

بهینه‌سازی کالوس زایی و تاثیر الیستورهای زیستی و غیر زیستی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی سیاهدانه در شرایط آزمایشگاهی

علی سبحانی زاد ^۱، M.Sc.، محمود سلوکی ^۲، Ph.D.، بهمن فاضلی نسب ^{۳*} Ph.D.

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، زابل، ایران

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

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Bfazeli@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

چکیده

هدف: هدف از تحقیق، بهینه‌سازی کالوس‌زایی و بررسی اثر الیستورهای عصاره مخمر و نانو نقره بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه دارویی سیاهدانه تحت شرایط کشت بافت است.

مواد و روش‌ها: آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای کالوس‌زایی: ریزنمونه (ریشه، هیپوکوتیلدون، برگ و کوتیلدون) و تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (۱، ۲، ۴ و ۸ میلی‌گرم در لیتر) به همراه BAP (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت پایه MS و همچنین در بررسی اعمال الیستور؛ عصاره مخمر (۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و نانو نقره (۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر) در دو بازه زمان ۳ و ۷ روزه بودند.

نتایج: نتایج نشان داد ریزنمونه هیپوکوتیلدون و اثر متقابل BAP (۰/۲۵mg/l) و 2,4-D (۴mg/l) مؤثرترین بر درصد کالوس‌زایی بودند. باززایی مستقیم حاصل از اثر متقابل BAP (۰/۵mg/l)، 2,4-D (۱mg/l) و ریزنمونه ریشه بود. مؤثرترین تیمار بر میزان فنل کل، اثر تکی تیمار عصاره مخمر (۲۵۰ ppm) در بازه زمان ۷ روزه بود. HPLC برای کوئرستین (یکی از اجزای فلاونوئید) نشان داد که مؤثرترین تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی‌گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم) در بازه زمانی ۳ روزه بوده است.

نتیجه‌گیری: بیشترین میزان کالوس‌زایی از ریزنمونه هیپوکوتیلدون و بهترین باززایی مستقیم از ریزنمونه ریشه و جهت افزایش فنل کل بایستی صرفاً از عصاره مخمر آن هم در بازه زمانی ۷ روزه و افزایش میزان فلاونوئید از اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی‌گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم) در بازه زمانی ۳ روزه استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سیاهدانه، عصاره مخمر، کشت بافت، متابولیت‌های ثانویه، نانو نقره

مقدمه

سیاهدانه (*Nigella sativa*)، دارای (2n=12) کروموزوم، یک‌ساله، از خانواده آلاله (*Ranunculaceae*)، برای درمان بیماری‌هایی مثل آسم، فشار خون، دیابت، التهاب، سرفه، تب، سردرد، اگزما، سرگیجه و آنفولانزا نیز مصرف و حتی به‌عنوان افزودنی غذایی نیز مفید است (۱) همچنین اثرات ضد نفخ، ادرارآور، شیرآور، ضد سرطانی (۲)، ضد انگلی، ضد باکتریایی (۳)، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی (۴) روغن سیاهدانه اثبات رسیده است. تایموکوئینون، تیمول، کارواکول، پاراسیمن و تربینول از اجزای فعال و مهم روغن سیاهدانه و عصاره‌ی کالوس سیاهدانه می‌باشند (۵). اکثر مولکول‌های زیست فعال موجود در اسانس سیاهدانه از دسته فنل‌ها می‌باشند (۶).

گیاه سیاهدانه منبع غنی از ترکیبات فنلی است که در اثر تنش‌های زنده و غیر زنده مقدار آن افزایش می‌یابد این ترکیبات با فعالیت پلی فنل اکسیدازها که در پلاست‌های سلول وجود دارند، اکسیدشده و در کشت بافت موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت گیاه و عدم تثبیت ریزنمونه‌ها در محیط کشت می‌گردد. تیره شدن نسبی محیط کشت بدون اسید آسکوربیک در تکثیر سیاهدانه تاییدی بر تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی فراوان در محیط کشت است که می‌تواند برای رشد ریزنمونه مضر باشد، بنابراین استفاده از این ماده (اسید آسکوربیک) در محیط کشت مربوط توصیه می‌شود (۷).

استفاده از داروهای گیاهی به‌خاطر عوارض جانبی داروهای شیمیایی بیشتر شده (۸) و پیشنهاد شده که بایستی ماده موثره گیاهان دارویی آن‌هم در شرایط کشت بافت (درون شیشه‌ای) افزایش یابد (۹). استفاده از کالوس، سوسپانسیون سلولی و تولید ریشه‌های موئین جهت تولید متابولیت‌های ثانوی و ترکیبات دارویی نظیر انواع آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، مواد فنلی، آمینواسیدها، مواد ضد سرطان و غیره از کاربردهای کشت بافت گیاهی بوده (۱۰) و می‌توان در کشت بافت، متابولیت‌های با ارزش موردنظر را در تمام فصول سال و با مقدار و کیفیت دلخواه در بیوراکتورها با اعمال ایستور تولید کرد (۱۱).

واژه ایستور در گیاهان به مواد مختلف شیمیایی اطلاق می‌شود که منجر به پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک

و در نهایت تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود. واضح است که تیمار گیاهان با ایستور و یا یک پاتوژن غیر رقیب موجب بروز پاسخ‌های دفاعی مانند تجمع متابولیت‌های ثانوی در گیاهان و یا کشت‌های سلولی می‌شود. ایستورها بر اساس طبیعتشان به ایستورهای زیستی و ایستورهای غیر زیستی و بر اساس و منشأشان به ایستورهای بیرونی و ایستورهای درونی طبقه‌بندی می‌شوند (۱۲). ایستورها ممکن است با تغییر و تنظیم میزان بیوسنتز، تجمع و یا تبادل مواد ذخیره‌شده در واکوئل‌ها، تبدیل و یا تجزیه متابولیت‌های ثانویه آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهند. میزان فیتوالکسین‌ها ممکن است تحت تاثیر یک یا تعداد بیشتری از این ساز و کارها تغییر کند (۱۳).

با توجه به این‌که اثر ایستور زیستی و غیر زیستی بر میزان تولید برخی آلکالوئیدها و مواد آنتی‌اکسیدانی برخی گیاهان از جمله خشخاش (۱۴)، فندق (۱۵)، بذرالبنج (۱۶)، بادرنجبویه (۱۷)، عنعنا فلفلی (۱۸) و غیره انجام شده اما تاکنون بر روی سیاه دانه انجام نشده لذا هدف از تحقیق حاضر ضمن بهینه‌سازی کالوس زایی، اثر ایستورهای زیستی و غیر زیستی بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه دارویی سیاهدانه در شرایط کشت بافت مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جوانه‌زنی: بذرها سیاهدانه در سال ۱۳۹۵ از مرکز تحقیقات کشاورزی سیستان تهیه شد. برای به‌دست آوردن گیاهچه‌های استریل، بذرها با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم (۲ درصد) به‌مدت ۵ دقیقه تحت شرایط استریل، ضدعفونی سطحی شده و پس از ۳ تا ۵ بار شستشو با آب مقطر دو بار استریل به محیط کشت MS و 1/2MS فاقد تنظیم‌کننده رشد با ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۸ گرم در لیتر آگار در ظروف استریل کشت شدند و جهت جوانه‌زنی به اتاق کشت با دمای ۲۳±۲ و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند (۱۹).

کالوس زایی

جوانه‌زنی بذرها در محیط کشت بعد از گذشت دو هفته آغاز شد و پس از دستیابی به گیاهچه‌هایی به ارتفاع حدود

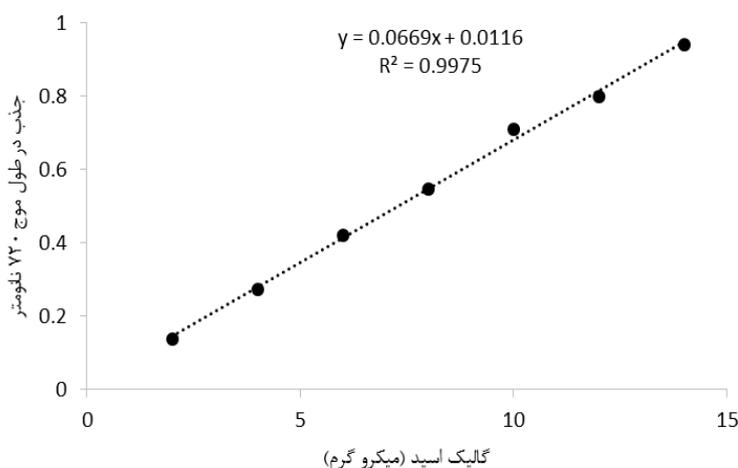
۰/۱ گرم کالوس در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در تاریکی به‌منظور سنجش ترکیبات فنلی کل و فلاونوئید کل نگهداری و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ درو سانتریفیوژ شدند.

جهت سنجش فنل کل؛ پس از سانتریفیوژ به یک میلی‌لیتر محلول رویی، یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر، حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین‌سیوکالتیو (۰/۵۰) (Folin-Ciocalteu) و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ mg/l) کل در غلظت‌های (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۳۵۰) صورت گرفت (۲۱).

۱۰-۸ سانتی‌متر، ریزنمونه‌های از هیپوکوتیلدون، ریشه، برگ و کوتیلدون برای کالوس زایی، انتخاب و پس از ضدعفونی کردن به محیط کشت MS به همراه تیمار تنظیم‌کننده رشدی (۰/۲۵ mg/l، ۰/۵ و ۱) BAP و (۱، ۲، ۴ و ۸) 2,4-D منتقل شدند. پس از کالوس زایی ریزنمونه‌ها، کالوس‌های موردنظر پس از دو بار واكشت و بعد از گذشت چهار هفته از آخرین واكشت، مورد ارزیابی قرار گرفتند و جهت به دست آوردن فنل کل و فلاونوئید کل، کالوس‌ها در محیط کشت پایه MS که حاوی تیمارهای نانو نقره (Nano-Ag) (۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) و عصاره مخمر (Yeast Extract) (۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm) بودند واكشت و در دو بازه زمانی سه و هفت روز بعد از واكشت مورد ارزیابی شدند (۲۰).

