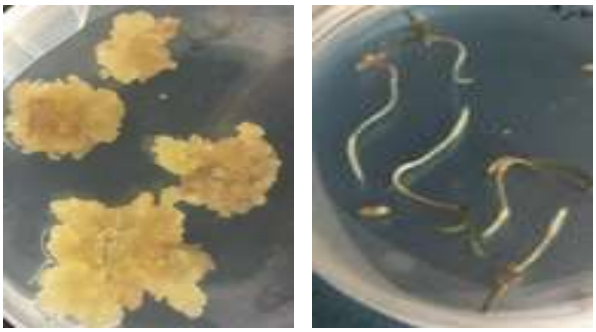
بذر زیره سیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. به‌منظور ضدعفونی سطحی، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه با آب روان و با چندقطره مایع ظرفشویی شستشو داده شده و پس از آن در محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرارگرفت. در ادامه زیر هود لامینار سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. در مرحله بعد بذرها در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه تیمار شد و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل جهت جوانه زنی به محیط کشت منتقل شدند. با توجه به جوانه زنی سخت زیره سیاه تیمارهای مختلفی برای شروع جوانه‌زنی بذر زیره آزمایش شد. درنهایت بذرهای زیره در محیط کشت آگار ۱ درصد حاوی تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین با غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر پس از گذشت ۲۰ روز شروع به جوانه زنی کرده و با ظهور جوانه‌ها به محیط کشت MS 1/2 برای رشد گیاهچه منتقل شد. به‌منظور القای کالوس محیط کشت MS محتوی تنظیم کننده رشد دی

کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) در سه سطح (۱، ۲ و٤ میلی گرم در لیتر) تهیه شد. سه ریز نمونه هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه برای تولید کالوس در محیط کشت قرارگرفتند. پس از گذشت یکماه صفات مربوط به کالوس شامل اندازه، وزن تر و وزن خشک ثبت شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. با توجه به نتایج آنالیز تجزیه واریانس 2,4-D با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر که بهترین کالوس را از نظر اندازه و وزن کالوس تولید کرد، به‌عنوان بهترین تیمار انتخاب شد و در مرحله بعد برای تهیه محیط کشت سوسپانسیون استفاده گردید. محیط کشت سوسپانسیون شامل محیط MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و بدون آگار تهیه شد. محیط کشت سوسپانسیون تهیه شده در ارلن‌های استریل زیر هود لامینار در حجم ۲۵ میلی‌لیتر توزیع شد. کالوس‌های انتخابی در شرایط کاملاً استریل با اسکالپل به قطعات ۰/۵ سانتی متری برش خورده و سلول ها حتی الامکان از هم جدا شده، به محیط کشت سوسپانسیون منتقل شدند و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با ۱۱۰ دور در دقیقه قرارداده شده تا سلول ها به طور کامل از هم جدا شده و رشد کنند. پس از گذشت ١٤ روز واکشت سوسپانسیون انجام شد به این ترتیب که کشت سوسپانسیون به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت تازه اضافه شد و به مدت ١٤ روز دیگر داخل انکوباتور شیکردار و در محیط کاملاً تاریکی قرارگرفت. در پژوهش حاضر از سه الیسیتور غیرزیستی شامل متیل جاسمونات، اسید سالسیلیک و نانوذره تیتانیوم هر کدام در دو سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و در سه تکرار استفاده شد. الیسیتورها ١٤ روز پس از واکشت سوسپانسیون و زمانی که سلول در فاز نمایی بود (Razavi *et al*., 2024) به نمونه ها اضافه شد. در نمونه شاهد به جای الیسیتور آب مقطر استریل اضافه شد. پس از افزودن الیسیتورها، سوسپانسیون سلولی مجددا در انکوباتور شیکردار با دمای ٢٤ درجه سلسیوس و ۱۱۰ دور در دقیقه در شرایط کاملاً تاریکی قرارگرفت. سلول ها ٢٤ ساعت پس از اعمال الیسیتور جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان عصاره گیری نگه‌داری شدند. برای تهیه عصاره متانولی به سلول ها الکل ۸۰ درصد به مقدار ۵ میلی لیتر به‌عنوان حلال اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دستگاه التراسونیک قرارگرفتند. سپس مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و عصاره متانولی جدا شده و دوباره با کاغذ صافی واتمن ۱ صاف گردید. بدین ترتیب عصاره متانولی از بقایای سلول جدا شد. عصاره‌های متانولی تا زمان آزمایش و تجزیه و آنالیز آن‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. جهت بررسی اثر الیسیتورهای مختلف بر مقدار متابولیت ثانویه کاروون (Carvone) در کشت سلولی زیره سیاه از دستگاه HPLC استفاده شد. دستگاه HPLC مدل Unicam-200 ساخت انگلستان دارای ستون C25 و قطر داخلی ٤۵ میلی متر و قطر ذرات ۰/۲ میکرومتر از جنس استات سلولز استفاده شد. دتکتور دستگاه از نوع ماوراء بنفش در طول موج ٢۵٤ نانومتر و فاز متحرک آب با حرارت ۲۱ درجه و با سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. برای رسم نمودار کالیبراسیون از سه غلظت متفاوت ماده استاندارد کاروون (۷۵۰،۵۰۰،۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) شرکت

