

بررسی اثر نانو کلات روی بر خصوصیات رویشی و بیان ژن‌های مؤثر بر سنتز تیمول و کارواکرول در آویشن (*Thymus vulgaris*)

The effect of zinc nanochlate on vegetative characteristics and expression of genes affecting synthesis on thymol and carvacrol in *Thymus (Thymus vulgaris)*

معروف خلیلی^{۱*}، فوزیه پاشائیان^۲، محمدعلی ابراهیمی^۱

۱- به‌ترتیب دانشیار، استاد، بخش بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران، ایران

Khalili M^{*1}, pashaiyan F², Ebrahimi MA¹

1- Associate Professor, Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Payame Noor University, Tehran, Iran

2- MSc Student, Department of Crop Science and Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: makhalily@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸)

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثر نانو کلات روی بر خصوصیات رویشی و بیان ژن‌های مؤثر بر سنتز تیمول و کارواکرول در آویشن انجام گرفت، طرح به‌صورت فاکتوریل در قابل طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بود. فاکتور اول دو رقم آویشن (آویشن دناپی و آویشن کوهی) و فاکتور دوم محلول پاشی نانو کلات روی در چهار سطح (صفر (شاهد)، ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد بالاترین محتوی کارتنوئید به سطوح ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر و بالاترین محتوی کاراکرول اسانس به سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات روی اختصاص داشت. نتایج مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل نشان داد هر دو رقم بالاترین عملکرد خشک بوته، محتوی کلروفیل a و b را در واکنش به محلول پاشی ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات روی نشان دادند، در این بررسی بالاترین محتوی تیمول اسانس در رقم آویشن کوهی در سطوح ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر و در رقم آویشن دناپی در سطح ۲/۵ و ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات روی ثبت شد. نتایج نشان داد اثر محلول پاشی نانو کلات روی بر مقدار بیان ژن‌های CYP71D180 و CYP71D178 در سطح احتمال یک درصد و بر مقدار بیان ژن‌های DXR و CYP71D180 در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. در این بررسی سطح ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو کلات روی مقدار بیان ژن DXR را در مقایسه با تیمار شاهد ۲۷/۳۶ درصد افزایش داد، همچنین محلول پاشی دو سطح ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر مقدار بیان ژن‌های گاماترپین سنتاز را به‌ترتیب ۵۱/۱۳ و ۲/۳۸ درصد، مقدار بیان ژن CYP71D180 را به‌ترتیب ۳۶/۳۱ و ۴۲/۲۸ درصد و بیان ژن CYP71D178 را به‌ترتیب درصد ۶۱/۷۰ و ۳۶/۳۴ درصد افزایش دادند.

واژه‌های کلیدی

اسانس

رقم

متابولیت

محلول پاشی

جنس آویشن (*Thymus L*) گیاهانی معطر با حدود ۲۱۵ گونه گیاهی چند ساله، با بوته‌های کوچک در سراسر دنیا می‌باشند. ناحیه مدیترانه می‌تواند به‌عنوان مرکز پراکنش این جنس در نظر گرفته شود. در فلور ایرانیکا ۱۴ گونه از این جنس در ایران نامبرده شده است که دو رقم آویشن دناپی و آویشن کوهی از جمله آن‌ها می‌باشند (GhasemiPirbaloutiet al. 2015). گیاه آویشن در شرایط آب و هوایی معتدل و متمایل به گرم و خشک و آفتابی رشد می‌کند. بیشترین ماده مؤثره این گیاه را در اوایل دوره گلدهی می‌توان جمع‌آوری کرد و سپس آن‌ها را در سایه یا در خشک‌کن با دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌کنند. سرشاخه‌های هوایی گیاه آویشن حاوی اسانس، فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، تانن‌ها و ساپونین‌ها می‌باشد. آویشن یکی از گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی است. این گیاه سرشار از تانن‌ها، پلی‌متوکسی فلاون‌ها، تریترین‌ها و پلی‌ساکاریدها می‌باشد. مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس آویشن تیمول و کارواکرول می‌باشد که دو منوترپن‌نویید هستند و تنها در تعداد محدودی از گونه‌های گیاهی از جمله آویشن باغی و دناپی وجود دارند. اسانس آویشن، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان بسیار قوی است. پلی‌متوکسی فلاون‌ها و منوترپن‌های موجود در این گیاه نیز دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد تشنجی، ضد التهاب و ضد سرفه هستند (Mozaffarian et al. 2013). تیمول یک منوترپن فنولی است که دارای سه گروه متیل، یک حلقه بنزنی و یگ گروه هیدروکسیل با فرمول شیمیایی $C_{10}H_{14}O$ می‌باشد (Crocoll et al. 2010). منوترپن‌ها از مسیر MEP (-4-methylerythritol 2-C-phosphat) سنتز می‌شوند در طی این مسیر که در پلاستید رخ می‌دهد ابتدا پیرووات (Pyruvate) و دی‌گلیسرآلدئید ۳- فسفات بایکدیگر ترکیب شده و پس از انجام واکنش‌های بیوشیمیایی لازم دیاکسی زایللو ۵-فسفات (Deoxyxylose-5-phosphate) به‌وجود می‌آید که این ترکیب نه تنها پیش ماده برای ایزوپرنوئیدها می‌باشد بلکه به‌عنوان کوفاکتور تیامین پیروفسفات و پیروودوکسال فسفات نیز به‌کار برده می‌شود (Julliard and Douce 1991; Julliard 1992). این ماده تحت تأثیر آنزیم DXR (-1-deoxy-D-)

تبدیل به دی‌اکسی زایللو ۵- فسفات بهی متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP)، (-2-C-methylerythritol-4-phosphate) می‌شود که در واقع اولین مرحله از مسیر MEP در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها می‌باشد (Rohmer et al. 1993) بنابراین DXR نقش مهمی در کنترل مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها در پلاستید دارد. پس از انجام واکنش‌های دیگر، ایزوپنتیل دی فسفات (Isopentenyl diphosphate) و دی متیل-آلیل دی فسفات (Dimethylallyl diphosphate) به‌وجود می‌آیند که این دو ماده قابلیت تبدیل به یکدیگر را دارند. در ادامه با ترکیب شدن این دو ماده و تحت تأثیر ژرانیل دی فسفات سنتاز (Geranyl diphosphate synthesis) و ژرانیل دی فسفات (Geranyl diphosphate) که پیشماده مونوترپن‌ها است به‌وجود می‌آید ژرانیل دی فسفات نیز تحت تأثیر آنزیم مونوترپن سنتاز به مونوترپن‌ها تبدیل می‌شود (Van Schieet et al. 2007; Lambert et al. 2011). مطالعه نحوه تنظیم این مسیر و شناسایی مراحل تأثیرگذار بر سرعت تولید این متابولیت‌های ارزشمند جزء اولین و مهمترین گام‌ها در جهت مهندسی متابولیت به‌منظور افزایش تولید می‌باشد. تحریک آنزیمی به‌کمک محرک‌ها یکی از این روش‌هاست. محرک‌ها ترکیب‌هایی با منشأ زیستی و یا غیرزیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al. 2007) بنابراین می‌توان گفت که ایسیتورها با تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های اولیه که در انتقالات واکونلی نقش دارند، می‌توانند موجب تنظیم سطح متابولیت‌های ثانویه شوند. به‌عبارتی، نقل و انتقالات و ذخیره متابولیت‌های اولیه، نقش مهمی در تولید ترکیب‌های ارزشمند ایفا کنند (Farkyaet al. 2004). لازم به ذکر است که این محرک‌ها در شرایط طبیعی نیز بر گیاه تأثیر گذاشته و باعث تولید یک متابولیت خاص می‌شوند. یکی از انواع دیگر این محرک‌های غیر زنده که به تازگی مورد استفاده قرار گرفته است، نانوذرات می‌باشد. این ذرات از مهم‌ترین ابزارهای نانوتکنولوژی هستند که کاربردهای فراوانی در علوم زیستی دارند. در مقایسه این ذرات با اجزای زیستی طبیعی، باید به قطر معمول ۱۰