سنجش میزان فنل کل و فلاونوئید

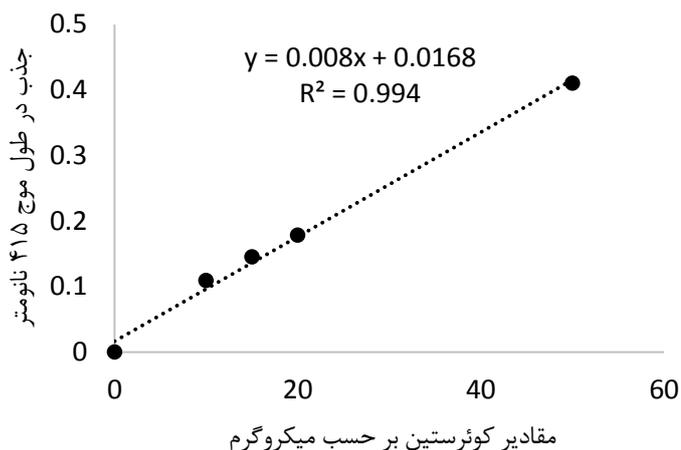
شکل ۱، غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید. رسم منحنی استاندارد فنل



شکل ۱: منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه‌گیری مقادیر فنل

شد. از غلظت‌های مختلف کوئرستین (۰، ۱۰، ۱۵ و ۲۰) به‌عنوان استاندارد استفاده و مقدار فلاونوئید (mg quercetin g-1 FW) بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین (شکل ۲) سنجیده شد (۲۲).

جهت سنجش فلاونوئید کل نیز پس از سانتریفیوژ به یک میلی‌لیتر محلول رویی، ۲۵۰ میکرو لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۲۵۰ میکرو لیتر پتاسیم استات یک مولار اضافه و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده



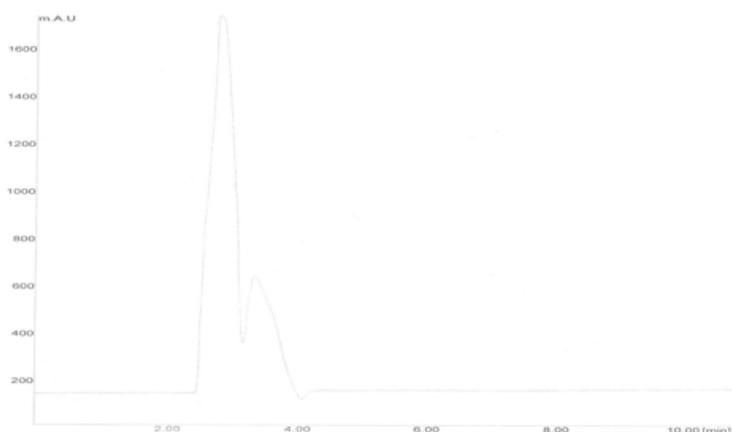
شکل ۲: منحنی استاندارد کوئرستین جهت اندازه‌گیری مقادیر فلاونوئید

سنجش میزان کوئرستین با استفاده از HPLC

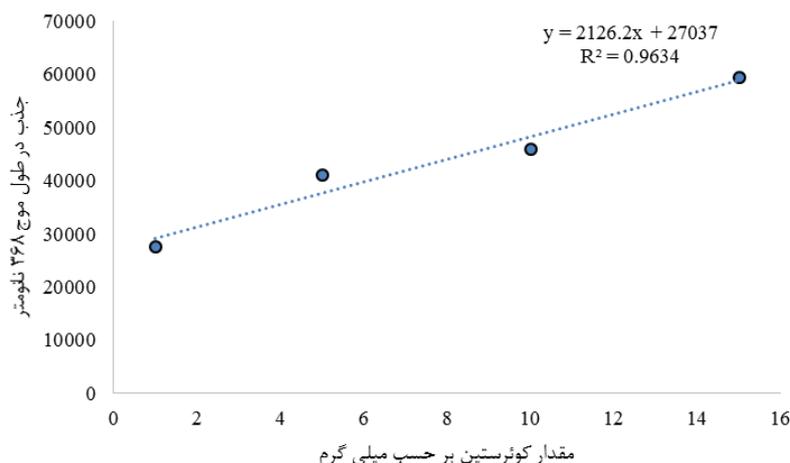
حدود ۰/۳ گرم پودر کالوس‌های موردنظر در ۱۰ سی‌سی بافر استخراج (۱۰۰ سی‌سی متانول، ۲ سی‌سی اسید استیک و ۱۰۰ سی‌سی آب) حل شد و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت و پس از آن ۲ میلی‌لیتر از همین محلول در دور ۲ هزار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از فیلتر (پالایه) های مخصوص عبور داده شد، در نهایت از محلول پالایه شده جهت انجام HPLC استفاده شد (۲۳).

برای اندازه‌گیری کوئرستین از دستگاه HPLC مدل unicom-crystal-200 ساخت انگلستان حاوی کشف

کننده از نوع photodiode array که در طول موج ۳۶۸ نانومتر تنظیم شده استفاده شد. برای اندازه‌گیری کوئرستین، ابتدا غلظت‌های (۱، ۵، ۱۰ و ۱۵) ppm از محلول استاندارد کوئرستین در متانول تهیه و به دستگاه HPLC تزریق و محتوای کوئرستین بر اساس سطح زیر منحنی پیک‌های حاصل با زمان بازداری مربوط و مقایسه آن با منحنی کالیبراسیون غلظت/سطح ترکیبات استاندارد، محاسبه و منحنی کالیبراسیون آن رسم شد (محتوای کوئرستین بر اساس mg/g وزن خشک محاسبه شد) (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳: استاندارد کوئرستین در سطح ۵ ppm



شکل ۴: منحنی کالیبراسیون ترکیب کوئرستین

غلظت مختلف از ترکیب دو تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP استفاده شد قرار گرفتند. اولین واکنش‌های به تشکیل کالوس در قطعات ریزنمونه، بعد از گذشت ۷ روز مشاهده و این فرآیند پس از گذشت ۶۵ روز (واکنش‌های متوالی) کامل شد (شکل ۵ (بخش الف، ب، ج و د))؛ و صفاتی نظیر درصد کالوس‌زایی، رنگ کالوس، حجم کالوس، وزن تر و خشک کالوس و کیفیت کالوس یادداشت شد. پس از بررسی‌های آماری، نتایج نشان داد که هر دو تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP در بیشتر غلظت‌ها باعث القای فرآیند کالوس‌زایی در تمام قطعات ریزنمونه شده (

میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه ریشه و کوتیلدون داشته است و مشاهده شد که با افزایش غلظت BAP درصد کالوس زایی کمتر شده است. همچنین تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تولید کالوس در قطعه ریزنمونه هیپوکوتیلدون داشته و کمترین نقش را در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و در ریزنمونه ریشه داشته است ضمناً با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D تأثیر آن بر میزان کالوس دهی بیشتر شده به طوری که بیشترین درصد کالوس دهی در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمده است اما کالوس‌زایی در سطوح بالاتر 2, 4-D سیر نزولی داشته است.

آنالیز آماری

داده‌ها بعد از جمع‌آوری توسط نرم‌افزارهای SAS 9.1 و Student statistic 9 مورد ارزیابی و مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

جوانه‌زنی بذر

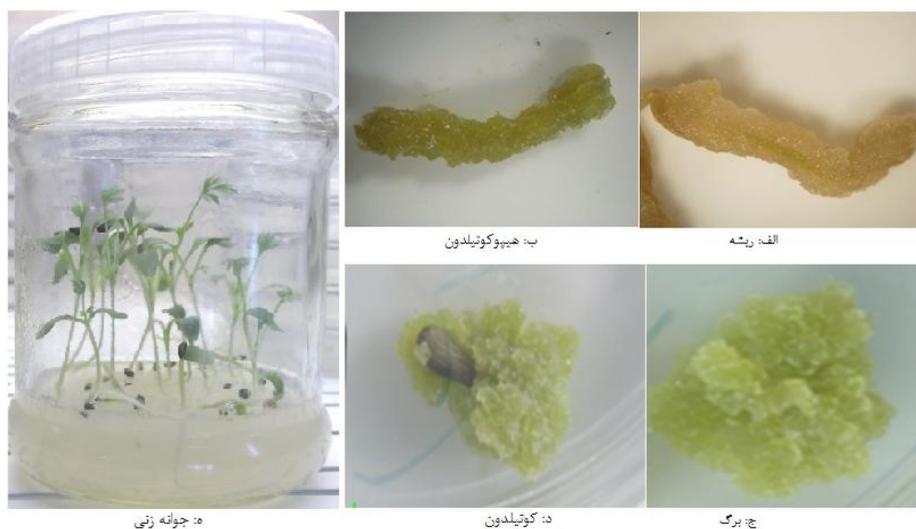
جهت بررسی فرآیند کالوس زایی، قطعات ریزنمونه (ریشه، هیپوکوتیلدون، برگ و کوتیلدون) روی محیط کشت پایه MS جامد حاوی ساکاروز ۳ درصد، ویتامین B5 و ۱۶ و (Error! Reference source not found. و به طوری که بیشترین درصد تشکیل کالوس (۶۰ درصد) در قطعات ریزنمونه

هیپوکوتیلدون و کمترین (۷ درصد) در قطعات ریزنمونه کوتیلدون مشاهده شد همچنین از لحاظ کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین ریزنمونه‌ها، سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP و سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D وجود داشت.