Merck استفاده شد. در بازه زمانی ۱۰ دقیقه اولین پیک استاندارد مشاهده شد. سپس عصاره‌های استخراجی به ترتیب به دستگاه تزریق شد و پیک‌ها با پیک استاندارد مقایسه شد. براساس زمان بازداری و سطح زیر منحنی، مقدار کاروون مجهول مشخص شد. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SAS (V 9.1) و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نمودارها نیز در محیط Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

مناسب ترین تیمار برای جوانه زنی بذر زیره سیاه محیط کشت حاوی آگار ۱ درصد و تنظیم کننده رشد گیاهی BAP با غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر بود. سیتوکینین‌ها با تحریک سنتز DNA و RNA در دانه‌ها، رشد و تقسیم سلولی جنین را تسهیل نموده و به جوانه‌زنی کمک می‌کنند و یا با افزایش آلفاآمیلاز و هیدرولیز نشاسته و با افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپالاسمی و درنتیجه انتقال سریعتر مواد روی جوانه زنی اثرگذارهستند (Li, 2000). سیتوکنین ها در دیگر گیاهان با جوانه‌زنی سخت مانند کرفس زراعی و کوهی با افزایش فعالیت جیبرلین منجر به تسریع شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی شده‌اند (Tabatabaeian Biddington and Thomas, 1978 and Kadkhodaie, 2019;). ریز نمونه کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه از گیاهچه های زیره تهیه شد و به محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد 2,4-D برای تولید کالوس منتقل شد. ده روز پس از کشت، تشکیل کالوس در ریزنمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۱).

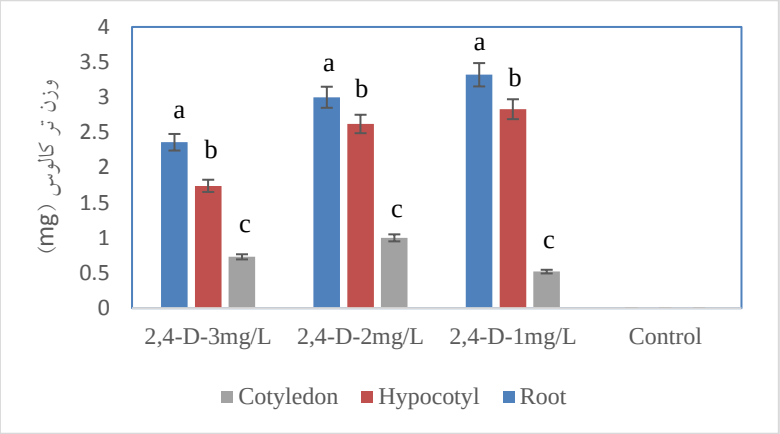


شکل ۱- گیاهچه‌های زیره سبز(سمت راست)، کالوس به‌دست آمده از ریزنمونه هیپوکوتیل زیره سبز در محیط MS+2,4-D 1mg/L(سمت چپ)

Fig 1- Black cumin seedlings (On right) and callus of hypocotyl explants of Black cumin on MS medium containing 1mg/L 2,4-D (On left)

آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار، ریزنمونه و همچنین اثرمتقابل ریز نمونه در تیماربرای سه صفت وزن تر، وزن خشک و اندازه کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین برای اثر متقابل ریز نمونه در تیمار انجام شد. بیشترین وزن تر کالوس در محیط کشت MS حاوی 2,4-D با غلظت ۱ میلی گرم برلیتر به برای ریز نمونه ی هیپوکوتیل ۳/۳۲ میلی گرم به دست آمد. ریز نمونه ریشه با ۲/۸۳ میلی گرم اختلاف معنی داری با ریزنمونه هیپوکوتیل نشان نداد. به طور کلی ریزنمونه ریشه بهترین پاسخ دهی را برای تولید کالوس نشان داد و در تمام غلظت های 2,4-D بیشترین وزن تر کالوس را داشت. مشابه با میزان

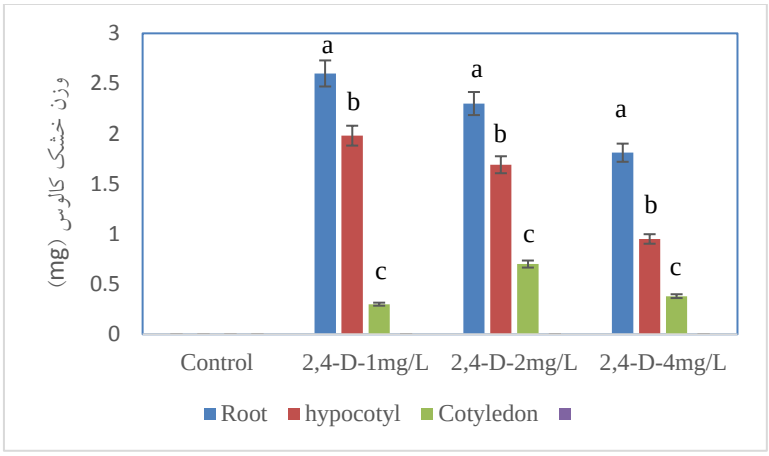
وزن تر کالوس، بیشترین وزن خشک نیز تحت تیمار ۱ میلی گرم 2,4-D و در ریز نمونه ریشه به میزان ۱/۹۸ میلی گرم به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل ریزنمونه در تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D برای وزن تر کالوس در محیط کشت MS در زیره سیاه

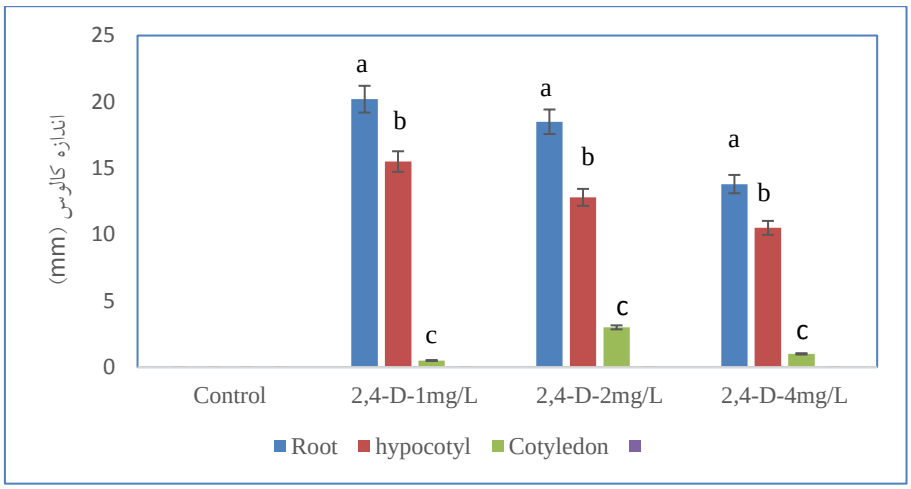
Fig 2- Interaction effect of explant and 2,4-D plant growth regulator on callus fresh weight on MS medium in *Bunium persicum Boiss*

در تیمار با ۱ میلی‌گرم 2,4-D بیشترین اندازه کالوس در ریزنمونه ریشه با ۲۰/۲ میلی متر به دست آمد. به طور کلی غلظت کمتر اکسین 2,4-D اثر بهتری بر صفات مرتبط با کالوس زیره سیاه نشان داد. اما ریز نمونه ریشه در تمامی غلظت‌های آزمایش شده پاسخ‌دهی بهتری داشت (شکل ۳).