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز مهاباد به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار به صورت کشت در گلدان در سال ۱۳۹۹-۱۳۹۸ انجام شد. طرح به صورت فاکتوریل در قابل طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بود. فاکتور اول دو رقم آویشن (آویشن دنیایی و آویشن کوهی) و فاکتور دوم محلول پاشی نانو کلات روی در چهار سطح (صفر (شاهد)، ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ میلی گرم در لیتر) بود. خاک مورد نظر بر اساس تحقیقات حاوی کوکویت و پرلایت به نسبت ۱ به ۳ (۳:۱) تهیه شد. در این مطالعه بذر دو رقم آویشن دنیایی و آویشن کوهی از پژوهشکده گیاهان دارویی کشور تهیه شده و در سینی نشاء و در شرایط گلخانه در آذرماه ۱۳۹۸ اقدام به تولید نشاء شد. پس از کاشت بذر، در بهمن ماه سال ۱۳۹۸ گیاهچه‌های همسان و هم‌اندازه آویشن باغی با ریشه مناسب و کیفیت مطلوب رشدی در به گلدان‌ها انتقال داده شدند. برای حفظ وضعیت بوته‌ها در حد مطلوب نیز، عملیات زراعی بر اساس نیاز گیاهان به‌طور یکسان در هر تیمار اعمال شد.

محلول پاشی نانوکلات روی بر اساس دستورالعمل توصیه شده شرکت سازنده (دانش بنیان صدور احراز شرق) با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲/۵، ۳/۵ و ۴/۵ میلی گرم در لیتر قبل از گلدهی استفاده شد، جهت جلوگیری از سوختگی برگ‌ها، محلول پاشی هنگام غروب آفتاب انجام شده برای حذف اثرات محلول پاشی در شاهد، هم‌زمان اقدام به آب پاشی آن‌ها خواهد شد.

برداشت بوته‌ها به منظور استخراج و اندازه‌گیری درصد تیمول و کاراکرول موجود در اسانس در مرحله قبل از گلدهی انجام شد. برای اندازه‌گیری ترکیبات اسانس از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده به دستگاه HPLC مدل (KNAUER-Germany) تزریق شد. این دستگاه مجهز به دکتور UV مدل ۲۵۰۱ K و ستون C 18 (Vertex) دارای اندازه ذرات ۵ میکرولیتر طول ۲۵۰ میلی لیتر و قطر ۴ میلی متر بود. اندازه‌گیری تیمول و کاراکرول در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. جهت آنالیز کمی ترکیبات، با تزریق محلول‌های استاندارد با غلظت‌های معین و به دست آوردن سطح زیر پیک هر کدام منحنی کالیبراسیون مربوط به هر ترکیب

میکرومتری سلول اشاره کرد و اجزای آن که عمدتاً در محدوده زیرمیکرون قرار دارند (Salata et al. 2004).

Fallahi et al. (2016) در بررسی اثر محلول پاشی منابع مختلف روی بر عملکرد و ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه ریحان نشان دادند با کاربرد روی عملکرد پیکر رویشی تر و خشک، محتوای روی و فنول برگ‌ها و درصد و عملکرد اسانس افزایش یافت و از این نظر کاربرد برگی نانوکود کلات روی مؤثرتر از دو کود دیگر روی بود. در بررسی تاثیر نانوذرات روی و کبات بر بیان ژن‌های DAT، STR، D4H و دروسپانسیون سلولی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)، تاثیر نانو اکسید روی بر بیان ژن‌ها بیشتر از نانو اکسید کبات بود. در مورد ژن STR و D4H بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر و برای ژن DAT غلظت یک میلی گرم در لیتر نانو اکسید روی در بازه زمانی ۸ ساعت بود. در این مطالعه نانو اکسید کبات در اکثر غلظت‌ها و بازه‌های زمانی مورد استفاده باعث کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی شد (Rezaee et al. 2017). در مطالعه اثر برخی نانوذرات بر بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) در گیاه بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) تحت تنش کم‌آبی موسوی و همکاران (Mousavi et al. 2017) افزایش معنی داری در بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) در گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره سنتز سبز نسبت به گیاهان شاهد، گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره سنتز شیمیایی و نانو کلات آهن مشاهده کردند آن‌ها بیشترین بیان ژن‌های جرماکرن A سنتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتاز (TpPTS) را در گیاهانی که تحت تنش خشکی و تیمار با نانوذرات نقره سنتز سبز قرار گرفته بودند گزارش کردند. یکی از راه‌های افزایش سنتز محتوی اسانس در آویشن قرار گرفتن در شرایط تنش محیطی است، تنش‌های محیطی اگر چه موجب افزایش محتوی اسانس می‌شوند اما در نهایت عملکرد نهایی اسانس را کاهش خواهند داد، این مطالعه با هدف بررسی اثر بررسی اثر نانو کلات بر محتوای تیمول و کاراکرول اسانس و بیان ژن‌های مؤثر بر سنتز بر تیمول و کاراکرول در آویشن انجام گرفت.

تهیه پلیت لازم جهت انجام واکنش PCR مواد مورد استفاده مطابق (جدول ۱) با یکدیگر مخلوط شدند در این آزمایش حجم نهایی واکنش ۱۵ µl در نظر گرفته شد. جهت بهینه نمودن دمای اتصال آغازگرها از روش Gradient PCR استفاده شد. لازم به ذکر است که برای تأیید درستی cDNA سنتز شده با استفاده از PCR از ژن کنترل (18 srRNA) در همه نمونه‌ها استفاده شد. جهت واکنش کنترل از بدون الگو (NTC) به جای cDNA، آب، MQ استفاده شد. در مرحله بعد به پلیت ۴۸ چاهکی با توجه به نقشه ۱۵ µl از مخلوط واکنش اضافه شد. واکنش تکثیر تصادفی این ژن‌ها به صورت ۱۰ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه و ۴۰ چرخه (با دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آنزیمی به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. جهت حصول اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرهای استفاده شده در تکثیر ژن‌ها از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد. لیست آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه جهت دستیابی به توالی‌های ژنی مورد نظر در جدول ۲ قید شده است.