تنظیم‌کننده رشد BAP به‌تنهایی در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را در کالوس‌زایی هیپوکوتیلدون داشته و کمترین نقش را در غلظت یک

4-D (۴ میلی‌گرم در لیتر) و ریزنمونه هیپوکوتیلدون استفاده شود. دوما از سایر ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی دیگر 4-D, 2 با انواع تنظیم‌کننده‌های رشدی دیگر مثل IAA, NAA و غیره استفاده شود تا نتیجه دقیق‌تری به لحاظ مؤثرترین تنظیم‌کننده رشد یا ترکیب تنظیم‌کننده رشدی مختلف در القای کالوس گیاه دارویی سیاه‌دانه به دست بیاید.

ضمناً در برهم‌کنش تنظیم‌کننده‌های رشدی؛ BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) با 4-D, 2 (۴ میلی‌گرم در لیتر) توانسته‌اند بیشترین کالوس را در ریزنمونه هیپوکوتیلدون تولید کنند (شکل ۵)، یعنی در اثر برهم‌کنش، تنظیم‌کننده رشد BAP باعث شده تأثیر تنظیم‌کننده رشد 4-D, 2 در القای کالوس بیشتر شود لذا پیشنهاد می‌گردد اولاً برای به دست آوردن بهترین و بیشترین کالوس در گیاه دارویی سیاه‌دانه از ترکیب BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) با 2,

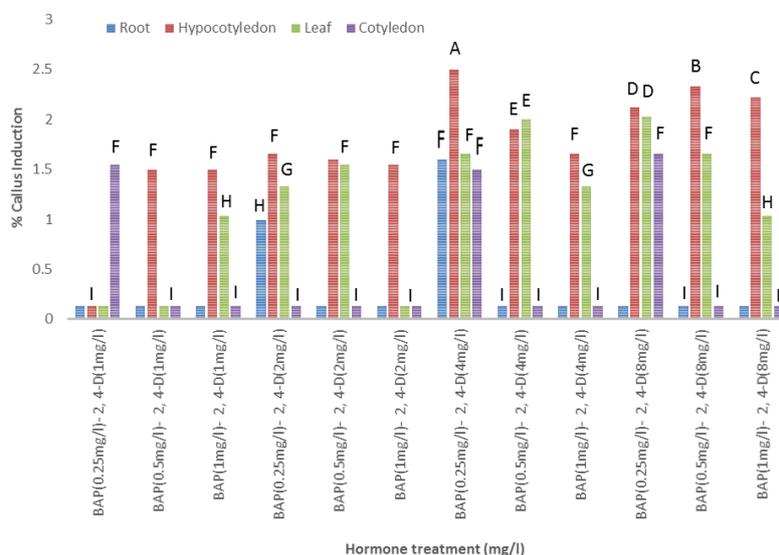


شکل ۵: جوانه‌زنی در محیط MS ۱/۲ (ه) و القای کالوس از نواحی ریزنمونه ریشه (الف)، هیپوکوتیلدون (ب)، برگ (ج) و کوتیلدون (د) سیاه‌دانه

جدول ۱: تجزیه واریانس کالوس زایی با استفاده از آزمون دانکن

منابع تغییرات	میانگین مربعات			
	درجه آزادی	درصد کالوس زایی	حجم	وزن تر
ریزنمونه	۳	۱۵/۰۱۰**	۱۷۰۶/۴۱**	۸/۱۷۴**
2, 4-D	۳	۶/۸۷۹**	۱۱۰/۸۴	۵/۸۱۸
BAP	۲	۷/۷۹۷**	۴۱/۸۴	۳/۳۷۱
ریزنمونه * 2, 4-D	۹	۲/۶۱۳**	۷۵/۵۹**	۳/۳۹۳
ریزنمونه * BAP	۶	۰/۷۹۱**	۱۲۲/۷۲**	۱/۳۶۵
2, 4-D * BAP	۶	۱/۸۴۳**	۲۳۳/۵۹**	۱/۴۴۲
ریزنمونه * BAP * 2, 4-D	۱۸	۲/۰۹۱**	۸۶/۵۷**	۸/۳۶۰**
خطا	۹۶	۰/۰۴۳	۱۸/۵۲	۵/۳۰۹

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد
* حجم کالوس بر اساس مقیاس مهرابی و همکاران (۲۴) اندازه‌گیری شد.



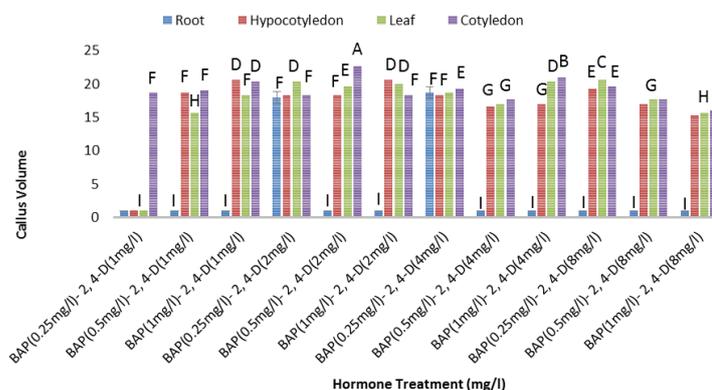
شکل ۶: مقایسه

میانگین اثر تیمارهای

مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP و 2,4-D و ریزنمونه بر درصد کالوس زایی سیاه دانه
حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

ریزنمونه، ریزنمونه کوتیلدون بود (**Error! Reference source not found.**). ضمناً مؤثرترین سطح تنظیم‌کننده رشدی BAP و 2,4-D بر وزن کالوس به ترتیب سطح ۰/۲۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر بود (**Error! Reference source not found.**) اما بیشترین حجم کالوس در ریزنمونه کوتیلدون و تیمار تنظیم‌کننده رشدی 2,4-D 2mg/l و BAP 0.05mg/l به دست آمد.

اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین ریزنمونه‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D به تنهایی و اثرات متقابل تنظیم‌کننده رشد در حجم کالوس‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌ها وجود داشت (جدول ۱). ضمناً نتایج LSD نشان داد که بین ریزنمونه‌ها (ریشه، هیپوکوتیلدون، برگ و کوتیلدون) بر اساس حجم کالوس اختلاف معنی‌داری وجود داشته و بهترین



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP و 2,4-D و ریزنمونه بر حجم کالوس سیاه دانه

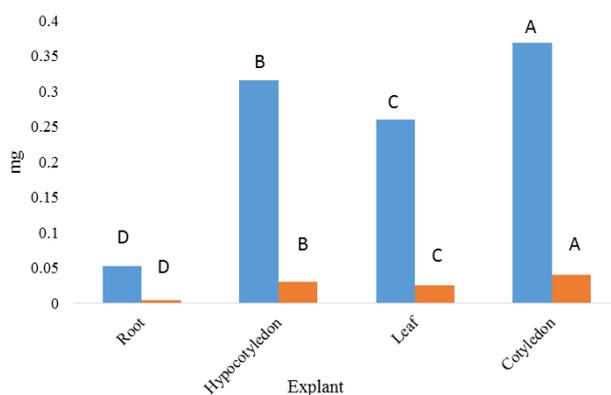
حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

به‌تنهایی و اثرات متقابل تنظیم‌کننده رشد در وزن کالوس‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌ها وجود داشت (

داشته اما تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و BAP تأثیری بر رنگ و کیفیت کالوس نداشتند. کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیلدون سبز روشن‌تر نسبت به سایر ریزنمونه‌ها و ریزنمونه کوتیلدون، برگ و سپس ریشه در رتبه‌های بعدی بودند. ضمناً کالوس‌های حاصل از ریزنمونه کوتیلدون آبدارتر نسبت به سایر ریزنمونه‌ها بوده و ریزنمونه‌های هیپوکوتیلدون، برگ و سپس ریشه در رتبه‌های بعدی بودند.

اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین ریزنمونه‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2, 4-D و

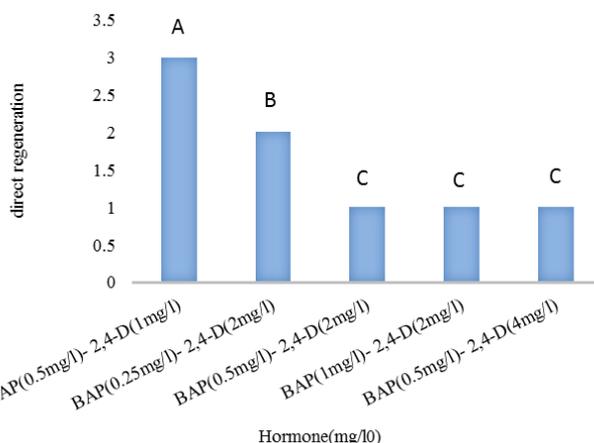
۱) ضمناً نتایج LSD نشان داد که بین ریزنمونه‌ها (ریشه، هیپوکوتیلدون، برگ و کوتیلدون) بر اساس وزن کالوس اختلاف معنی‌داری وجود داشته و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه کوتیلدون بود. ضمناً مؤثرترین سطح تنظیم‌کننده رشدی BAP و 2, 4-D بر وزن کالوس به ترتیب سطح ۰/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر بود. آزمون کای اسکور نشان داد که ریزنمونه‌ها از لحاظ رنگ و کیفیت کالوس اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد



شکل ۸: مقایسه میانگین وزن تر و خشک کالوس ریزنمونه‌های مختلف سیاه دانه حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

بیشترین باززایی مستقیم در ریزنمونه ریشه و در تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی 1 mg/l 24D و 0.5 mg/l BAP صورت گرفت و (بدون تشکیل فاز حد واسط کالوس) به هیپوکوتیلدون و برگ تبدیل شد

(شکل).