شکل ۳- اثر متقابل ریزنمونه در تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D برای وزن خشک کالوس در محیط کشت MS در زیره سیاه

Fig 3- Interaction effect of explant and 2,4-D plant growth regulator on callus dry weight on MS medium in *Bunium persicum Boiss*



شکل ٤- اثر متقابل ریزنمونه در تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D برای صفت اندازه کالوس در محیط کشت MS در زیره سیاه

Fig 4- Interaction effect of explant and 2,4-D plant growth regulator on callus size on MS medium in *Bunium persicum Boiss*

مشابه با نتایج حاضر در پژوهش‌های دیگر نیز به اثبات رسیده که غلظت‌های پایین تنظیم کننده رشد 2,4-D تاثیر بیشتری بر وزن تر و خشک کالوس نسبت به غلظت های بالا داشته است (Park *et al*., 2001; Arafeh *et al* 2006; Pola *et al*., 2009; Rostampur *et al*., 2010). غلظت‌های بالای تنظیم کننده رشد گیاهی2.4-D ممکن است برای بیان ژن های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهارکننده باشد (Mahmood *et al*., 2012). در فاز نمایی کشت سوسپانسیون سلولی زیره پس از ١٤ روز زمانی که سلول در فاز نمایی رشد بود (Razavipour *et al*., 2023) با الیسیتورها تیمارشد. اثر الیسیتورهای متیل جاسمونات، اسید سالسیلیک و نانوتیتانیوم بر میزان تغییرکاروون پس از گذشت ٢٤ ساعت و هرکدام در دو غلظت به تنهایی مورد بررسی قرارگرفتند. در بین الیسیتورهای استفاده شده متیل جاسمونات با غلظت ١٠٠ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان کاروون را در شرایط درون شیشه ای در مقایسه با شاهد تولید کرد که برابر با ٢٣٩٩/١٦ میکروگرم در میلی گرم ماده خشک بود. این الیسیتور با غلظت ١٥٠ میلی گرم در لیتر نیز تاثیر مثبتی بر تولید کاروون داشت و میزان ١٨٤٢/٤٢ میکروگرم در میلی‌گرم ماده خشک از این متابولیت تولید شد (شکل ٤). روش‌های مختلفی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول گیاهی پیشنهاد شده اند که افزودن الیستورهای با منشا زیستی و غیرزیستی از جمله روش های پر کاربرد است (Aghili *et al*., 2021). الیسیتورها مولکول های با منبع خارجی در گیاهان هستند که از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانوی می‌شوند. مشخص شده است که اضافه کردن اسید جاسمونیک و مشتقات آن مانند متیل جاسمونات به کشت سلول‌های گیاهی و یا گیاهان کامل موجب تحریک مقدار زیادی از متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Kuzma *et al*., 2009). به نظر می‌رسد که اسید جاسمونیک طویل شدن و تقسیم سلولی را به همراه مواد دیگری از قبیل اکسین