برای نرمال‌سازی داده‌های بیان ژن از ژن کنترلی داخلی (18 SrRNA) استفاده شد. میزان بیان نسبی ژن با استفاده از سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی (RNA) محاسبه شدند. در این مطالعه برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن از روش $\Delta\Delta Ct$ استفاده شد، که مطابق رابطه (۱) است (Schmittgen and Livak 2008)

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - (\Delta Ct_{\text{کنترل داخلی}})$$

جدول ۱- مواد شیمیایی و مقادیر مورد استفاده در واکنش Time Real PCR

ماده شیمیایی	مقدار استفاده شده	غلظت نهایی
cDNA	۲ میکرولیتر	۵۰ نانوگرم در میکرولیتر
SYBR premix 5x	۳ میکرولیتر	1X
Primer F	۰/۸ میکرولیتر	۰/۵ میکرومول
Primer R	۰/۸ میکرولیتر	۰/۵ میکرومول
ddH2O	۱۵ میکرولیتر	-

رسم شد و با استفاده از معادله خطی منحنی کالیبراسیون، میزان کلی هرکدام از مواد مورد نظر در عصارها تعیین شد. برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a و b و کل از روش (Arnon 1949) و برای اندازه‌گیری کارتنوئید از روش Lichtenthaler (1987) استفاده شد.

در مرحله برداشت نمونه‌ها به صورت جداگانه در پاکت کاغذی قرار داده شد و پس از خشک کردن در سایه، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند. وزن خشک نمونه‌ها دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری و ثبت شدند.

در این مطالعه از روش ترایزول برای استخراج RNA از بافت برگ و گل آویشن استفاده شد (Chomczynski and Sacchi 1987)، جهت جلوگیری از آلودگی ناشی از DNA در نمونه‌ها با تیمار DNase I تیمار شدند. در این روش مقادیر ۱ µl از ۵ µg/µl نمونه RNA، ۱/۵ µl از بافر ۱۰X DNase، ۱/۵ µl آنزیم DNase I (1U/µl) (Fermentase, USA) پس از اینکه با یکدیگر مخلوط شدند به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت غیر فعال کردن و حذف آنزیم DNase I مقدار ۲ میکرولیتر EDTA در غلظت ۵۰ mM اضافه شده و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. جهت تعیین میزان کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز یک درصد و خوانش در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ با دستگاه NanoDrop (ThermoScientific 2000c USA) استفاده شد. جهت سنتز cDNA از ۱ µg RNA خالص‌سازی شد همراه با آغازگرهای الیگو T و هگزامرهای تصادفی توسط آنزیم (Reverse transcriptase) استفاده شد. جهت انجام این واکنش در مرحله نخست آغازگرها، RNA و آب DEPC با یکدیگر مخلوط شده و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس این مدت زمان بلافاصله به سطح یخ انتقال داده شدند. سپس مخلوط آنزیم و بافر به نمونه‌ها اضافه شده و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. جهت غیرفعال نمودن آنزیم RT نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. مقدار ۱ µl از هر واکنش برای انجام آزمایش در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مراحل

کلات روی نیز بر تعداد شاخه فرعی، طول ریشه، محتوی کلروفیل a و b، کارتنوئید و محتوی تیمول در سطح احتمال یک درصد و بر محتوی کاراکرول در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود. نتایج همچنین نشان داد بین تیمارهای اثر متقابل رقم در محلول پاشی از نظر عملکرد خشک بوته، محتوی کلروفیل a و b در سطح احتمال یک درصد و از نظر محتوی تیمول در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول ۳).

آنالیز داده‌ها حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها اختلاف بین دو رقم از لحاظ صفات مورد بررسی معنی دار نبود، اثر محلول پاشی نانو

جدول شماره ۲ - اطلاعات مربوط به آغازگرهای طراحی شده برای ژن جهت واکنش

آغازگر	(3' - 5') توالی	Tm	Amplicon size (bp)
DXr-F	TATGACTTCGAGGCCCTTGTTAAAGAG	62	195
DXr-R	TGTATCCAAGGCTTGCCAGAAGG	62	195
HMGR-F	CCCTCTACCTCACCAACGGAGTC	63	179
HMGR-R	CGAAGAAGCCGAGGAGATAGATGAAGG`	63	179
TPS1-F	GAGGGAAGGCGAAAACACAC	56	140
TPS1-R	TCCAGTGAAGAGGGAGATCC	55	140
18s-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC	59	191
18s-R	GCCTCATCATCATACTTCTCTCATCATC	60	191

جدول ۳- میانگین مربعات صفات مرتبط با خصوصیات رویشی در آویشن

رقم	درجه آزادی	ارتفاع بوته	عملکرد خشک بوته	میانگین مربعات			
				کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	محتوی تیمول
۱	۲۵۸۳۵ ^{ns}	۲۷۳۰۷ ^{ns}	۰/۰۰۰۱۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۴۶ ^{ns}	۰/۰۱۹ ^{ns}	۰/۰۴۸ ^{ns}	۱/۰۰۶ ^{ns}
۳	۳۰/۱ ^o	۵۴۷۷/۲۰ ^o	۰/۰۰۰۷۰ ^o	۰/۰۱۶۴ ^o	۰/۱۳۴ ^o	۱۱/۳۶ ^o	۱/۲۹ ^o
۳	۴۳/۴۷ ^o	۱۰۳۸/۵۵ ^o	۰/۰۰۲۱ ^o	۰/۰۰۰۶ ^o	۰/۰۲۹ ^{ns}	۳/۶۳ ^o	۰/۵۵ ^{ns}
۱۶	۶/۸۹	۲۳۶/۸۶	۰/۰۰۰۳۰	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۲۰	۱/۰۴	۰/۳۱۲
ضریب تغییرات (درصد)	۱۴/۰۷	۱۳/۷۵	۸/۹۶	۱۴/۶۴	۱۲/۱۲	۸/۶۴	۹/۱۱

ns، * و ** به ترتیب عدم معنی داری و معنی داری در سطح احتمال پنج و یک درصد آماری

جدول ۴- مقایسه میانگین تیمارهای اثر متقابل رقم با محلول پاشی نانو کلات روی از لحاظ اثر بر صفات مورد بررسی

رقم	نانو کلات روی (میلی گرم / لیتر)	عملکرد خشک بوته (گرم)	کلروفیل a (میلی گرم در گرم ماده خشک)	کلروفیل b (میلی گرم در گرم ماده خشک)	محتوی تیمول (میلی گرم در گرم ماده خشک)
شاهد	۷۸۳۶d	۰/۱۲۴d	۰/۱۱c	۱۰/۰ode	شاهد
آویشن	۶۸۱۸d	۰/۲۳۹ab	۰/۲۰۹ab	۱۲/۳۴abc	۲/۵
کوهی	۱۴۷/۴a	۰/۲۱۳ab	۰/۲۴۹a	۱۳/۱۲ab	۳/۵
۴/۵	۱۰۹/۹۲bc	۰/۱۹۷b	۰/۱۲۶c	۱۱/۱۸cde	۴/۵
شاهد	۷۲/۹۹d	۰/۱۶۵c	۰/۱۰۷c	۹/۳۶e	شاهد
آویشن	۹۴/۴۸cd	۰/۱۹۱bc	۰/۱۲۷c	۱۳/۶۸a	۲/۵
دنبلی	۱۲۲/۹۲ab	۰/۲۱۹ab	۰/۲۲۸ab	۱۱/۵۶bcd	۳/۵
۴/۵	۱۴۰/۵۱a	۰/۲۱۷ab	۰/۲۰۲b	۱۲/۹۶ab	۴/۵

میانگین دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد هستند.