شکل ۹: مقایسه میانگین تاثیر ترکیبات تنظیم‌کننده رشد مختلف بر میزان باززایی مستقیم ریشه سیاه دانه
حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

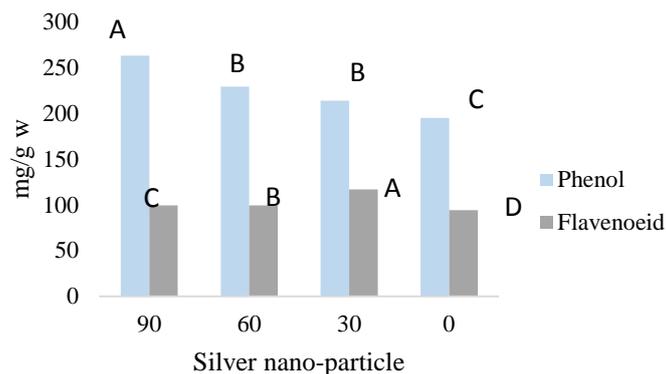
نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که اثرات تکی نانو ذرات نقره و عصاره مخمر در زمان‌های مختلف و همچنین اثرات متقابل بر میزان فنل در سطح یک درصد معنی‌دار (جدول) و آزمون تعقیبی LSD نیز نشان داد که نانو ذرات نقره بر میزان فنل تأثیر مثبت داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره میزان فنل کل نیز زیاد شده به طوری که بیشترین میزان فنل (۲۶۳/۰۶ میلی‌گرم) حاصل از ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره و کمترین میزان (۱۹۵/۲۶۹ میلی‌گرم) در شاهد به دست آمد (شکل). عصاره مخمر نیز بر میزان فنل تأثیر مثبت داشته و با افزایش عصاره مخمر میزان فنل کل نیز زیاد شده اما این افزایش فقط تا سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر بوده و از این میزان بیشتر نه تنها تأثیر مثبت نداشته بلکه

تأثیر منفی داشته است (شکل) به طوری که بیشترین میزان فنل (۳۲۳/۸۰۱) در سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر و کمترین میزان فنل (۱۴۷/۹۰۷) در شاهد به دست آمد. از طرفی میانگین مجموع تمامی اثرات ساده و متقابل تیمارها، با گذشت زمان، میزان فنل زیاد شده اما میزان فلاونوئید کمتر شده است. لازم به ذکر است که عصاره مخمر و نانو ذرات نقره با گذشت زمان تأثیر مثبتی بر میزان فنل داشته‌اند (شکل ۱۲) همچنین عصاره مخمر نسبت به نانو ذرات نقره تأثیر بیشتری بر میزان فنل و فلاونوئید داشته است (شکل و شکل) ضمناً بیشترین میزان فنل کل در اثر متقابل نانو ذرات نقره (صفر یا همان شاهد) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمده است (شکل ۱۲).

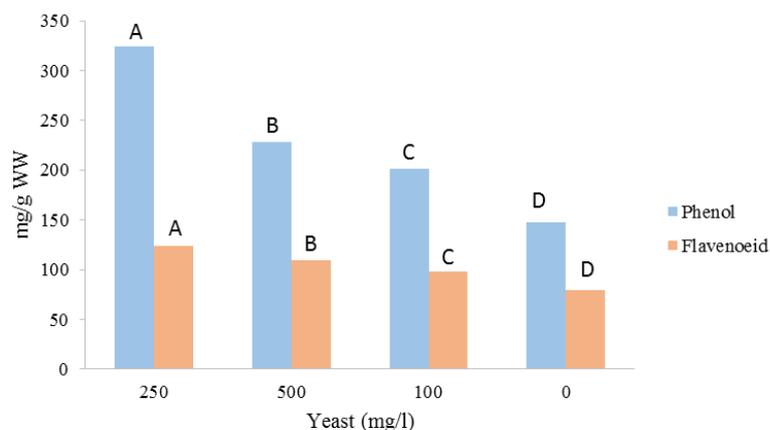
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر نانو ذرات نقره، عصاره مخمر و زمان بر میزان فنل کل و فلاونوئید

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		فلاونوئید
		فنل
نانو نقره	۳	۲۳۶۵/۴۷**
عصاره مخمر	۳	۸۷۱۲/۴۵**
زمان	۱	۳۰۶۹۰/۹**
نانو نقره و عصاره مخمر	۹	۷۸۸۷/۰۱**
نانو نقره و زمان	۳	۲۳۴۹/۹۰**
عصاره مخمر و زمان	۳	۲۱۳۸/۸۶**
نانو نقره، عصاره مخمر و زمان	۹	۳۸۹۶/۷۵**
خطا	۶۴	۳/۰۱۰
کل	۹۵	

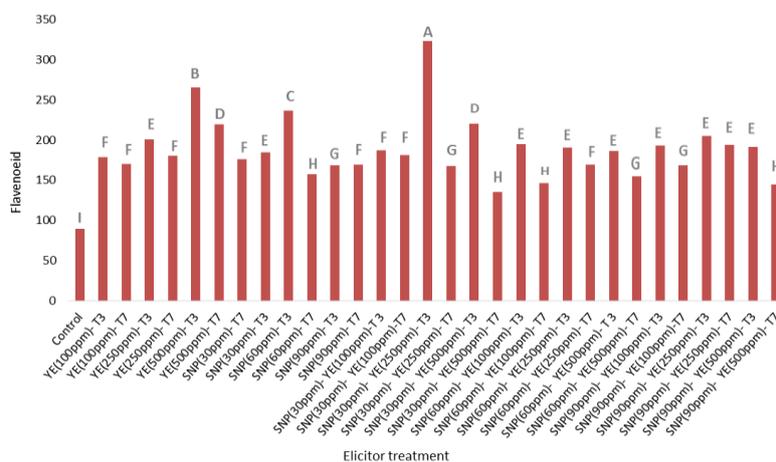
* علامت اختصاری (M: عصاره مخمر، N: نانو نقره و T: زمان)



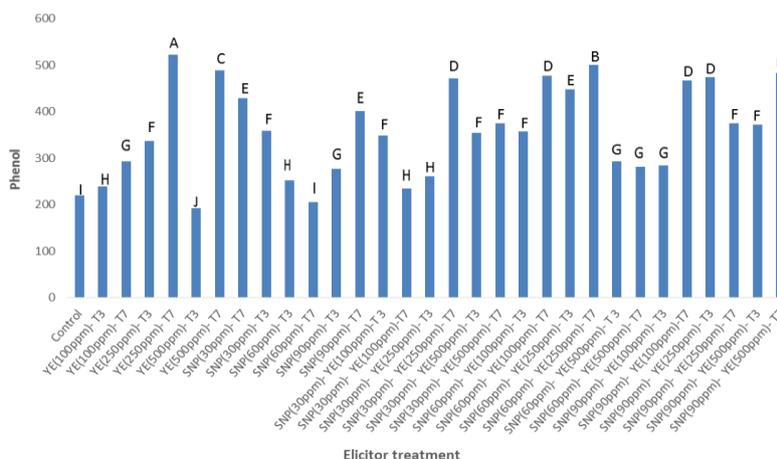
شکل ۱۰: مقایسه میانگین تاثیر نانو ذرات نقره بر میزان فنل کل و فلاونوئید سیاه دانه در سطح کالوس در محیط پایه MS



شکل ۱۱: مقایسه میانگین تاثیر عصاره مخمر نقره بر میزان فنل کل و فلاونوئید سیاه دانه در سطح کالوس در محیط پایه MS
حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است



شکل ۱۲: مقایسه میانگین تاثیر الیستور نانو نقره، عصاره مخمر و زمان بر میزان فلاونوئید سیاه دانه در سطح کالوس در محیط پایه MS
(YE= Yeast Extract; SNP= Silver nano-Particle; T= Time)



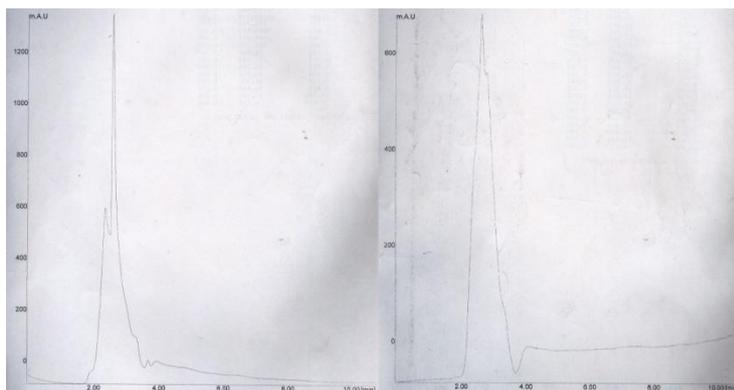
شکل ۱۳: مقایسه میانگین تاثیر الیستور نانو نقره، عصاره مخمر و زمان بر میزان فنل سیاه دانه در سطح کالوس در محیط پایه MS

(YE= Yeast Extract; SNP= Silver nano-Particle; T= Time)

داشته است (شکل) به طوری که بیشترین میزان فلاونوئید (۱۲۴ میلی گرم) در تیمار سطح ۲۵۰ میلی گرم در لیتر عصاره مخمر و کمترین میزان فلاونوئید (۷۹) در شاهد به دست آمد. از طرفی میانگین مجموع تمامی اثرات ساده و متقابل تیمارها با گذشت زمان نشان داده که میزان فلاونوئید کمتر شده است. همچنین عصاره مخمر و نانو ذرات نقره با گذشت زمان تاثیر منفی بر میزان فلاونوئید داشته‌اند (شکل ۱۲) و در مجموع مشخص شد که جهت افزایش و به دست آوردن بیشترین میزان فلاونوئید در سیاه‌دانه بهتر است از تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی گرم) در بازه زمانی ۳ روزه استفاده کرد (شکل ۱۲). همچنین نتیجه HPLC برای کوئرستین (یکی از اجزای فلاونوئید) (۴/۹ میلی گرم در گرم ماده خشک) نشان داده که مؤثرترین تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی گرم) در بازه زمانی ۳ روزه بوده است (شکل ۱۴)