تنظیم کند و با افزایش میزان تقسیم سلولی سبب افزایش رشد طولی گیاه شده (Kheiry *et al*., 2017) و با تحریک تقسیم سلول‌ها و افزایش فعالیت متابولیسم باعث افزایش وزن سلول می‌شود (See *et al*., 2011). جاسمونات ها به‌عنوان ترکیبات پیام رسان کلیدی در فرآیند القاء که منجر به تجمع متابولیت های ثانویه می شود معرفی شده‌اند. یک مسیر بیوسنتزی برای تولید هورمون گیاهی اسید جاسمونیک مسیر اکتادکانوئید (octadecanoid pathway) است که نقش مهمی در القای ژن های دخیل در واکنش‌های دفاعی و تولید پروتئین‌های دفاعی و متابولیت‌های ثانویه دارد. اسید جاسمونیک از آلفا لینولنیک اسید ساخته می‌شود که به کمک یک آنزیم لیپاز از غشای سلولی آزاد می شود. در پاسخ به زخم شدن گیاه فسفولیپاز C، لینولنیک اسید برای ساخت اسید جاسمونیک آزاد می‌کند. اسید جاسمونیک مولکول سیگنال دهنده تنش است. در متابولیسم آلکالوئید، اسید جاسمونیک بر بیان ژن های مسیر بیوسنتزی به وسیله فاکتور رونویسی ORCA(octadecanoid-responsive Catharanthus AP2-domain proteins) اثر می گذارد(Cheong and Choi, 2003). پس از الیسیتور متیل جاسمونات، کاربرد نانوذره تیتانیوم با غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر منجر به تولید ۱٤٥٦/٥٧ میکروگرم در میلی گرم ماده خشک شد. که اختلاف معنا داری با گروه شاهد نشان داد. تاثیر مثبت نانوذره تیتانیوم در رشد و نمو گیاهان اثبات شده است (Sheikhalipour *et al*., 2022) این ماده سبب تحریک فرآیندهای کلیدی همچون سامانه آنتی اکسیدان و حذف رادیکال های آزاد می‌شود و از این طریق انرژی و ماده لازم برای بیوستتنز متابولیت‌های ثانویه را حفظ می‌کند (Hong *et al*., 2005). مطابق با نتایج پژوهش حاضر نانوذره دی اکسید تیتانیوم توانسته اثر معنی داری روی ترکیبات فنلی و فلانوئیدی (Parsa *et al*., 2021) و بیان ژن های دخیل در مسیر بیوسنتزی ایندول آلکالوئیدها داشته است (Abyari, 2023). کاربرد نانوذرات فلزی از جمله راهکارهای موثر در افزایش ترکیبات فیتوشیمیایی از طریق دستکاری بیان ژن های مسیر بیوسنتزی آنهاست. لیمونن سنتاز آنزیم بسیار مهمی در مسیر بیوسنتزی متابولیت های مونوترپن از جمله کاروون است که گزارش شده است نانوذرات نقره ژن‌های ذخیل در مسیر بیوسنتزی این آنزیم را تحت تاثیر قرارداده اند(Muñoz-Bertomeu et al,2008). نانو الیسیتور نقره با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میزان تولید کاروون در شرایط درون شیشه‌ای را افزایش داده است (Dehghani *et al*., 2012). یکی دیگر از الیسیتورهای استفاده شده برای افزایش میزان کاروون در شرایط درون شیشه‌ای در این پژوهش اسید سالسیلیک است. اگر چه نسبت به متیل جاسمونات و نانوذره تیتانیوم میزان کاروون کمتری تولید کرد، اما این میزان با نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و می‌توان اسید سالسیلیک را نیز به‌عنوان الیسیتوری موثر پیشنهاد داد (جدول ۱). گزارش‌های متعدی مبنی بر تاثیر مثبت اسید سالسیلیک بر تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. اسید سالسیلیک یک ترکیب فنلی و شبه هورمونی است که در گیاهان در پاسخ به عوامل محیطی به عنوان مولکول سیگنال دهنده عمل کرده و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را القا کرده و باعث افزایش تولید آنها می‌شود. (Habibi

et al., 2015). اسید سالسیلیک از طریق تاثیر بر بیان ژن های *EMOT* (o–متیل ترانسفراز) و PAL (فنیل آلانین آمونیالیاز) که کد کننده آنزیم‌های حد واسط در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه هستند در افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در خانواده نعناییان موثر بوده است (Joneidi *et al*. 2019; Ali *et al*. 2007). براساس نتایج به‌دست آماده به کارگیری الیسیتورها می‌تواند افزایش تولید متابولیت‌های با ارزش را به طور چشمگیری در پی داشته باشد. تولید این ترکیبات همواره تحت تاثیر عوامل مختلف چون سطح پایین تولید، غیریکنواختی کیفیت و تامین مواد اولیه مواجه می‌شود. تولید گیاهان دارای ترکیبات ثانویه به شکل زراعی به دلیل شرایط اقلیمی محدود است و ایجاد صنایع پایدار تر برای تولید این مواد ضروری به نظر می‌رسد (Omidi and Abdollahi, 2015).

جدول ۱- میزان کاروون استخراجی از کشت سوسپانسیون سلولی زیره سیاه تحت تأثیر الیسیتورهای غیرزیستی

Table1- Extracted Carvone amount from cell suspension culture of *Bunium persicum Boiss* under abiotic elicitors