را با کاربرد نانو ذرات اکسید روی با غلظت یک گرم در لیتر در گیاه بادامزمینی را گزارش کردند. همچنین در آزمایشی دیگر در گیاه دارویی آنیسون گزارش شد که غلظت ۶ گرم در لیتر سولفات روی، میزان کلروفیل a, b, b+a و کاروتنوئید را افزایش داده است (Pirzad et al. 2013). عنصر روی برای سنتز پیش ماده تولید کلروفیل لازم می‌باشد. بنابراین در حضور روی، تشکیل کلروفیل تسهیل می‌شود (Said Al-Ahl and Mahmoud 2010). (2012) Weisanyet al. گزارش کردند که روی موجب افزایش معنی‌دار پارامترهای فتوسنتزی و محتوای کلروفیل می‌شود. Moghimi pour et al. (2017) در مطالعه‌ای بر روی گیاه ریحان مقدس بالاترین مقدار کلروفیل a را در سطح ۱/۵ گرم در لیتر نانو کلات روی گزارش کردند.

در بررسی حاضر اگرچه محلول پاشی ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر در رقم آویشن کوهی با متوسط ۱۴۷/۴۶ گرم بالاترین وزن خشک بوته را به خود اختصاص داد، اما اختلاف بین تیمار مذکور و تیمارهای محلول پاشی ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر در رقم آویشن دناپی و محلول پاشی ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر در آویشن کوهی اختلاف معنی‌دار دیده نشد، در این بررسی بین تیمار محلول پاشی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات روی و تیمار شاهد در هر دو رقم اختلاف معنی‌دار دیده نشد و تیمارهای مذکور کمترین عملکرد خشک بوته را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). افزایش عملکرد خشک بوته با مصرف عنصر روی علل مختلفی می‌تواند داشته باشد که از آن جمله می‌توان به افزایش بیوسنتز اکسین، افزایش فتوسنتز در نتیجه افزایش غلظت کلروفیل، افزایش فعالیت فسفوانول پیروات کربوکسیلاز و ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز در بافت‌های گیاهی و نیز افزایش کارایی جذب نیتروژن و فسفر اشاره نمود (Nateghiet al. 2015). نانوذرات به دلیل جذب بیشتر آن‌ها توسط گیاه که ناشی از اندازه کوچک و نفوذ بسیار بالای آن‌ها از طریق غشاهای سلولی مورد توجه بسیار قرار گرفته است. با توجه به قطر نانوذرات انتظار می‌رود که سرعت جذب، انتقال و تجمع این گونه ذرات بسیار بیشتر از ذرات معمولی باشد. البته بالا بودن کارایی جذب و سطح مخصوص نانوذرات در مقایسه با ذرات معمولی، می‌تواند اثرگذاری بیشتر این ذرات را توجیه کند

در این بررسی اگر چه بالاترین محتوی کلروفیل با متوسط ۰/۲۳۹ میلی‌گرم بر گرم به محلول پاشی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر نانو کلات روی در رقم آویشن کوهی اختصاص داشت اما اختلاف بین تیمار مذکور و تیمارهای کاربرد ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر در هر دو رقم آویشن و استفاده از ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر در رقم آویشن دناپی اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۴). نتایج نشان داد تیمار عدم محلول پاشی در رقم آویشن کوهی با متوسط ۰/۱۲۴ میلی‌گرم بر گرم کمترین محتوی کلروفیل a را به خود اختصاص داد. در این آزمایش بالاترین محتوی کلروفیل b در هر دو رقم به کاربرد سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر و کمترین مقدار به تیمار عدم کاربرد نانو کلات اختصاص داشت (جدول ۴). مقایسه میانگین سطوح نانوکلات روی از لحاظ اثر بر محتوی کاروتنوئید نیز نشان داد با افزایش غلظت این ماده بر محتوی کاروتنوئید افزوده شد به نحوی که سطح ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر با متوسط ۱/۳۱ میلی‌گرم در گرم بالاترین و تیمار عدم محلول پاشی با متوسط ۰/۹۷۶ میلی‌گرم در گرم کمترین محتوی کاروتنوئید را به خود اختصاص داد (شکل ۱).

اظهار شده است عنصر روی از طریق اتصال به گروه سولفیدریل باعث استحکام آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و ساختمان چربی غشاء سلول می‌شود. روی از طریق محافظت از گروه سولفیدریل باعث سنتز کلروفیل می‌شود. پورفووبیلینوژن پیش ماده کلروفیل می‌باشد که برای تشکیل این ماده منیزیم و روی مورد نیاز است. در مجموع حضور عنصر روی موجب حفظ، تشکیل و تکمیل کلروفیل می‌شود (Powell 2000) با توجه به اینکه میزان کلروفیل در واحد سطح برگ شاخص مناسبی از فتوسنتز و تولید در گیاه است بنابراین با افزایش غلظت عنصر روی تا حد زیر سمیت، رنگیزه‌های فتوسنتزی و فتوسنتز در گیاه افزایش می‌یابد (Azizi et al. 2011). عنصر روی با دخالت در تنظیم غلظت‌های سیتوپلاسمی عناصر، نقش کلیدی در بیوسنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل و کاروتنوئید دارد. در نتیجه، این عنصر برای دستگاه سیستم فتوسنتزی گیاه مطلوب است (Hafeez et al. 2013). (Prasad and Sudhakar 2012) افزایش کلروفیل، استقرار بهتر گیاهچه، افزایش فتوسنتز و نهایتاً افزایش در عملکرد

کنترل می‌شود (Figueiredo et al. 2011). وضعیت حاصل‌خیزی خاک، قابل دسترس بودن عناصر کم‌مصرف و پرمصرف و مدیریت تغذیه و کوددهی جزء عوامل مهم تأثیرگذار بر کمیت و کیفیت اسانس‌ها هستند و در این میان نقش عناصر کم‌مصرف مانند روی محتوی متابولیت‌های اولیه و متابولیسم ساکارز و ارتباط آن‌ها می‌تواند بسیار تعیین‌کننده باشد. تثبیت دیاکسید کربن، ارتباط نزدیکی با تولید و انباشت اسانس دارند. از آنجایی که عنصر روی در سنتز پروتئین‌ها، فتوسنتز و متابولیسم ساکاریدها نقش دارد و نیز با توجه به اینکه دی‌اکسید کربن و گلوکز مهمترین منابع کربن و انرژی مورد استفاده در بیوسنتز ترپن‌ها هستند، از این رو نقش روی در تولید و تجمع اسانس بسیار مهم و اساسی است (Srivastava et al. 1997). Fallahi et al. (2016) گزارش کردند بالاترین محتوی اسانس در گیاه ریحان به تیمار نانو کلات روی اختصاص داشت که اختلاف معنی‌داری با کاربرد سولفات روی و کلات روی داشت، آن‌ها همچنین نشان دادند با افزایش غلظت روی مقدار اسانس نیز افزایش نشان داد.

