مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۳ شماره ۳ صفحه های ۴۴۷ تا ۴۶۲ (۱۴۰۱)

مقاله پژوهشی

ارزیابی تاثیر طیف‌های نوری (LED) و نانو ذرات TiO_2 و ZnO بر رویان‌زایی رویشی و باززایی برخی اکوتیپ‌های زنیان[1]

Assessment of the Effect of Optical Spectra (LED) and TiO_2 and ZnO Nanoparticles on Vegetative Embryogenesis and Regeneration of Some Ecotypes in Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.)

نرگس مرادی*، سید احمد سادات نوری، یاسین دومانی و فاطمه امینی[2]

چکیده

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* L. از تیره چتریان است. با استفاده از فن کشت بافت گیاهی، می‌توان تنوع ژنتیکی گیاهان را در یک محیط کنترل‌شده حفظ کرد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر غلظت‌های نانوذرات ZnO و TiO_2 و کیفیت نورهای مختلف روی رویان‌زایی رویشی و باززایی بود. آزمایش حاضر به‌صورت فاکتوریل (فاکتورها شامل اکوتیپ، نانوذرات، طیف نوری) بر پایه طرح به‌طورکامل تصادفی در ۳ تکرار انجام گرفت. پس از افزودن دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) و اکسید روی (ZnO) به محیط کشت MS، ریزنمونه‌ها در طیف‌های نوری قرمز، آبی و ترکیب آبی و قرمز قرار گرفتند. در این مطالعه با به‌کارگیری نانوذرات درصد آلودگی قارچی و باکتریایی نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. با افزایش غظت نانوذره TiO_2 تحت تیمار طیف ترکیب آبی و قرمز درصد آلودگی به صفر رسید. همچنین بالاترین القای پینه، رویان رویشی و باززایی برای نانوذره TiO_2 تحت تیمار طیف ترکیبی آبی و قرمز در اکوتیپ شیراز و اردبیل مشاهده شد. طیف نور آبی بیشترین تاثیر را در جذب و کنترل آلودگی برای نانوذره ZnO داشت. با افزایش شدت نور جذب نانوذره ZnO کاهش و آلودگی افزایش یافت. در محیط کشت TiO_2 با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تحت تیمار ترکیب نور آبی و قرمز فعالیت یاخته‌های رویان‌زا افزایش یافت. با افزایش نانوذره و شدت نور بالا، فعالیت رادیکال‌های آزاد و آنزیم پلی فنول اکسیداز متوقف شده و جذب ماده‌های غذایی توسط یاخته‌های در حال رشد افزایش یافت. در تیمار شاهد گیاهان باززایی شده به توده سفید رنگی تبدیل و در نهایت باعث مرگ پینه القا یافته، رویان‌زا و گیاهچه‌های باززا می‌شود. مطالعه حاضر با به‌کارگیری نانوذرات TiO_2 و ZnO موفق به ارائهٔ یک پروتکل موثر و مفید برای القای رویان رویشی و باززایی در کمترین زمان در محیط کشت شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پلی‌فنول اکسیداز، القای پینه، رادیکال‌های آزاد، نانوذرات، طیف‌های نوری.

مقدمه

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* L از تیره Apiaceae است (۲۲). اسانس بذر زنیان حاوی تیمول است که دارای فعالیت میکروب‌کشی قوی، ضد اسپاسمی و قارچ‌کشی است. زنیان یکی از گیاهان دارویی است که به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و اهمیت بسیاری که در مصارف پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و نیز صنایع غذایی دارد، بسیار مورد توجه است (۲). استفاده مستقیم و بی‌رویه از گیاهان دارویی می‌تواند آن‌ها را در آینده در معرض خطر انقراض قرار دهد، از این‌رو، توجه به برنامه‌های حفاظت از ژرم پلاسم برای حفظ این گیاهان با ارزش، مهم است. یکی از مهم‌ترین شاخه‌های زیست‌فناوری

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱

۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانش آموخته و استادیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (Na_moradi@ut.ac.ir).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