الیسیتور	میزان کاروون در کشت سوسپانسیون زیره سیاه (µ/mg)
شاهد	۱۲/۱۵ ± ۰/۰۱ g
متیل جاسمونات ۱۰۰ میلی گرم در لیتر	۲۳۹۹/۱٦± ۰/۰۱a
متیل جاسمونات ۱۵۰ میلی گرم در لیتر	۱۸٤۹/٤۲ ± ۰/۰۸ b
اسید سالیسیلیک ۱۰۰ میلی گرم در لیتر	٤۳۸/۲۸ ± ۰/۰۳ e
اسید سالیسیلیک ۱۵۰ میلی گرم در لیتر	٤۱۳/۲۷ ± ۰/۰۲ f
نانو ذره Tio2 –۱۰۰ میلی گرم در لیتر	۱۱۵۸/۳۵ ± ۰/۰۵ d
نانو ذره Tio2 –۱۵۰ میلی گرم در لیتر	۱٤۵٦/۵۷ ± ۰/۰۱ c

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش با هدف افزایش تولید متابولیت کاروون در شرایط درون شیشه ای با کمک سوسپانسیون سلولی حاصل از کالوس گیاه زیره سیاه انجام شد. تنظیم کننده رشد 2,4-D برای القای کالوس استفاده شد که طبق نتایج به‌دست آمده غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D روی ریزنمونه ریشه بیشترین وزن ترو خشک و اندازه کالوس را تولید کرد. کالوس حاصل برای تهیه سوسپانسیون سلولی استفاده شد. برای تحریک تولید متابولیت ثانویه کاروون سه الیسیتور غیرزیستی متیل جاسمونات، نانو ذره اکسید تیتانیوم (Tio2) و اسید سالسیلیک بعد از ۱٤ روز به سوسپانسیون سلولی زیره سیاه اضافه شد. میزان تولید متابولیت کاروون با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد که بیشترین میزان کاروون با غلظت ۲۳۹۹/۱٦ میکروگرم در میلی‌گرم ماده خشک تخت تیمار متیل جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. اگرچه سایر الیستورهای استفاده شده میزان کاروون کمتری

نسبت به متیل جاسمونات تولید کردند، اما همچنان تولید کاروون را در مقایسه با نمونه شاهد افزایش دادند.

منابع

1) Abyari, M. 2023. The effect of titanium oxide nanoparticles on the gene expression involved in the secondary metabolite production of the medicinal plant periwinkle (Catharanthus roseus). *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(2): 83-100.
2) Ali, M.B., Hahn, EJ. and K.Y, Paek. 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in Panax ginseng bioreactor root suspension cultures.*Molecules*, 12 (3), 607-621.
3) Arafeh, R.M., Shibli, R.A., Al-Mahmoud, M. and M.A, Shatnawi. 2006. Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in Persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and Arabian oregano (*O. syriacum* L.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 2(3): 274-28.
4) Biddington, N.L. and T.H, Thomas. 1978. Thermo dormancy in celery seed and its removal by cytokinins and gibberllins *Physiologia Plantarum*. 42:401-405.
5) Cheong, J. and Y. Choi. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics*, 19 (7): 409-13.
6) Daneshmandpour, F., Abdollahi, P. and M, Omidi. 2022. Effect of plant growth regulators on callus induction and elicitor application for limonene production in cell culture of lemon grass (*Lippia citrodora*). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 52(4): 889-898.
7) Dastmalchi, T., Omidi, M., Azizinezhad, R., Rezazadeh, S. and A, Etminan. 2019. Effects of methyl jasmonate and phloroglucinol on thebaine and sanguinarine production in cell suspension culture of Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.). *Cellular and Molecular Biology*, 65(3): 11–17.
8) DeCarvalho, C.R. and M, Da Fonseca. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*, 95: 413-422.
9) Dehghani-Aghchekohal, Z., Omidi, M., Azizinezhad, R. and A.R, Etminan. 2023. The effects of Silver Nanoparticles on the expression pattern of Limonene Synthase gene in Cell culture in Carum carvi L., *Journal of Genetics*, 18(1): 33-47
10) Habibi, G., Sadeghipour, Z. and R, Hajiboland. 2015. Effect of salicylic acid on tobacco (*Nicotiana rustica*) plant under drought conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 7(25): 17-28.
11) Hong, F., Zhou, J., Liu. C., Yang. F., Wu. C., Zheng, L. and P, Yang. 2005. Effects of Nano TiO2 on photochemical reaction of chloroplasts of Spinach. *Biological Trace Element Research*, (105): 269-279.
12) Joneidi, F., Abdollahi, P. and M, Omidi. 2019. The effect of abiotic Elicitors on expression of *EMOT* gene in Basil plant. *3rd International and 11th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran*, 1-3 Sep. Tehran, Iran.
13) Kheiry, A.,Tori, H. and N, Mortazavi. 2017. Effects of drought stress and jasmonic acid elicitors on morphological and phytochemical characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(2): 268-280
14) Klančnik., K.D. Drobne, J., Valant, J. and K, Dolenc. 2011. Use of a modified Allium test with nanoTiO2. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (1): 85-92.
15) Kuzma, L., Kalemba, D., Rózalski, M., Rózalska, B., Wieckowska-Szakiel, M., Krajewska, U. and H, Wysokińska. 2009. Chemical composition and biological activities of essential oil from