Yadegari (2015) در بررسی اثر محلول پاشی عناصر ریز مغذی بر درصد اسانس گیاهان دارویی آویشن، گل گاو زبان و گل همیشه بهار نشان دادند محلول پاشی عناصر روی، آهن و منگنز مقدار اسانس استخراجی از این گیاهان دارویی را به صورت معنی‌داری افزایش دادند. در مطالعه Asle Mohammadi et al. (2020) محلول پاشی روی اثر معنی‌داری بر افزایش محتوی تیمول در آویشن داشت که همسو با نتایج مطالعه حاضر است.

در مطالعه حاضر کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانول کلات روی با متوسط ۴/۳۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک کمترین محتوی کاراکرول را به خود اختصاص داد، هر چند بین تیمار مذکور و تیمار محلول پاشی ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر از نظر محتوی کاراکرول اختلاف معنی‌دار دیده نشد. در این بررسی کمترین محتوی کاراکرول به ترتیب با متوسط ۳/۲۹ و ۳/۳۴ به تیمار محلول پاشی ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد اختصاص یافت (شکل ۲). بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش افزایش میزان کود مصرفی از یک حد خاصی، موجب کاهش کاراکرول در اسانس در این گیاه شد، علت این امر احتمالاً ناشی از تحریک تولید مواد

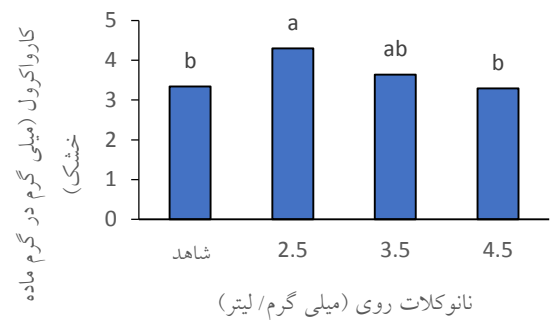
(Monica and Cremonini 2009). گزارش‌های علمی مختلف تأییدکننده این فرضیه هستند که ورود نانوذرات در سلول‌های گیاهی از طریق روزنه‌های باز و نانو منافذ طبیعی موجود انجام می‌شود که ممکن است باعث افزایش فعالیت‌های متابولیکی سلول‌های گیاهی و در نتیجه تولید محصول بیشتر شوند (Tarafdaret al. 2014). اثرات کاربرد نانو اکسید روی در افزایش رشد نخود فرنگی (Pandey et al. 2010)، رشد و بیوماس گوجه فرنگی (Panwar et al. 2012)، رشد و غلظت روی در برگ و دانه بادام‌زمینی (Prasad et al. 2012)، و کلروفیل، پروتئین، بیوماس خشک گیاه، عملکرد دانه و غلظت روی در ارزن (Tarafdaret al. 2014) نیز گزارش شده است. تحقیقات انجام گرفته اثر مثبت محلول پاشی عنصر روی را بر روی گیاهان دارویی نشان داده است. سعید الاهل و محمود نشان دادند محلول پاشی کلات روی در شرایط تنش شوری موجب تعدیل اثر تنش شوری بر گیاه شده و وزن تر و خشک اندام هوایی را افزایش داده است. در مطالعه Moghimi pour et al. (2017) بر روی گیاه ریحان مقدس بالاترین وزن خشک اندام هوایی در این گیاه در سطح ۱/۵ گرم در لیتر مشاهده شد. Kumar et al. (2010) افزایش رشد و عملکرد پیکر رویشی گیاه نعنای را در اثر مصرف عناصر روی و گوگرد، به بهبود فعالیت‌های آنزیمی مختلف و سنتز بیشتر پروتئین‌ها نسبت دادند. Fallahi et al. (2016) در تحقیقی بر روی گیاه ریحان نشان دادند بالاترین عملکرد پیکر رویشی در تیمار کاربرد نانو کلات روی به دست آمد.

بر اساس نتایج مقایسات میانگین تیمارها محلول پاشی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات روی در رقم آویشن دنایی با متوسط ۱۳/۶۸ درصد بالاترین محتوی تیمول را به خود اختصاص داد. لازم به ذکر است که اختلاف بین تیمار مذکور و کاربرد ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات روی در رقم آویشن کوهی و کاربرد ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر در رقم آویشن دنایی اختلاف معنی‌داری از نظر محتوی تیمول وجود نداشت (جدول ۴). در این بررسی هر دو رقم کمترین محتوی تیمول را در تیمار عدم محلول پاشی به خود اختصاص دادند. ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس‌ها به وسیله عوامل مختلف مانند ژنتیک گیاه، شرایط اقلیمی و جغرافیایی و نیز عملیات کشاورزی و مدیریت کشت و پرورش

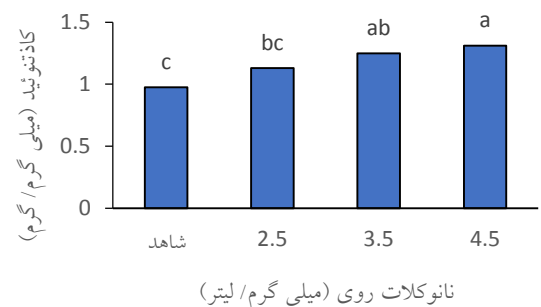
درصد و بر مقدار بیان ژن‌های DXR و CYP71D180 در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد بالاترین مقدار بیان ژن DXR به محلول‌پاشی سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اختصاص داشت، کمترین مقدار بیان این ژن برای تیمار عدم محلول‌پاشی ثبت شد. بین دیگر سطوح از لحاظ مقدار بیان ژن DXR اختلاف معنی‌داری دیده نشد (شکل ۳).

بررسی بیان ژن DXR و ارتباط آن با بیوسنتز مونوترپن کارواکروئول در گیاه مرزه خوزستانی نشان داد که سنتز کارواکروئول بطور عمده از مسیر MEP صورت می‌گیرد و آنزیم DXR در تنظیم بیوسنتز مونوترپن کارواکروئول نقش داشته و میزان فعالیت آنزیم مذکور در سطح نسخه‌برداری (Transcriptional regulation) ژن کنترل می‌شود (Ramak et al. 2014). در مطالعه تاثیر نانو ذرات کبات بر بیان ژن‌های DXR و GPPS در سوسپانسیون سلولی گیاه بومادران (*Achillea wilhelmsii*) (Mahmoudi et al. 2018) نشان دادند بیان ژن DXR در تمام غلظت‌های تیمار نانو اکسید کبات (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در بازه زمانی هشت ساعت افزایش بیان ژن را نشان داد. بیشترین بیان مربوط به غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر و پس از آن غلظت‌های یک و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود. تحقیق بر روی الگوی بیان ژن DXR در گیاه آویشن نشان داد DXR در بافت گل بیشتر از برگ است همچنین بیان این ژن با تیمار اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات، ترانس سینامیک و اشعه UV پس از ۲۴ ساعت افزایش نشان داده است (Malek Zadeh et al. 2015). در تحقیقات انجام شده بر روی بارهنگ چینی (*Salvia miltiorrhiza*) مشخص شد نشان داد که تیمار متیل جاسمونات بیان ژن DXR را حدود ۱۴ برابر افزایش داد (Yang et al. 2012) استفاده از تیمار متیل جاسمونات گیاه در گیاه *Withaniasomnifera* بیان ژن DXR در بافت برگ را به صورت معنی‌داری افزایش داد (Gupta et al. 2013). تحقیقات همچنین نشان داده است که گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) استفاده از تیمار متیل جاسمونات باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه با تأثیر بر ژن‌های ابتدای مسیر MEP شده است (Ruiz-May et al. 2009) هرچند نقش تنظیمی آنزیم DXR در بیوسنتز مونوترپن‌ها