اثر الیستور بر میزان فلاونوئید سیاه دانه

در میزان فلاونوئید نیز نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که اثرات تکی نانو ذرات نقره و عصاره مخمر در زمان‌های مختلف و همچنین اثرات متقابل بر میزان فلاونوئید در سطح یک درصد معنی‌دار (جدول) و آزمون تعقیبی LSD نیز نشان داد که نانو ذرات نقره بر میزان فنل تاثیر مثبت داشته و اما این تاثیر بیشتر از ۳۰ نانوگرم در لیتر بیشتر نبوده و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره میزان فلاونوئید کل نیز کمتر شده اما نسبت شاهد بیشتر شده است و در کل بیشترین میزان فلاونوئید (۱۱۷ میلی گرم) حاصل از ۳۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره و کمترین میزان (۹۴/۴ میلی گرم) در شاهد به دست آمد (شکل). عصاره مخمر نیز بر میزان فلاونوئید تاثیر مثبت داشته و با افزایش عصاره مخمر میزان فلاونوئید کل نیز زیاد شده اما این افزایش فقط تا سطح ۲۵۰ میلی گرم در لیتر عصاره مخمر بوده و از این میزان بیشتر نه تنها تاثیر مثبت نداشته بلکه تاثیر منفی



شکل ۱۴: کروماتوگرام نمونه شاهد (راست)، اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی‌گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم) در بازه زمانی ۳ روزه (چپ)

بحث

در جوانه زنی بذرهای سیاهدانه، محیط کشت $1/2MS$ نسبت به محیط MS مناسب‌تر تشخیص داده شده زیرا به نظر می‌رسد مقادیر بالای نمک در محیط کشت، جوانه زنی بذرهای گیاهان مختلف را می‌تواند محدود کند (۲۵)، ضمناً گزارش شده سیاهدانه مقاوم به شوری نبوده چون محیط‌های شور تا ۷۰ میلی‌گرم در لیتر شوری را تحمل کرده و حتی در حضور کینتین نتوانسته سطح تحمل را افزایش دهد (۲۶) در نتیجه می‌توان گفت که جهت جوانه زنی سیاهدانه بهتر است از محیط $1/2MS$ به لحاظ میزان مناسب ویتامین و نمک کمتر استفاده شود. بنا بر نتایج حاصله از این تحقیق نوع جداکشت، تفاوت معنی‌داری در تولید کالوس داشت به طوری که بیشترین درصد تشکیل کالوس (۳۶ درصد) در قطعات ریزنمونه هیپوکوتیلدون و کمترین (۳ درصد) در قطعات ریزنمونه کوتیلدون مشاهده شد ضمناً اثر نوع جداکشت در تولید کالوس توسط محققین دیگر به اثبات رسیده است (۲۷)، به طوری که بهترین قطعات ریزنمونه برای تشکیل کالوس طبق تحقیقات مالیک و ساکسنا (۲۸) برگ، امیری و فهیمی (۲۹) هیپوکوتیل، احمد و همکاران (۳۰) گرهک لپه‌ای، الشمی و همکاران (۳۱) اپی کوتیل، ولتچوا و همکاران (۳۲) برگ، استفانیاک و همکاران (۳۳) ساقه، گزارش شده از طرفی انتخاب یک ریزنمونه نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت در شرایط درون شیشه‌ای بازی می‌کند. پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب تاثیر چشمگیری بر القا کالوس دارد (۳۴) هرچند که سن گیاهچه و نحوه قرار گرفتن آن‌ها روی محیط کشت نیز در برخی از گیاهان حائز اهمیت است (۳۵) ضمناً با توجه به اینکه القای کالوس از نواحی برش خورده آغاز می‌شود (۳۶) بنابراین پیشنهاد می‌شود که سطوح ریزنمونه‌ها قبل از تلقیح نیز زخمی شود. سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP بر میزان

کالوس‌زایی تاثیر معنی‌داری داشته به طوری که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۲۴/۳ درصد) در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین میزان کالوس‌زایی (۱۱/۸ درصد) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر داشته و از طرفی اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد BAP بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها نیز معنی‌دار که BAP به تنهایی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیلدون و کمترین نقش را در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه ریشه و کوتیلدون داشته است ضمناً مشاهده شد که با افزایش غلظت BAP درصد کالوس‌زایی کمتر شده است. در بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D, بیشترین میزان تولید کالوس (۲۲/۲۲) در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر به دست آمده است. در اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D, و ریزنمونه‌ها بیشترین میزان تولید کالوس در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه هیپوکوتیلدون به دست آمده است ضمناً با افزایش غلظت 2, 4-D, کالوس‌زایی نیز زیاد شده است. لازم به ذکر است هر کدام از تنظیم‌کننده‌های رشد به تنهایی کالوس‌زایی کمتری تولید کرده‌اند اما اثر متقابل تنظیم‌کننده رشدی 2, 4-D, (در سطح ۴ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (سطح ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) توانسته کالوس‌زایی را تا سطح ۴۱/۶۶ درصد افزایش دهد. بیشترین تولید کالوس هم در پژوهش احمد و همکاران (۳۰) و هم در پژوه کرمی و همکاران (۳۷) حاصل برهم‌کنش دو تنظیم‌کننده رشد اکسینی و سیتوکینینی بوده و در نتایجی (۳۷) گزارش شده که هیچ کالوسی در ریزنمونه، برگی لوبیا تشکیل نشده و بیشترین تاثیر تنظیم‌کننده رشد BAP (در ۴ mg/l) جهت القای کالوس لوبیا حدود ۱۱ درصد بوده ولی به صورت ترکیبی با تنظیم‌کننده رشد NAA توانسته کالوس‌زایی را تا ۴۲ درصد افزایش دهد در تحقیق حاضر نیز اثر متقابل دو تنظیم‌کننده رشد تاثیر بیشتری نسبت به اثر تکی آن‌ها بر کالوس‌زایی داشته است، اما نکته مشترک این است که

رشد سلولی دارند (۴۷) و در این بین ترکیبات حاوی 2, 4-D بالاترین سطوح تولید کالوس را به خود اختصاص داده‌اند (۴۸). گزارش شده که کالوس زایی در ریزنمونه‌ها با افزایش میزان اکسین و بالا رفتن نسبت اکسین به سیتوکینین نسبت مستقیم دارد (۴۹ و ۵۰). در لپه‌های گیاه گردو نیز گزارش شده (۵۱) که بدون وجود اکسین در محیط کشت، کالوس تولید نمی‌گردد؛ اما در کل گونه‌های گیاهی مختلف، نیازهای متفاوتی به اکسین‌ها دارند جهت کالوس زایی دارند (۵۲). بنابراین میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب تنظیم‌کننده رشد به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعیین‌کننده و مهم به‌شمار می‌رود (۴۲، ۵۳). در این رابطه موراشیگ (۵۴) اظهار داشته است که نسبت اکسین/سیتوکینین نزدیک به ۱۰ برای رشد سریع کالوس‌های تمایز نیافته، نسبت‌های نزدیک به ۱۰۰ برای نمو ریشه و نسبت‌های نزدیک به ۴ برای رشد نو ساقه‌ها مناسب هستند. در تحقیق حاضر نیز بهترین کالوس در حضور سیتوکینین (۰/۲۵ میلی‌گرم) و اکسین (۴ میلی‌گرم) تولید شده است که بهترین درصد کالوس زایی در همان نسبت ۱ به ۱۰ به‌دست آمده و مشابه تحقیقات قبلی است.

در تحقیق حاضر بیشترین وزن تر و خشک کالوس مربوط به ریزنمونه کوتیلدون بود که با نتایج ارائه‌شده توسط کریمی و همکاران (۵۵) که بیشترین وزن تر کالوس را در ریزنمونه کوتیلدون برای گل انگشتانه به دست آورده بودند مشابه داشت ضمناً بالا بودن وزن تر در کالوس‌های حاصل از کوتیلدون را احتمالاً می‌توان به محتوای تنظیم‌کننده رشدی درون آن‌ها نسبت داد چرا که پدیده کالوس زایی در قطعات ریزنمونه، به مجموع سطوح تنظیم‌کننده رشدی درون‌زاد و برون‌زاد تنظیم‌کننده‌های رشد اضافه‌شده به محیط کشت بستگی دارد.

در تحقیق حاضر بهترین بازای مستقیم در ریزنمونه ریشه در ترکیب تنظیم‌کننده رشدی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد که مشابه نتایج قبلی (۵۶) بود. ضمناً ریشه به جهت دارا بودن سلول‌های مریستمی در انتها می‌تواند در غلظت‌های تنظیم‌کننده رشدی مناسب به‌طور مستقیم و بدون واسطه کالوس، تولید برگ نمایند از طرفی اکسین‌ها به‌خصوص

ترکیب تنظیم‌کننده رشد BAP با 2, 4-D (در سیاه‌دانه) و BAP با NAA (در لوبیا) به‌طور یکسان ۴۲ درصد کالوس دهی را تولید کرده‌اند. با توجه به اینکه گزارش شده که نمک‌های موجود در محیط کشت تا حدودی بر میزان رشد و کالوس دهی تاثیر منفی دارند (۲۵) در نتیجه میزان متوسط کالوس دهی در سیاه‌دانه می‌تواند به این دلیل باشد که این گیاه مقاوم به شوری نبوده (۲۶) ولی توانسته در حضور تنظیم‌کننده‌های رشد کالوس دهی بهتری را تولید کند.