گیاهی که می‌تواند به حفظ گیاهان دارویی کمک کند، کشت بافت گیاهی است (۲۱). القای رویان‌های رویشی که به طور مستقیم و غیر مستقیم از بافت‌های بالغ گیاه یا حداقل از بافت‌های غیر بذر مانند اندام‌های برگ و یا بخش‌های ساقه و ریشه گرفته می‌شود اهدافی مهم در کشت بافت گونه‌های دارویی است (۵). پژوهشگران در سال ۲۰۰۸ با بررسی روی گیاه *Bunium persicum Boiss* گزارش کردند که بهترین تیمار از نظر القا رویان رویشی تیمار با ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بود، همچنین گزارش کردند بالاترین باززایی در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی Kin صورت گرفت (۲۳). در کشت بافت گیاه *Carum copticum* ریزنمونه‌های کلئوپتیل و برگ روی تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4.D به همراه ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین پینه را تولید کردند (۱۰). نانو ماده‌ها می‌توانند توانایی گیاهان را در جذب و استفاده از آب و ماده‌های مغذی افزایش دهند. در سال های اخیر، استفاده از نانوذرات با موفقیت منجر به حذف آلاینده‌های میکروبی از محیط کشت شده و نقش مثبت آن در القای پینه، اندام‌زایی، رویان زایی رویشی، تغییرات و بازآرایی کروموزومی، انتقال ژن و تولید متابولیت ثانویه گزارش شده است (۱۶). آلودگی باکتریایی و قارچی مسئله اصلی در کشت بافت گیاهی است. امروزه استفاده گسترده از نانوذرات در محیط کشت بافت از آلودگی باکتریایی و قارچی جلوگیری می‌کند (۱۹). دومانی و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند با افزایش غلظت نانوذره TiO_2 درصد و سرعت القای رویان رویشی افزایش و میزان آلودگی باکتریایی و قارچی کاهش می‌یابد (۸). نتایج مطالعه Alvarez و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که بالاترین رشد پینه و باززایی در گیاه گوجه فرنگی روی محیط کشتی که حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO و ۰/۳ گرم بر لیتر NaCl بود مشاهده شد. بررسی‌ها نشان داد بیشترین درصد پینه (۸۹ درصد) و وزن تازه پینه (۴/۶۷ گرم در هر ریزنمونه برگ) درگیاه *Solanum nigrum* روی محیط کشت MS همراه باترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۳ میلی‌گرم بر لیتر NAA بعلاوه ۸ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO مشاهده شد (۹). نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) ممکن است نقش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند سایتوکنین و جیبرلیک اسید را داشته باشد. (۱۸). پژوهش‌های گسترده‌ای در مورد اثرات نانو ذره TiO_2 بر اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، انجام شده است. با بهبود جذب نور و فعال‌سازی ربیسکو، نشان داده شد که نانو TiO_2 باعث تسریع فتوسنتز می‌شود. رشد اسفناج را بهبود می بخشد و باعث تقویت قدرت رنگ‌دانه‌ها و بیوسنتز کلروفیل در اسفناج می شود (۱۵). هدف از این پژوهش ، بررسی اهمیت ناتوذرات در طیف‌های مختلف نوری در محیط‌های کشت، بر القای رویان رویشی، باززایی، جلوگیری از احتمال وقوع تفرق، بازآرایی کروموزومی و ایجاد پدیدگان‌های متفاوت است که از طریق عنصرهای موجود در محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و منبع کربن ایجاد می‌شود.

مواد و روش

قالب آزمایش، تهیه اکوتیپ‌ها، گندزدایی ریزنمونه‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت و زیست‌فناوری گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان دانشگاه تهران برای بررسی القای پینه، رویان زایی رویشی و باززایی در آزمایشی به صورت فاکتوریل (فاکتورها شامل پنج اکوتیپ، دو نوع نانوذرات با دو سطح، طیف نوری با سه سطح) بر پایه طرح به‌طورکامل تصادفی در ۳ تکرار انجام گرفت. اکوتیپ‌های مورد مطالعه از بانک بذر دانشکده پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه شدند، برای رفع خفتگی ، بذرها با آب مقطر خیس گردید سپس به‌مدت یک شبانه روز در دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. به منظور استریل کردن بذرها در زیر هود، ابتدا بذرها با آب جاری شستشو و سپس در الکل ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شدند و پس از آن با آب مقطر استریل، شستشو و در محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۰/۵درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و بعد اتمام مراحل استریل برای خارج شدن الکل و هیپوکلریت سدیم از بافت بذور، آن ها را ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شده، شستشو داده شد. جهت تهیه جوانه‌زنی و تولید گیاهچه و دستیابی به ریزنمونه های مورد کشت، بذرها در محیط کشت MS (موراشیک اسکوگ ۱۹۶۲)، کشت شدند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به‌مدت ۲۵ روز قرار داده شدند. از ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2-4,D و Kin همراه با دو غلظت مختلف نانو ذرات TiO_2 و اکسید روی ZnO در محیط کشت MS طبق جدول (۱) تنظیم شد. pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم شد. گندزدایی محیط‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت. سپس محیط کشت در پتری دیش های گندزدا شده به میزان مشخص توزیع و از هیپوکوتیل به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