اولیه در تیمارهای مربوط به مقادیر بالای مصرف کود در سوختگی برگ‌ها در اثر محلول‌پاشی باشد و این مسئله ممکن است بیان کننده محدودیت آویشن در استفاده از کود نانو کلات روی در جهت افزایش درصد باشد. در این زمینه (Hadaddi et al. 2016) در پژوهشی که روی گیاه دارویی بادرنجبویه انجام دادند به این نتیجه رسیدند که محلول‌پاشی برخی از عناصر ریزمغذی سبب افزایش درصد اسانس در این گیاه دارویی شده است. به هر حال نتایج این مطالعه نشان داد بهترین تیمار کودی جهت افزایش میزان اسانس کود سولفات روی ۵ در هزار می‌باشد. (2020) Hassani Moghadam et al. نشان دادند کاربرد کود سولفات روی با مقدار ۵ در هزار باعث افزایش میزان اسانس به مقدار ۰/۶۱ درصد شد در مطالعه آن‌ها کمترین مقدار اسانس مربوط به عدم کاربرد سولفات آهن و سولفات روی بود.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی سطوح نانو کلات روی بر محتوی کارتنوئید در آویشن



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی سطوح نانو کلات روی بر محتوی کاراکروئول در آویشن

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر محلول‌پاشی بر مقدار بیان ژن‌های CYP71D180 و CYP71D178 در سطح احتمال یک

از طریق فرآیندهای سیگنالی تولید مونوترپن‌های تیمول و کار و اکرول را افزایش داد.

در این بررسی اگر چه سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات نقره بالاترین مقدار بیان ژن CYP71D178 را به خود اختصاص داد اما اختلاف سطح مذکور و سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات نقره از نظر مقدار بیان ژن مذکور از لحاظ آماری معنی‌دار نبود، در این مطالعه کمترین مقدار بیان ژن به تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) اختصاص یافت (شکل ۶).

اخیراً اثر ذرات نانوالیستور در محیط‌های کشت به‌عنوان محرک و نیز بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز برخی متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفته است (RaeiBondarian et al. 2013 and Khodayari et al. 2013). کوچک بودن ذرات نانوالیستور نسبت به اندازه سلول، نفوذپذیری آن‌ها را به درون سلول آسانتر کرده و در نهایت توانسته است در حداقل زمان، سلول را وادار به افزایش بیان ژن در سلول‌های گیاهی و تولید حداکثر متابولیت کند (Tran and Le 2013). (Kamalizadeh et al. 2013) نشان دادند از نانوذره تیتانیوم تا غلظت ۳۰ ppm باعث افزایش میزان رزمارینیک اسید و نیز افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی این ترکیب به‌ویژه رزمارینیک اسید سنتتاز در گیاه بادرشبو شده‌است. در پژوهشی دیگر بر روی زیره سبز نشان داده شد که میزان بیان ژن I FNS در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار الیستور نقره به‌طور معنی‌دار نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است (Yousefiet al. 2015). (Mousavi et al. 2017) افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های جر ماکرن A سنتتاز (TpGAS) و پارتنولید سنتتاز (TpPTS) در گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره سنتز سبز نسبت به گیاهان شاهد، گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره سنتز شیمیایی و نانو کلات آهن مشاهده کردند. در بررسی تاثیر نانوذرات روی و کبالت بر بیان ژن‌های STR، DAT و D4H در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)، هر دو الیستور مورد استفاده بر بیان ژن‌ها تاثیر داشتند. تاثیر نانو اکسید روی بر بیان ژن‌ها بیشتر از نانو اکسید کبالت بود. در مورد ژن STR و D4H بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و برای ژن DAT غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید

بستگی به نوع گیاه، بافت و مرحله نمو دارد، اما گزارش‌هایی درخصوص تنظیم در سطح بیان این ژن و همبستگی مثبت میان بیان ژن DXR و تولید مونوترپن‌ها از مسیر MEP موجود دارد. در گیاه نعنا فلفلی، افزایش بیان ژن DXR سبب افزایش معنی‌دار بیوسنتز مونوترپن‌های موجود در اسانس شد و در مقابل، خاموش کردن جزئی (partial gene silencing) ژن DXR در این گیاه سبب کاهش شدید مونوترپن‌ها شد (Mahmoud and Croteau 2003).

ژن ترین سنتاز از جمله ژن‌های اصلی در مسیر بیوسنتز تیمول می‌باشد (Crocollet al. 2011). در این بررسی با افزایش سطح محلول پاشی از صفر (شاهد) به ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر مقدار بیان ژن گاماترپین سنتاز به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان داد و در سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر به بالاترین مقدار خود رسید، افزایش سطح محلول پاشی نانو کلات روی از ۳/۵ به ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت معنی‌داری از مقدار بیان ژن مذکور کاست (شکل ۴). از آنجایی که این ژن در مسیر بیوسنتزی تیمول قرار دارد لذا افزایش بیان این ژن می‌تواند بر مقدار تیمول تأثیرگذار باشد. در مطالعه Elyasiet al. (2015) که به بررسی الگوی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی مونوترپن‌ها و تری‌ترین‌ها تحت تأثیر تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه دارویی سیاه‌دانه پرداختند نشان دادند ژن‌های مونوترپن سنتاز، ژرانیل دی فسفات سنتتاز، بتا آمیرین سنتتاز و اسکوالن اپوکسیداز در برگ‌های تیمار شده با اسیدسالیسیلیک دارای بیان‌های متفاوتی بودند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد دو سطح ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر نانو کلات نقره بالاترین و تیمار عدم محلول پاشی کمترین مقدار بیان ژن مذکور را به خود اختصاص دادند (شکل ۵). (Hosseini et al. 2018) نشان دادند شوری اثر معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد بررسی داشت، در مطالعه آن‌ها بیشترین میزان بیان ژن‌های (TvTPS1) و (TvTPS) در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار و بیشترین میزان بیان ژن (TvDXR) در تیمار ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید گزارش شد. آن‌ها در نهایت اظهار داشتند شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم با تأثیر بر ژن‌های ابتدای مسیر بیوسنتزی MEP و افزایش بیان ژن‌ها انتهای مسیر بیوسنتز تیمول