در نتایجی دیگر (۳۰) بهترین کالوس‌ها را در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد BA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و NA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آوردند. در نتایجی غیرمشابه دیگر امیری و فهیمی (۲۹) بهترین کالوس‌ها را در قطعات ریزنمونه هیپوکوتیل رقم ناز در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد Kin به‌دست آوردند. قابل‌تأمل این‌که تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و Kin تنظیم‌کننده‌های رشدی ضعیف‌تری محسوب می‌شوند و در بیشتر مطالعات 2, 4-D و BAP مناسب‌تر بوده‌اند. معمولاً 2, 4-D به‌عنوان قوی‌ترین اکسین مطرح و مقادیر بالای اکسین بزرگ شدن طولی سلول و افزایش تقسیم سلول را سبب می‌شود (۳۸) در این تحقیق ملاحظه شد که افزایش در غلظت تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D افزایش تولید کالوس را به‌همراه داشت که این نتایج مشابه نتایج کومار و روپاواتی (۳۹) ولی مخالف نتیجه سلطانی پور و همکاران (۴۰) بود. از لحاظ اهمیت تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید کالوس، امینی و همکاران (۴۱) نشان دادند که جهت تولید کالوس وجود تنظیم‌کننده رشد ضروری است و در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد و فاقد اکسین کالوس تولید نگردید. نتایج مشابهی نیز در این رابطه توسط دانشمندان دیگر در چندگونه گیاهی ثبت شده است (۴۲-۴۴). برخی تحقیقات نشان داده‌اند که در محیط کشت دارای اکسین و فاقد سیتوکینین، کالوس تولید می‌گردد اما بدون حضور اکسین کالوس تولید نمی‌شود (۴۵). لزوم وجود تنظیم‌کننده‌های اکسینی مانند 2, 4-D برای شروع کالوس زایی در سایر گونه‌های علفی نیز مشاهده شده است (۲۷، ۴۶) به‌خاطر اینکه اکسین‌ها اثر مستقیمی بر

2, 4-D تشکیل جنین‌های سوماتیکی را القا کرده و تقسیم سلولی را باعث می‌شوند، این تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس نیز نقش داشته و از رشد جوانه‌های جانبی و ریشه جلوگیری می‌کنند. سیتوکینین‌ها نیز در غلظت‌های بالا تشکیل جوانه را موجب شده و از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند (۵۷). مجموع این عوامل باعث شده که در تحقیق حاضر نیز ریزنمونه ریشه و در ترکیب تنظیم‌کننده رشدی ذکر شده باززایی مستقیم و مناسبی را داشته باشیم.

در این مطالعه نانو ذرات در ابتدا باعث افزایش ترکیبات فلاونوئیدی شده و سپس با گذشت زمان باعث کاهش شد که مشابه نتایج خوشبخت و همکاران (۵۸) که با استفاده از الیستور نانو نقره میزان آلوئین را در کشت سلولی گیاه آلوئه‌ورا افزایش داد و تا ۴۸ ساعت پس از القای الیستور نیز ادامه یافته اما پس از آن روند کاهشی داشته مشابهت داشت. از طرفی با افزایش غلظت الیستور نانو نقره در محیط کشت، میزان ترکیبات فنلی بیشتر شده که مشابه تحقیقات یوسفی و همکاران (۵۹) بود. چون مکانیسم کاهش اثرات تنش توسط فلاونوئید و فنل رامی توان به اتصال ترکیبات فنولیک با یون‌های فلزات سنگین مرتبط دانست (۶۰) در نتیجه افزایش محتوای فلاونوئید و فنل کل که در یک مسیر آبخاری و توسط تعداد زیادی آنزیم کاتالیز می‌شوند می‌توانند با افزایش تولید آنزیم‌های این مسیر مرتبط باشد (۵۹، ۶۱، ۶۲) اثرات مهاری اتیلن در غلظت‌های بالا، بر مهار سنتز متابولیت‌های ثانویه و از طرف دیگر اثرات تحریکی آن بر افزایش متابولیت‌های ثانویه در غلظت‌های کم به اثبات رسیده است (۶۳، ۶۴) بنابراین می‌توان اثرات مثبت نقره بر افزایش محتوای فلاونوئید و فنل کل را به اثر بازدارندگی آن بر فعالیت اتیلن نسبت داد (۶۵). هر چند مشخص شده که نانو نقره می‌تواند به دیواره سلولی نفوذ و تغییر در نفوذپذیری دیواره ایجاد کنند و با تغییر در جذب و دفع مواد توسط دیواره، روی بسیاری از فرایندهای داخل سلول تاثیرگذار بوده و حتی می‌تواند به سفر و سولفور موجود در دیواره متصل شده و به این صورت به DNA متصل و حتی در ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و آنزیم‌ها نیز تغییر ایجاد کند (۶۶).

مکانیسم عمل نانو ذرات بسیار گسترده است و سمیت

آن‌ها ممکن است به دلیل سطح نانو ذرات باشد که در تماس با مولکول‌های زیستی موجب انجام واکنش‌های احیا می‌شود (۶۷). این سمیت نانو ذرات نقره می‌تواند موجب کاهش تجمع متابولیت‌ها در ساعت‌های پایانی شود. از طرفی یکی دیگر از دلایل افزایش متابولیت‌های ثانوی در زمان‌های ابتدایی اعمال تیمار می‌تواند به این دلیل باشد که حضور نقره در محیط باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و همین عامل موجب شده که گیاه با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و افزایش محتوای فلاونوئید تنش‌های ایجاد شده را کاهش دهد (۵۹ و ۶۸) یعنی با وادار کردن گیاه به تولید مواد دفاعی (متابولیت‌های ثانوی) موجبات افزایش تولید آن‌ها را فراهم کرد (۵۸) هر چند گیاهان واکنش‌های دفاعی متفاوتی در برابر الیستورها دارند (۶۹ و ۷۰) لذا بسته به نوع گیاه و واکنش دفاعی آن و همچنین نوع متابولیت ثانوی مورد نیاز باید الیستور خاصی انتخاب کرد. حتی گزارش شده (۱۲) زمان اضافه نمودن الیستور و مدت زمانی که این سلول‌ها در معرض الیستورها قرار می‌گیرند از فاکتورهای موثر در تولید متابولیت‌ها است و این زمان دسترسی به حداکثر میزان متابولیت بسته به غلظت و نوع الیستور مختلف است (۷۱). با توجه به این‌که بیشترین میزان فنل کل در اثر متقابل نانو ذرات نقره (صفر یا همان شاهد) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به دست آمده لذا می‌توان ذکر کرد که عصاره مخمر مانع از عملکرد نانو ذرات نقره بوده در نتیجه جهت افزایش متابولیت‌های ثانوی از جمله فنل نباید از ترکیب عصاره مخمر و نانو ذرات نقره استفاده کرد و چون عصاره مخمر نسبت به نانو ذرات نقره تاثیر بیشتری بر میزان فنل کل داشته است جهت افزایش فنل کل بهتر است صرفاً از عصاره مخمر آن‌هم در بازه زمانی بیشتر (در تحقیق حاضر ۷ روزه) استفاده اما جهت افزایش و به دست آوردن بیشترین میزان فلاونوئید بهتر است از تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی‌گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی‌گرم) در بازه زمانی ۳ روزه استفاده کرد.

تجمع ترکیبات فلاونوئیدی در ساعت‌های ابتدایی بعد از القای الیستور و کاهش آن‌ها در ساعت‌های پایانی تیمار بود که حاکی از اثر زمان القای الیستور در تجمع این متابولیت را در ساعت‌های اولیه القای الیستوری دارد که

(۸۶)، گل محمدی (۸۷) و برخی مرکبات (۸۸)، به‌عنوان یکی از مهمترین اجزای فلاونوئید بررسی شده است لذا در تحقیق حاضر نیز کوئرستین مورد بررسی قرار گرفت. چون موثرترین تیمار بر میزان فلاونوئید، اثر متقابل نانو نقره (۳۰ ppm) و عصاره مخمر (۲۵۰ ppm) در بازه زمانی ۳ روزه بود لذا جهت تایید میزان فلاونوئید در کالوس های تیمار شده از HPLC جهت اندازه گیری کوئرستین استفاده و نتیجه HPLC نشان داده که بیشترین میزان کوئرستین (۴/۹ میلی گرم در گرم ماده خشک) از تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی گرم) در بازه زمانی ۳ روزه بوده که تاییدی بر نتایج تحقیق حاضر نیز است. نتایج این تحقیق نشان داد که جهت افزایش فنل کل بهتر است صرفاً از عصاره مخمر آن هم در بازه زمانی بیشتر (در تحقیق حاضر ۷ روزه) استفاده اما جهت افزایش و به دست آوردن بیشترین میزان فلاونوئید بهتر است از تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی گرم) در بازه زمانی ۳ روزه استفاده کرد. نتایج این تحقیق نیز مشابه تحقیقات، خداباری و همکاران (۷۷) که با استفاده از الیستور زیستی عصاره مخمر، افزایش تجمع مواد فنلی و فلاونوئیدی را به شکل پایدارتر و در زمان طولانی تری نشان دادند و آبراهام و همکاران (۸۹) که گزارش دادند عصاره مخمر به‌منزله الیستور زیستی موجب افزایش بیوماس و تولید متابولیت‌های ثانوی می‌شود مشابهت داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داده جهت به‌دست آوردن بیشترین میزان کالوس زایی از ریزنمونه هیپوکوتیلدون و اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد BAP (۲۵mg/l)، 2,4-D (۴mg/l) و بهترین بازایی مستقیم از اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد BAP (۵mg/l)، 2,4-D (۱mg/l) و ریزنمونه ریشه استفاده کرد. نتایج الیستورها بر میزان فنل و فلاونوئید نیز نشان داد که جهت افزایش فنل کل بهتر است صرفاً از عصاره مخمر آن هم در بازه زمانی بیشتر (در تحقیق حاضر ۷ روزه) استفاده شود اما جهت افزایش و به‌دست آوردن بیشترین میزان فلاونوئید بهتر است از تیمار اثر متقابل نانو ذرات نقره (۳۰ میلی گرم) و عصاره مخمر (۲۵۰ میلی گرم) در

با پژوهش دیگر محققین (۷۲-۷۴) نیز مطابق است. البته یکی از دلایل کاهش متابولیت‌ها در ساعت‌های پایانی، شروع پاسخ فوق حساسیت و سمی شدن سلول‌ها به‌دلیل تماس بیشتر الیستورها با آن‌ها در محیط کشت و ایجاد اثر بازخوردی و عدم بیان ژن‌های موثر است (۷۲ و ۷۵) در میان الیستورهای مورد استفاده، در ساعت‌های ابتدایی آزمایش، نانو نقره بیشترین تاثیر را بر میزان تجمع فلاونوئید را داشت؛ ممکن است این مسئله با کوچک بودن ذرات نانو الیستور، نسبت به‌اندازه سلول و اندازه ذرات سایر الیستورها مرتبط باشد که نفوذپذیری آن‌ها را به درون سلول آسان‌تر نموده و در نهایت توانسته است در حداقل زمان، سلول را وادار به تولید حداکثر متابولیت کند (۷۶) هرچند که به نظر می‌رسد یکی از موانع ادامه تجمع مواد فلاونوئیدی در زمان‌های پایانی، سمیت نانو ذرات مورد استفاده بود (۷۷).