تهیه و افزودن نانوذرات به محیط کشت

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) و اکسید روی (ZnO) انتخاب و برای شناسایی آن‌ها از روش تحلیلی میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. در این مطالعه، اکسید تیتانیوم (IV)، نانو پودر آناتاز و اکسید روی دارای ویژگی‌هایی با اندازه <25 نانومتر، 99.7 درصد، با شماره CAS: 1317- 70-0، و شماره EC: 215-280-1 از Sigma-Aldrich می‌باشند. برای جلوگیری از رسوب نانوذرات TiO_2و ZnO، قبل از افزودن نانوذرات به محیط‌های کشت، ماده پلی وینیل الکل(PVP) در محلول ۲۰x با حجم ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد. پس از حل شدن PVP در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ دقیقه، به محلول نانوذرات TiO_2 و ZnO با غلظت ۱۰x با حجم ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه شده و سپس در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و به یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل شدند. بعد از اتوکلاو محیط‌های کشت، محیط‌های کشت در هود لامینار قرار گرفتند. هنگامی که دمای محیط‌های کشت به ۶۰ درجه سلسیوس رسیدند، محلول نانوذرات TiO_2 و ZnO که از قبل آماده و در یخچال نگهداری شده بودند، مطابق جدول ۱ اضافه شد.

طیف‌های نوری

به منظور بررسی تاثیر طیف‌های نوری مختلف روی نانوذرات محیط کشت و ریخت‌زایی، سه طیف نوری مختلف مورد استفاده قرار گرفتند که عبارتند از: طیف قرمز با طول موج ۶۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر، طیف آبی با طول موج ۴۲۰ الی ۵۰۰ نانومتر و ترکیب طیف آبی و قرمز با طول موج ۵۰۰ الی ۶۵۰ نانومتر. در داخل اتاقک رشد برای حفظ هرکدام از طیف‌های نوری و عدم تاثیر آن‌ها روی هم‌دیگر، آن‌ها را در پلات‌های جداگانه، با شدت نور ۲۸۰۰ لوکس با استقاده از فویل آلومینیومی، مجزا شدند (شکل ۱). پس از حدود یک هفته، تشکیل پینه مشاهده شد. در این دوره ویژگی‌هایی مانند تشکیل پینه، درصد پینه، درصد پینه رویان‌زا و درصد باززایی اندازه گیری شد. در پایان مطالعه، ویژگی‌هایی مانند سطح پینه (cm^2) ، محیط پینه (cm)، طول، عرض و قطر پینه (cm) از طریق نرم افزار Digimizer اندازه‌گیری شد. واکشت هر چهار هفته یکبار انجام شد. وزن تازه پینه بلافاصله پس از خارج شدن پینه از محیط اندازه گیری شد. پس از اندازه‌گیری و ثبت وزن‌تر پینه‌ها، آن‌ها را در فویل آلومینیومی طبق تیمارهای مورد پژوهش بسته بندی و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در نهایت، با کسر وزن فویل آلومینیومی از وزن پینه تازه شده، وزن خشک پینه به‌دست آمد.

جدول ۱- غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوذرات برای القای پینه، رویان رویشی و باززایی در گیاه زنیان.

Table 1. Concentrations of Plant growth regulators and nanoparticles used for induction of callus, somatic embryo and regeneration in the Ajowan plant.

ZnO (mg L^{-1})	TiO_2 (mg L^{-1})	Kin (mg L^{-1})	2.4-D (mg L^{-1})	Culture medium	ردیف
-	-	0.5	0.1	MS Control	1
-	5	0.5	0.1	MS	2
-	10	0.5	0.1	MS	3
5	-	0.5	0.1	MS	4
10	-	0.5	0.1	MS	5