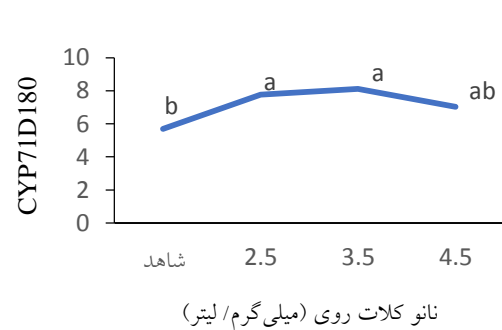
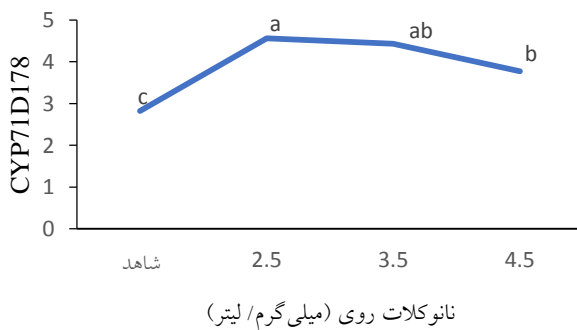
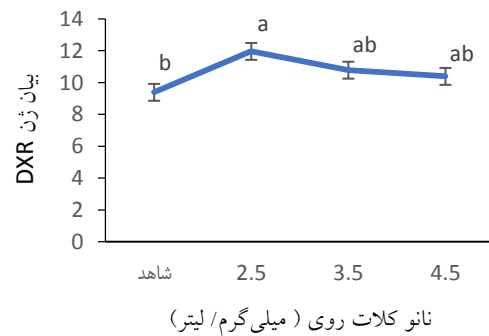
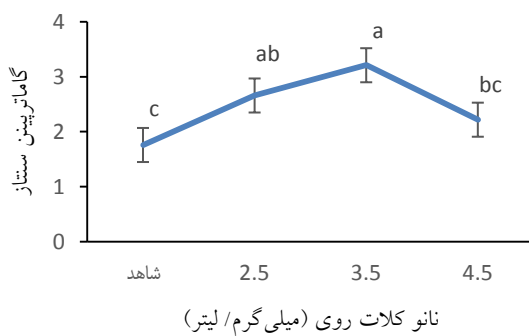
نسبی ژن‌های *PT*، *CBDAS*، *THCAS* و *OLS* در مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها در شاهدانه (*Cannabis sativa L.*) تحت تأثیر الیستور و سنجش متابولیت‌های مرتبط با آن (Soltan and Salami 2017) دریافتند اسید آسکوربیک به‌عنوان یک الیستور غیرزیستی افزایش معنی‌داری را در بیان ژن دو کانابینوئید اصلی THC و CBD که همواره در تولید دارو از این دو ماده مؤثره بهره گرفته می‌شود، ایجاد کرد.

روی در بازه زمانی ۸ ساعت بود. در این مطالعه نانو اکسید کبات در اکثر غلظت‌ها و بازه‌های زمانی مورد استفاده باعث کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی شد (Rezaee et al. 2017). (Fathiet 2020). ال. بررسی بیان برخی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها در بافت‌ها، مراحل نمو و تحت تیمار متیل جاسمونات در بومادران گزارش کردند بیان این ژن‌ها در بافت گل و در گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات به‌صورت معنی‌داری افزایش نشان داد. در تحقیقی تحت عنوان بررسی بیان

جدول ۵- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر میزان بیان ژن‌های مرتبط با سنتز تیمول و کاراکرول در آویشن

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
CYP71D178	CYP71D180	گاماترپین سنتاز	بیان ژن DXR		
۱/۷۳ ^{ns}	۰/۴۳ ^{ns}	۰/۴۸ ^{ns}	۱/۶۳ ^{ns}	۱	رقم
۳/۷۹ ^{**}	۶/۸۲ ^{**}	۲/۴۰ [*]	۶/۷۴ [*]	۳	محلول پاشی
۰/۴۸ ^{ns}	۱/۵۸ ^{ns}	۲/۵۷ ^{ns}	۲/۵۷ ^{ns}	۳	رقم در محلول پاشی
۰/۳۶	۰/۷۸	۲/۰۰	۲/۰۰	۱۶	خطای آزمایشی
۱۵/۴۶	۱۲/۲۸	۲۰/۵۶	۱۵/۳۱		ضریب تغییرات (درصد)

ns، * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد آماری



نتیجه گیری کلی

محلول پاشی نانو کلات روی (سطوح ۲/۵ و ۳/۵ میلی گرم در لیتر) مقدار بیان ژن های مرتبط با تیمول و کاراکرول را به صورت معنی داری افزایش داد، بنابراین می توان نتیجه گرفت محلول پاشی نانو کلات روی با اثر بر افزایش میزان بیان ژن های مرتبط با محتوی تیمول و کاراکرول موجب افزایش ترکیبات اسانس در گیاه شده است، بنابراین جهت افزایش درصد استحصال اسانس محلول پاشی نانو کلات روی در گیاه آویشن توصیه می شود.

در بررسی حاضر بین دو رقم آویشن دنایی و آویشن کوهی از لحاظ صفات مورد بررسی اختلاف معنی داری مشاهده نشد، می توان نتیجه گرفت واکنش دو رقم از زمینه ژنتیکی تقریباً یکسان برخوردار بوده و واکنش یکسانی نسبت به تغییرات محیطی نشان داده اند. نتایج نشان داد محلول پاشی نانو کلات روی (به خصوص سطوح ۲/۵ و ۳/۵ میلی گرم در لیتر) اثر معنی داری در افزایش عملکرد خشک بوته، محتوی رنگیزه های فتوسنتزی و محتوی تیمول و کاراکرول داشت، در این تحقیق

منابع

- Arnon DT (1949) Copper enzymes in isolated Chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24:1-15.
- Asle Mohammadi Z, Mohammadkhani N, Servati M (2020) Effect of iron and zinc foliar application on some biochemical traits of *Thymus (Thymus vulgaris L.)* plant under nitrogen deficiency. *Journal of Plant Research* 4:10-22. (In Farsi).
- Azizi G, Alimardani L, Syahmarghay A (2011) The relationship between the number on chlorophyll content meter with chlorophyll content, photosynthesis and leaf nitrogen content in soybean (*Glycine max*) *Journal of Plant Science Research* 23:34-40.
- Bondarian F, Torabi S, Omidi M, Bahreini M (2013) Study of callus induction and regeneration of *Papaversomniferum*. *Current Opinion in Biotechnology* 24S:S28-S47.
- Crocoll C, Asbach J, Novak J, Gershenzon J, Degenhardt J (2010) Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare L.*) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 73:587-603.
- Elyasi R, Majdi M, Bahramnejad B, Mirzaghaderi Gh (2015) Expression pattern analysis of genes involved in the biosynthetic pathway of monoterpenes and triterpenes in black cumin (*Nigella sativa*) plants treated with salicylic acid. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*. 23:164-174. (In Farsi).
- Fallahi A, Hassani A, Sefidkon F (2016) Effect of foliar application of different zinc sources on yield and phytochemical characteristics of basil (*Ocimum basilicum L.*). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 5:743-757. (In Farsi).
- Farkya S, Bisaria V, Sirvastava A (2004) Biotechnological aspects of the production of the anticancer drug podophyllotoxin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:504-519.
- Fathi I, Majdi M, Maroufi A, Dastan D (2020) Expression pattern analysis of some genes involved in the biosynthetic pathway of terpenoids and phenylpropanoids in tissues, developmental stages and under methyl jasmonate treatment in yarrow (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*). *Cellular and molecular researches (Iranian journal of biology)* 33:87-102. (In Farsi).
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23:213-226.
- Ghasemi Pirbalouti A, Emami Bistghani Z, Malekpoor F (2015) An overview on genus *Thymus*. *Journal of Herbal Drugs* 6:93-100.
- Gupta P, Agarwal AV, Akhtar N, Sangwan RS, Singh SP, Trivedi PK (2013) Cloning and characterization of 2-C-methyl-Derythritol-4-phosphate pathway genes for isoprenoid biosynthesis from Indian ginseng, *Withaniasomnifera*. *Protoplasma* 250:285-295.
- Hadaddi H, Moradi P, Motalebi E (2016) The Effect of Methanol and Manganese Sulfate Spraying on Quantity and Essential Oil Components of (*Melissa officinalis L.*). *J Journal of Medicinal Plants* 15:80-88. (In Farsi).
- Hafeez B, Khanif YM, Saleem M (2013) Role of zinc in plant nutrition- a review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3:374-391.
- Hassani Moghadam E, Dolatsha M, Shaaban M, Yarahmadi R (2020) Effect of spraying iron and zinc sulfate fertilizer on essential oil component of medicinal plant, lemon balm (*Melisa officinalis L.*). *Journal of Plant ecophysiology* 12:112-130. (In Farsi).
- Hosseini H, Fatehi F, Mousavi Fard S, Qaderi A (2018) Gene Expression Analysis of Thymol and Carvacrol Biosynthesis Pathway in *Thymus vulgaris* under Salinity Stress. *New Genetics* 13:409-418. (In Farsi).
- Julliard JH (1992) Biosynthesis of the pyridoxal ring (vitamin B6) in higher plant chloroplasts and its relationship with the biosynthesis of the thiazole ring (vitamin B1). *Comptesrendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 314:285-290.