Salvia sclarea plants regenerated in vitro. *Molecules*, 2:14(4): 1438-47.

16) Li, M. 2000. Leung starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyls cutting of Pinus radiate. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19:423 428.

17) Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z., Hafiz, I.A. and S, Kaleem. 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. *Pakistan Journal of Botany*, 44(1): 277-284.

18) Nourihoseini, M. and H, Zabihi. 2015. Optimed Management of Fertilizer Recommendation in Black Cumin (*Bunium persicum* L.) Cultivated Lands. *Land Management Journal*, 3(1): 49-60.

19) Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K. and S, Olin .2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2(1): 8.

20) Omidi, M. and P, Abdollahi. 2015. Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. *Modern Genetic Journal*, 9: 391-402.

21) Park, H. J., Lee, H. R., Pyee, J. and H.C, Cha. 2001. Regeneration of grape (*Vitis* l*abruscana* cv. Kyoho) by shoot-tip culture. *Journal of Plant Biology*, 44(4): 185-192.

22) Parsa ghrabaei, M., Abdollahi, P. and M, Khosrowshahli. 2021. Effect of nano Tio2 elicitor on phenolic and flavonoid compounds of *Crataegus Oxyacantha* on *In vitro* condition. 12th National and 4th International Biotechnology congress of Islamic Republic of Iran. Iran.Tehran.

23) Pola, S., Mani, N.S. and T, Ramana. 2009. Long-term maintenance of callus cultures from immature embryo of Sorghum bicolor. *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(4): 415-421.

24) Razavipour F., Abdollahi, P. Omidi, M. and R, Azizinezhad. 2023. Timing optimization of elicitor addition to cell suspension culture of *Ferula assa-foetida* L according to the cell growth phase. 13th Iranian Horticulture Science Congress. Iran. Gorgan.

25) Rostampour, S., Sohi, H. and A, Dehestani. 2010. In vitro regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). *Biologia*, 65(4): 647-652.

26) Sheikhalipour, M., Gohari, G. and B, Esmaielpour. 2022. Melatonin and TiO2 NPs application induced changes in growth, photosynthesis, antioxidant enzymes activities and secondary metabolites in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress conditions. *Plant Growth Regulation*, 42: 2023-2040

27) See, K.S., Bhatt, A. and C.L, Keng. 2011. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of Melastoma malabathricum (Melastomaceae). *Revista De Biologia Tropical*, 59(2): 597–606.

28) Tabatabaeian, J. and A, Kadkhodaie. 2019. The effect of dormancy breaking treatments on seed germination of Kelussia odoratissima Mozaff (kohrang), *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 8(1): 201-212.

29) Young Choa, H., Young Sona, S., Soon Rheea, H., Sung-Yong, H., Carolyn, W.T. and A, Lee-Parsonsc.2008. Synergistic effects of sequential treatment with methyl jasmonate, salicylic acid and yeast extract on benzophenanthridine alkaloid accumulation and proteinexpression in Eschscholtzia californica suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 135: 117–122.

30) Zhao, J. and K, Sakai. 2003. Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced β-thujaplicin biosynthesis in Cupressus lusitanica cell cultures. *Journal of Experimental Botany*, 54(383): 647-656.

31) Zhao, J., Davis, L.C. and R, Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary

metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4): 283-333

32) Wink, M. 2010. Annual plant reviews, functions and biotechnology of plant secondary metabolites. John Wiley & Sons, 39-1

33) Zabihi, H.R. and M, Nourihoseini.2019. Effect of nitrogen and potassium on yield, yield components and essential oil of black caraway (*Bunium persicum* L.). *Research in Ecology*, 1(1): 10-14.