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

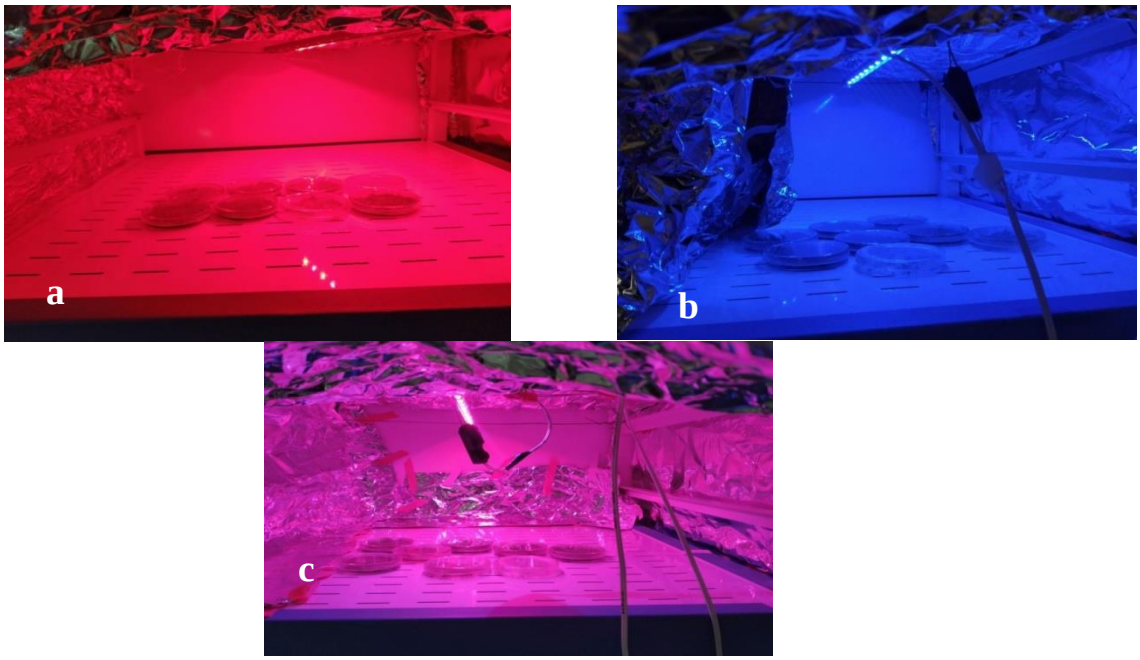


Fig. 1. a; Treatments under red light. b; Treatments under blue light. c; Treatments under combination of blue and red light.

شکل ۱- a; تیمارهای تحت نور قرمز b; تیمارهای تحت نور آبی c; تیمارهای تحت ترکیب نور آبی و قرمز.

جدول ۲- مشخصات کدهای تیماری نور، اکوتیپ، غلظت نانوذرات و ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در گیاه دارویی زنیان

Table 2. Specifications of treatment codes for light, ecotype, nanoparticle concentration and hormonal compounds in Ajowan medicinal plant.

مشخصات تیماری		نور Light			اکوتیپ Ecotype					غلظت ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نانوذرات Nanoparticle and hormonal compounds concentration				
ردیف	کد تیماری	1	2	3	1	2	3	4	5	تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی	TiO_2 (5 mg L^{-1})	TiO_2 (10 mg L^{-1})	ZnO (5 mg L^{-1})	ZnO (10 mg L^{-1})
1	11	*			*	*	*	*	*	*				
2	12		*		*	*	*	*	*	*				
3	13			*	*	*	*	*	*	*				
4	21	*			*	*	*	*	*		*			
5	22		*		*	*	*	*	*		*			
6	23			*	*	*	*	*	*		*			
7	31	*			*	*	*	*	*			*		
8	32		*		*	*	*	*	*			*		
9	33			*	*	*	*	*	*			*		
10	41	*			*	*	*	*	*				*	
11	42		*		*	*	*	*	*				*	
12	43			*	*	*	*	*	*				*	
13	51	*			*	*	*	*	*					*
14	52		*		*	*	*	*	*					*
15	53			*	*	*	*	*	*					*

کد تیماری اکوتیپ: ۱-اکوتیپ شاهدیه ۲- اکوتیپ رفسنجان ۳- اکوتیپ سربیشه ۴- اکوتیپ شیراز ۵- اکوتیپ اردبیل