در این مطالعه اثر الیستور زیستی عصاره مخمر نیز مورد بررسی قرار گرفت و چون الیستورهای زیستی ترکیباتی با منشأ زیستی هستند لذا از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانوی می‌شوند (۷۸). در تحقیق حاضر عصاره مخمر در غلظت‌های پایین باعث افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شد ولی در غلظت‌های بالا باعث کاهش شد. گزارش شده که این الیستور در گیاهان بر روی کل مسیر سنتز فلاونوئیدها تاثیر می‌گذارد و کاهش فلاونوئید و ترکیبات فنلی، در غلظت بالای عصاره مخمر این احتمال دارد که عصاره مخمر موجب فعال‌تر شدن دیگر آنزیم‌های غیر موثر این مسیر شده (۷۹) و یا می‌تواند به‌دلیل فعال‌تر شدن مسیرهای دیگر سیستم آنتی‌اکسیدان از قبیل مسیر آنزیمی باشد. در هر صورت، یکی از اثرات شناخته‌شده این الیستور ایجاد استرس در گیاهان و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است (۸۰).

با توجه به اینکه کوئرستین باعث کاهش قند و افزایش میزان انسولین پلاسما در موشهای صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، شده (۸۱) و یکی از مهم‌ترین اجزای فلاونوئیدی سیاه دانه است (۸۲) که میزان آن در سیاه دانه توسط برخی عوامل زیستی و غیر زیستی مختلف افزایش یافته (۸۳) و همچنین در تحقیقاتی روی گیاهان مختلف از جمله؛ عطر سنگ (۸۴)، رازیانه (۸۵)، بومادران

بازه زمانی ۳ روزه استفاده کرد.

منابع

1. Schleicher P, Saleh M. Black cummin: the magical Egyptian herb for allergies, asthma, and immune disorders: Inner Traditions/Bear & Co; 2000.
2. Mousavi S, Tayarani-Najaran Z, Asghari M, Sadeghnia H. Protective effect of Nigella sativa extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. Cellular and molecular neurobiology. 2010; 30(4): 591-598.
3. Gerige SJ, Gerige MKY, Rao M. GC-MS Analysis of Nigella sativa seeds and antimicrobial activity of its volatile oil. hazelnut (*Corylus avellana* L.) by combination of elicitor and precursor. Scientific Journal Management System. 2017; 33(1): 73-89.
4. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A. The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation. 2009; 20(5):741.
5. Al-Ani NK. Thymol Production from Callus Culture of Nigella sativa L. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 2008; 18(2): 181-185.
6. El-Tahir KE-DH, Bakeet DM. The black seed Nigella sativa Linnaeus-A mine for multi cures: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. Journal of Taibah University Medical Sciences. 2006; 1(1):1-19.
7. Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryam RM, Iqbal M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2013; 13(4): 539-547.
8. Dattner AM. From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future. Dermatologic therapy. 2003; 16(2): 106-113.
9. Azizi M, Omidbeigi R. The investigation of *Hypericum perforatum* L. in the in vitro condition in production of hypericin and other secondary metabolites. Pajouhesh and sazandegi journal. 2002; 40: 15-45.
10. Sharifi A, Moshtaghi N, Bagheri A. applications of Plant tissue culture University of Mashhad Press. 2011: 246 pages.
11. Debnath M, Malik C, Bisen P. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Current pharmaceutical biotechnology. 2006; 7(1): 33-49.
12. Angelova Z, Georgiev S, Roos W. Elicitation of plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2006; 20: 72-83.
13. Odjakova M, Hadjiivanova C. The complexity of pathogen defense in plants. Bulg J Plant Physiol. 2001; 27(1-2): 101-109.
14. Khodayari M, Omid M, Shahnejat Bushehri AA, Yazdani D, Naghavi MR, Kadkhoda Z. Effect of a biotic elicitor and nano elicitor on some alkaloids production in *Papaver somniferum* L. Iranian Journal of Horticultural Science. 2015; 45: 287-295.
15. Hazrati Jahan R, Zare N, Dezhsetan S, Sheikhzadeh Mosaddeg P. Enhanced Taxol production in cell suspension cultures of
16. Parsa M, Zeinali A. Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L. Scientific Journal Management System. 2016; 32(4): 655-666.
17. Riahi-Madvar A, Yousefi K, Nasiri-Bezenjani M. Positive effect of Cu and yeast extract elicitors on the content of rosmarinic acid in *Melissa officinalis* L. Scientific Journal Management System. 2014; 30: 714-723.
18. Kheiry A, Tori H, Mortazavi N. Effects of drought stress and jasmonic acid elicitors on morphological and phytochemical characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.). Scientific Journal Management System. 2017; 33(2): 268-280.
19. Park S-U, Yu M, Facchini PJ. Modulation of berberine bridge enzyme levels in transgenic root cultures of California poppy alters the accumulation of benzophenanthridine alkaloids. Plant molecular biology. 2003; 51(2): 153-164.
20. Zaker A, Sykora C, Gössnitzer F, Abrishamchi P, Asili J, Mousavi SH, Wawrosch C. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. Industrial Crops and Products. 2015; 67: 97-102.

21. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*. 2005; 91(3): 571-577.
22. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*. 2002; 10(3): 178-182.
23. Moghaddasian B, Eradatmand Asli D, Alaghemand A. Quantitative analysis of quercetin in different parts of *Capparis spinosa* by HPLC. *Ann Biol Res*. 2012; 3(9): 5775-5778.
24. Mehrabi AA, Omidi M, Seied-Tabatabaei BE. Invitro Culture and Effects of Explants Coculturing in Canola (*Brassica Napus L.*). *Iranian Journal of Agriculture Science*. 2002; 33: 627-635
25. Reis E, Batista MT, Canhoto JM. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. *Protoplasma*. 2008; 232(3-4): 193-202.
26. Sobhanizadeh A, Solouki M, Fazeli Nasab B. Kinetin impact on the growth rate of Black Cumin under salt stress. *Second International Conference on Agriculture, Natural Resources, Environment and medicinal plants, Iran*. 2016.
27. Taha H, El-Bahr M, Seif-El-Nasr M. In vitro studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. IV: manipulation of some amino acids as precursors for enhanced of indole alkaloids production in suspension cultures. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009; 3(4): 3137-3144.
28. Malik KA, Saxena PK. Regeneration in *Phaseolus vulgaris L.* Promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. *Planta*. 1991; 184: 148-150.
29. Amiri H, Fahimi H. The effect of different concentrations of potassium salt tolerance bean in tissue culture. *Science Journal of Tehran University*. 2003; 29: 320-326.
30. Ahmed EE, Bisztray G, Velich I. Plant regeneration from seedling explants of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Acta Biologica Szegediensis*. 2002; 46(3-4): 27-28.
31. El-Shemy HA, Khalafalla M, Wakasa K, Ishimoto M. Reproducible transformation in two grain legumes-soybean and azuki bean-using different systems. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2002; 7(1): 709-720.
32. Veltecheva M, Svetleva D, Pet kova SP, Perl A. In vitro regeneration and genetic transformation of common bean. *Scientia Horticulturae*. 2005; 107(1): 2-10.
33. Stefaniak B, Woźny A, Li V. Plant micropropagation and callus induction of some annual *Salsola* species. *Biologia plantarum*. 2003; 46(2): 305-308.
34. Khawar K, Sarhin E, Sevimay C, Cocu S, Parmaksiz I, Uranbey S, Ipek A, Kaya M, Sancak C, Ozcan S. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata L.* *Periodicum Biologorum*. 2005; 107(1): 113-116.
35. Neibaur I, Gallo M, Altpeter F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum Swartz*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2008; 44: 480.
36. Schultz W, Hose S, AbonMandou RA, Czygan FC. *Melissa officinalis L.* (Lemon balm), Invitro culture and the production and analysis of volatile compounds. *Biotechnology in agriculture and forestry*. 1990; 24: 242.
37. Karami M, Bagherieh-Najjar MB, Aghdasi M. Optimization of conditions suitable for bean (*Phaseolus vulgaris L.*) regeneration. *Journal of Plant Biology*. 2013; 5(15): 1-14.
38. Shahadati-Moghadam Z. Plant growth regulators. master's seminar, the University of Mazandaran. 2001: 2.
39. Aniel Kumar O, Subba Tata S, Rupavati T. In Vitro Induction of Callusogenesis in Chili Peppers (*Capsicum Annuum L.*). *International Journal of Current Research*. 2010; 3: 42-45.
40. Soltani pol MM, Mohammadi A, Rahnama H, Abbaszadeh B. Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis L.*). *Journal of agronomy and plant breeding*. 2011; 7: 45-54.
41. Amini F, Ganbarzade Z, Askary MM. Optimization of Callus production and Plant regeneration in *Salsola Aebuscula Pall.* *Jornal of Cell and Tissue*. 2013; 4: 129-137.
42. Elaleem KGA, Modawi RS, Khalafalla MM. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum L.*) cultivar Diamant. *African*