- Julliard JH, Douce R. (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:2042-2045.
- Kamalizadeh M, Bihamta M, Peyghambari SA, Hadian J (2013) Expression of genes involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway in dragonhead affected by nanoparticles. *Genetics in the Third Millennium* 12:3428-3436.
- Khodayari M, Omid M, Shahnejatboushahri A, Yazdani D, Naghavi, M (2013) Effect of elicitors on some alkaloids gene expression in *Papaversomniferum* L. 2nd National Congress on Medicinal Plants, Tehran, Iran 15-16 May: 511.
- Kumar A, Patro HK, Anand K (2010) Effect of zinc and sulphur on herb, oil yield and quality of menthol mint (*Mentha arvensis* L.) var. Kosi. *J Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2:642-648.
- Lambert E, Faizal A, Geelen D (2011) Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164:220- 237.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382.
- Mahmoud SS, Croteau RB. (2003) Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proceeding of the Natinal Academy Science* 100:14481-14486
- Mahmoudi A, Taheri E, Aramideh A (2018) The effect of cobalt nanoparticles on DXR and GPPS gene expression in *Achilleawilhelmsii* cell suspension, The 3rd International Congress and the 15th National Congress of Genetics of Iran, Tehran.
- Moghimi pour Z, MahmoodiSourestani M, Alamzadeh Ansari N (2016) Effects of Foliar Application of Nano Zinc Chelate and Zinc Sulfate on Zinc Content, Pigments and Photosynthetic Indices of Holy Basil (*Ocimum sanctum*). *journal of Horticultural Science* 30:242-250. (In Farsi).
- Mousavi H, Mahdi Nezhad N, Fakheri B, Majdi M, Heidari F (2017) Effects of some nanoparticles on expression of germacrene A synthase (TpGAS) and parthenolide synthase (TpPTS) genes in *Tanacetum parthenium* L. under water deficit stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 33:314-324. (In Farsi).
- Mozaffarian V (2013) Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. *FarhangMoaser. Tehran* 579-589.
- Nateghi S, Pirzad A, Darvishzadeh R (2015) Effect of Fe and Zn micro nutrients on yield and yield components of *Pimpinell aanisum* L. *Journal of Horticulture Science* 29:37-46. (In Farsi).
- Pandey AC, Sanjay SS, Yadav RS (2010) Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental Nanoscience* 6:488-497.
- Panwar J, Jain N, Bhargaya A, Akhtar MS, Yun YS (2012) Positive effect of zinc oxide nanoparticles on tomato plants: A step towards developing "Nano-fertilizers". *Proceeding of 3rd International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT), Penang, Malaysia* 30 May-1 June:348-352.
- Pirzad AR, Tousi P, Darvishzadeh R (2013) Effect of Fe and Zn foliar application on plant characteristics and essential oil content of anise (*Pimpinell aanisum* L.), *Iranian Journal of Crop Sciences* 15:12-23 (In Farsi).
- Powell SR (2000) The antioxidant properties of zinc, *Journal of Nutrition* 130:1447-1449.
- Prasad T, Sudhakar P (2012) Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of Peanut (*Arachis hypogaea*), *Journal of Plant Nutrition* 35:905-927.
- Prasad T, Sudhakar P (2012) Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of Peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Plant Nutrition* 35:905-927.
- Ramak P, KazempourOsaloo S, Ebrahimzadeh H, Sharifi M, Behmanesh M (2015) Expression of gene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and its relation to monoterpene carvacrol biosynthesis in Saturejakhuzestanica. *Journal of plant research (Iranian Journal of Biology)* 27:622-634. (In Farsi).
- Rezaee Z, Hosseini R, Asghari B (2017) Evaluating the effect of zinc and cobalt nanoparticles on expression of STR, DAT and D4H genes in periwinkle (*Catharanthus roseus*) suspension culture. *Journal of Cell and Tissue (JCT)*. 7:355-364. (In Farsi).
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 295:517-524.
- Ruiz-May E, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2009) Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Molecular biotechnology* 41:278-285.
- Said Al-Ahl H, Mahmoud A (2010) Effect of zinc and iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum*) under salt stress. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3:97-111.
- Salata O (2004) Applications of nanoparticle in biology of medicine *Journal Nanobiotechnology* 2:3-15.
- Soltan K, Salami SA (2017) Major gene expression and related metabolites (THCAS, CBDAS, PT, OLS) in cannabinoids biosynthesis pathway in *Cannabis sativa* L. influenced by a elicitor. *Journal of Plant and Biotechnology* 11:13-23. (In Farsi).
- Tarafdar JC, Raliya R, Mahawar H, Rathore I (2014) Development of zinc nanofertilizer to enhance crop production in pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Agricultural Research* 3:257-262.
- Van Schie CC, Ament K, Schmidt A, Lange T, Haring MA Schuurink RC (2007) Geranyl diphosphate synthase is required for biosynthesis of gibberellins. *The Plant Journal* 52:752-762.
- Weisany W, Sohrabi Y, Heidari GH, Siosemardeh A, Ghassemi-Golezani K (2012) Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Omics Journal* 5:60-67.

Yadegari M, Alaeian N (2012) Effects of foliar application of micronutrients on some functional traits of *Calendula officinalis* L. *Journal of crop production research* 4:75-84. (In Farsi).

Yousefi K, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A (2015) Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavones synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic to Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)* 28:210-223. (In Farsi).

Zhou L, Cao X, Zhang R (2007) Stimulation of saponin production in *Panax ginseng* hairy roots by two oligosaccharides from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *BiotechnolLett* 29:631-634.