طیف های نوری: ۱-ترکیب نوری آبی و قرمز ۲-نور قرمز ۳-نور آبی

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

مراحل مختلف اندازه‌گیری تشکیل و باززایی یاخته‌های رویانی

در هفته اول، القای پینه در محیط مشاهده شد. ۹ روز پس از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ویژگی‌هایی مانند تشکیل پینه و درصدپینه اندازه‌گیری و پس از ۱۲ روز از استرئومیکروسکوپ برای تشخیص مراحل یاخته‌های رویانی، به ویژه مرحله کروی استفاده شد. باززایی و واکشت در همان محیط‌های کشت صورت گرفت. در مرحله قلبی شکل، هنگامی که یاخته‌های رویانی به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند، مراحل بعدی و باززایی صورت نگرفت. این امر باعث ایجاد کلروز و نکروز رویان‌های القایی شد. هم‌چنین، پس از ۱۲ روز از استقرار ، مرحله قلبی و اژدری شکل، مشاهده شد. در روز ۲۳، مراحل لپه‌ای و گیاهچه مشاهده گردید. باززایی گیاهچه‌ها از پینه‌ها یک فرآیند زمان‌بر است (۸ ماه) و به دلیل تولید بالای فنول و تیمول ریزنمونه ها در محیط‌های کشت اکثر گیاهچه‌های باززایی شده از بین می‌رفتند. افزون بر این، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در طول مورفوژنز ممکن است باعث بازآرایی کروموزومی شود. برای غلبه بر این مشکلات، تکثیر بالای تولید و رشد گیاهچه‌ها از رویان‌های رویشی در نظر گرفته شد. بعد از کنترل کفایت داده‌ها و اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، واکاوی آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD توسط نرم افزار R (مدل نرم افزار R 3.4، پکیج Agricolae Ggplot2) انجام شد. نمودارهای مربوطـه توسـط نـرم افـزار R و OriginPro رسم شد.

نتایج و بحث

القای پینه تحت تیمارهای نانوذارت و طیف‌های نوری

به نظر می‌رسد، فناوری کشاورزی یکی از اصلی‌ترین استفاده کنندگان نانوذرات فلز، به ویژه نانوذرات ZnO و TiO_2 است. در مطالعه حاضر، رویان‌های رویشی به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم به‌دست آمد. با استفاده از بافت‌های بالغ گیاه از طریق تولید رویان رویشی می‌توان در کمترین زمان به انبوهی گیاه، مشابه پایه مادری رسید. اساسی‌ترین مشکل برای گیاهان دارویی که دارای متابولیت ثانویه هستند، باززایی اولیه می‌باشد که استفاده از تکنیک رویان رویشی باعث برطرف شدن این مشکل می‌شود (۱۱). بر اساس نتایج حاضر پایین‌ترین زنده‌مانی پینه در غلظت‌های مختلف نانوذرات TiO_2 تحت طیف‌های نور آبی و نور قرمز مشاهده شد. در حالی که ترکیب طیف نوری آبی و قرمز بالاترین زنده‌مانی پینه را نشان داد. در محیط‌هایی که غلظت نانوذره TiO_2 از ۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت، به مراتب زنده‌مانی پینه نیز افزایش یافت. قابل ذکر است که بیشترین زنده‌مانی پینه را اکوتیپ‌های شیراز، اردبیل و سربیشه و پایین‌ترین زنده‌مانی پینه را اکوتیپ‌های رفسنجان و شاهدیه نشان دادند (شکل ۲). همچین می‌توان اشاره کرد محیط‌های حاوی غلظت نانوذره ZnO یطور کلی زنده‌مانی پینه بالاتری نسبت به تیمارهای TiO_2 نشان دادند. اما باید اشاره کرد درصد زنده ماندنی یاخته‌های پینه با افزایش غلظت ZnO، از ۵ میلی‌گرم بر لیتر به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش می‌یابد، بدیهی است که ZnO فعالیت‌های مهاری یاخته وابسته به غلظت را از خود نشان می‌دهند (شکل ۳). عواملی مانند اندازه، شکل و فاصله آن‌ها از یکدیگر (غلظت) و ضریب شکست تغییرات در محیط اطراف، باعث جذب بهتر نانوذرات می‌شوند این فرایند باعث تشکیل سریع مورفوژنز شده و درنتیجه باعث افزایش زنده‌مانی می شود. نانوذرات کوچکتر نور را با طول موج کمتر و نانوذرات بزرگتر نور با طول موج بالاتری را جذب می‌کنند (۲۶). پس می‌توان گفت با جذب نانوذرات، سطح تبخیر و تعرق در یاخته کاهش می‌یابد از سوی دیگر دیواره یاخته‌ای ضخیم‌تر و ماده داخل واکوئل غلیظ‌تر می‌شود در نهایت این امر باعث افزایش زنده‌مانی یاخته‌های متمایز شده می‌شود.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