- journal of biotechnology. 2009; 8(11): 2529-2534.
43. JayaSree T, Pavan U, Ramesh M, Rao A, Reddy KJM, Sadanandam A. Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2001; 64(1): 13-17.
44. Ahmad N, Fazal H, Zamir R, Khalil SA, Abbasi BH. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Sugar tech*. 2011; 13(2): 174-177.
45. Hohtola A. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. *Plant cell, tissue and organ culture*. 1988; 15(3): 211-222.
46. Hussain Z, Khan MH, Bano R, Rashid H, Chaudhry Z. Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. *Pak J Bot*. 2010;42(2): 879-887.
47. Piri Kh, Nazarian F. *Plant Tissue Culture*. Abu Ali Sina University Press. 2001: 352 Pages.
48. Gurel S, Gurel E, Kaya Z. Callus Development and Indirect Shoot Regeneration from Seedling Explants of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Cultured In Vitro. *Turkish Journal of Botany*. 2001; 25: 25-33.
49. Saravanan S, Nadarajan N. Effect of Media Supplements on in vitro response of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Genotypes. *Res J Agric Biol Sci*. 2005; 1(1): 98-100.
50. Baskaran P, Jayabalan N. In vitro mass propagation and diverse callus orientation on *Sesamum indicum* L. an important oil plant. *Journal of Agricultural Technology*. 2006; 2(2): 259-269.
51. Rodriguez R. Callus Induction and Root-Formation from Invitro Culture of Walnut Cotyledons. *HortScience*. 1982; 17: 195-196.
52. Chaar M, Pinker I, Grieger P, Böhme M. The Effect of Flower Bud Size and Pre-Treatment on Callus Induction and Plant Regeneration in Anther Culture of *Petunia* 'Purple Wave'. VII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 9612011. p. 375-382.
53. Abbasi BH, Saxena PK, Murch SJ, Liu C-Z. Echinacea biotechnology: challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2007; 43(6): 481-492.
54. Murashige T. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. *Plant Growth Substances 1979*: Springer; 1980. p. 426-434.
55. Ehsanpoor A, Amini F. *Plant cell tissue culture*. Iranian Academic Center For Education, Isfahan Branch. 2003: 80-81.
56. Zhang H-X, Zeevaart J. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant cell reports*. 1999; 18(7-8): 640-645.
57. George, E.F, Hall M.A, De Klerk G-J. *Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background*: Springer Science & Business Media; 2007.
58. Khoshbakhat T, Bahadori F, Khalighi A, Ardalan MM. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on the macro elements and performance aloe vera plant in a greenhouse. *Journal of Crop Physiology, Islamic Azad University Ahvaz*. 2012; 2: 45-59.
59. Yousefi K, Riahi Madvar A, A B. Effect of flavone synthase gene expression and elicitor silver and copper on some biochemical parameters in seedlings of native Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L). *Journal of Plant (Iranian Journal of Biology)*. 2016; 28: 210-223.
60. Babu TS, Akhtar TA, Lampi MA, Tripuranthakam S, Dixon DG, Greenberg BM. Similar stress responses are elicited by copper and ultraviolet radiation in the aquatic plant *Lemna gibba*: implication of reactive oxygen species as common signals. *Plant and cell physiology*. 2003; 44(12): 1320-1329.
61. Saboura A, Ahmadi A, Zeynali A, Parsa M. Comparison Between the Contents of Phenolic and Flavonoid Compounds and Aerial Part Antioxidant Activity in *Scutellaria pinnatifida* in Two NorthIranian Populations. *Journal of Rafsanjan University Medical Science*. 2014; 13(3): 249-266.
62. Kamalizadeh M, Bihamta MR, Peyghambari SA, J H. Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Dragonhead Affected by Nanoparticles. *Genetics in the third millennium*. 2014; 12: 3428-3437.
63. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants "a review ". *Biotechnology advances*. 2008; 26(6): 548-560.

64. Jeandet P, Delaunois B, Aziz A, Donnez D, Vasserot Y, Cordelier S, Courrot E. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *Journal of BioMed Research*. 2012; 2012.
65. Zhang Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004; 555(1-2): 173-190.
66. Asghari G, Mostaejer A, Sadeghi Ali Abadi H, Nakhaee A. Effect of silver nitrate and salicylic acid on taxol production at the plant *Taxus baccata* L. *Journal of Medicinal Plants*. 2009; 5: 74-78.
67. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*. 2009; 86(3): 215-223.
68. yousefi k, riahi a, baghizadeh a. Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic from Iran. *Journal of Plant Researches*. 2015; 28(1): 210-223.
69. Jin JH, Shin JH, Kim JH, Chung IS, Lee HJ. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinone colorants in madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1999; 4: 300.
70. Chang JH, Shin JH, Chung IS, Lee HJ. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology letters*. 1998; 20(12): 1097-1099.
71. Namdeo A. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*. 2007; 1(1): 69-79.
72. Naguib AE-MM, El-Baz FK, Salama ZA, Hanaa HAEB, Ali HF, Gaafar AA. Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of Broccoli (*Brassica oleracea*, var. *Italica*) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2012; 11(2): 135-142.
73. Gil ES, Couto RO. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013; 23(3): 542-558.
74. Farrow SC, Facchini PJ. Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe (II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Front Plant Sci*. 2014; 5: 524.
75. Yang F, Hong F, You W, Liu C, Gao F, Wu C, Yang P. Influence of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol Trace Elem Res*. 2006; 110(2): 179-190.
76. Tran QH, Le A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2013; 4(3): 033001.
77. Khodayari M, Omidi M, Shah Nejat Bushehri A, Yazdani D, Naqvi MR, Kadkhoda Z. Effect biological elicitor and nano elicitor on increasing the production of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum*). *Iranian Horticultural Science*. 2015; 45: 287-295.
78. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*. 2005; 23: 283-333.
79. Naoumkina M, Farag MA, Sumner LW, Tang Y, Liu C-J, Dixon RA. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(46): 17909-17915.
80. Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar G. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*. 2006; 41(1): 50-60.
81. Amouoghli-Tabrizi B, Mohajeri D. Protective effect of turnip root ethanolic extract on early diabetic nephropathy in the rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2011; 13(6): 13-19.
82. Merfort I, Wray V, Barakat H, Hussein S, Nawwar M, Willuhn G. Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. 1997; 46(4): 359-363.
83. Merfort I, Wray V, Barakat H, Hussein S, Nawwar M, Willuhn G. Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. 1997; 46(4): 359-363.
84. Siapoush A, Ghasemi N, Asghari GR, Shams Ardekani MR. Quality and quantity evaluation of flavonoids in the aerial parts,

- flowers and fruits of *varthemia persica* (var. *persica*) DC. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2008; 18: 28-36.
85. Jaimand K, Ahrabi Asli H, Behrad Z. Extraction and determination of quercetin and kampferol in *Foeniculum vulgare* Mill. Scientific Journal Management System. 2013; 29: 681-691.
86. Jaimand K, Ahrabi Asli H, Monfared A. Extraction and Determination of Quercetin in *Achillea millefolium* L., *Achillea bieberstinuii* Afan. and *Achillea tenuifolia* Lam. Scientific Journal Management System. 2011; 27: 529-539.
87. Jaimand K, Rezaee MB, Asareh MH, Tabaei Aghdaei SR, Meshkizadeh S. Extraction and determination of Kaempferol and Quercetin in petals of 10 genotypes of *Rosa damascena* Mill. from western Iran. Scientific Journal Management System. 2010; 25: 547-555.
88. Ahankoub Ro M, Fattahi Moghadam J, Foutohi Ghazvini R. Identifying and assaying the quantity of flavonoid compounds in some citrus biotypes. Scientific Journal Management System. 2016; 32: 620-633.
89. Abraham F, Bhatt A, Keng CL, Indrayanto G, Sulaiman SF. Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of *Curcuma mangga* in vitro plantlets. African journal of biotechnology. 2011; 10(40): 7787-7795.

Optimization of Callus Induction and Effects of Biological and Non-biological Elicitors on Content of Phenol/ Flavonoid Compounds in *Nigella sativa* under In-Vitro Conditions

Ali Sobhanizadeh A, M.Sc.¹, Solouki M, Ph.D², Bahman Fazeli-Nasab B, , Ph.D^{3*}

1- M.Sc. of Plant Medicinal, Department Of Green Space Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Department Of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

3- Faculty Scientific member, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran

* Email corresponding author: Bfazeli@uoz.ac.ir

Received: 28 Jun. 2017

Accepted: 14 Nov Sep. 2017

Abstract

Aim: This study attempts to optimize callus induction and analyze of yeast extract and nano-silver elicitors on phenol/flavonoid content in black cumin under tissue culture conditions.

Material and Methods: The experiment was conducted a factorial design based on CRD with three replications. Factors included: explants (root, hypocotyledon, leaf and Cotyledon), 2, 4-D (1, 2, 4 and 8 Mg/L) and BAP (0.25, 0.5, and 1 Mg/L) in MS base medium. Elicitor's including yeast extract (100, 250 and 500 Mg/L) and nano-silver (30, 60 and 90 Mg/L) in two time (3 and 7 days) periods.

Results: The results showed that hypocotyledon explant and interaction effect of BAP (0.25 Mg/L) and 2, 4-D (4 Mg/L) were the most effective on the callus induction percent. Direct regeneration was caused by the root explant and the interaction effect of BAP (0.5 Mg/L) and 2, 4-D (1 Mg/L). The most effective treatment on the total phenol content was yeast extract (250 ppm) in a 7-day period. HPLC for quercetin (a flavonoid component) indicated that the most effective treatment was the interaction effect of nanoAg particles (30 Mg) and yeast extract (250 Mg) in a 3-day period.

Conclusion: The highest amount of callus induction is obtained from the hypocotyledon explants. The best direct regeneration is recorded in the root explants. To increase total phenol, it is necessary to use yeast extracts in a 7-day period and to increase flavonoids using the interaction effect of nano-silver (30 Mg) and yeast extract (250 Mg) over a 3-day period.

Keywords: Black Cumin, Yeast Extract, Tissue Culture, Secondary Metabolites, Nano-Silver