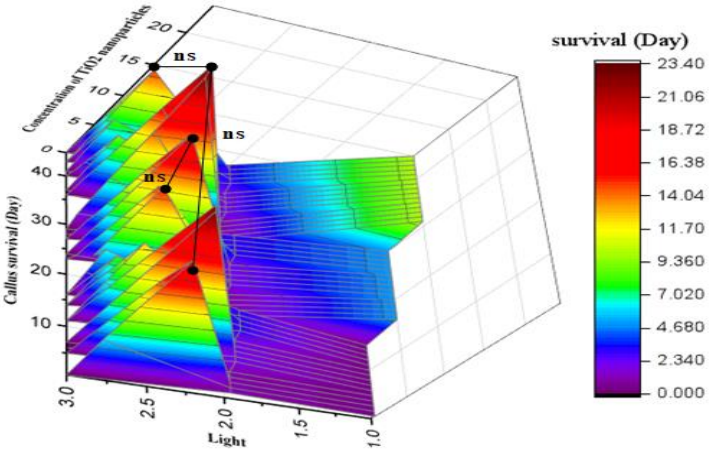


Fig. 2. Effect of TiO_2 nanoparticles and blue and red light spectra on callus survival.

شکل ۲- اثر نانوذرات TiO_2 و طیف نور آبی و قرمز بر زنده‌مانی پینه.

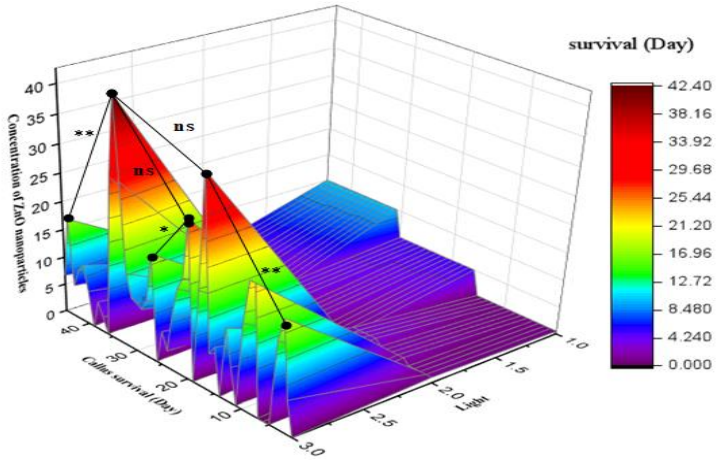


Fig. 3. Effect of ZnO nanoparticles and blue and red light spectra on callus survival.

شکل ۳- اثر نانوذرات ZnO و طیف نور آبی و قرمز بر زنده‌مانی پینه.

سرعت و درصد القای پینه

با بکارگیری سطوح مختلف تیمارهای نانو ذرات TiO_2 و ZnO در محیط کشت، میزان و سرعت القای پینه برای اکوتیپ‌ها، نسبت به تیمار شاهد (ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی) نتایج متفاوتی نشان دادند. دراین بررسی، با افزایش غلظت هر دو نانوذرات استفاده شده در محیط کشت MS، همراه با طیف ترکیبی (قرمز و آبی) درصد القای پینه افزایش یافت. بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه، اکوتیپ شاهدیه پایین‌ترین درصد القای پینه را نشان داد. بالاترین درصد القای پینه در طیف نور قرمز در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2 و ZnO مشاهده شد (جدول ۳). درصد القای پینه در اکوتیپ رفسنجان و طیف نور ترکیبی قرمز و آبی با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO در کمترین زمان به حداکثر خود رسید (جدول ۳). بالاترین درصد پینه در اکوتیپ سربیشه در کد تیماری ۳۱۳ و ۵۱۳ در طول کمترین زمان مشاهده شد (جدول ۳). بررسی‌های اکوتیپ اردبیل و شیراز نشان داد کمترین زمان القای پینه در محیط کشت‌های که ترکیب نور آبی و قرمز همراه با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 و ZnO بوده است که این امر به ترتیب ۷ و ۱۰ روز طول کشید. طبق مطالعه Chutipaijit و همکاران (۲۰۱۸) روی دو نژادگان گیاه برنج مشخص شده است بیشترین القای پینه در غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2 در کمترین زمان مشاهده شده است. آن‌ها دریافتند با افزایش غلظت نانوذره TiO_2، القای پینه افزایش، زمان پینه کاهش یافت. علاوه بر اینکه موفقیت کشت بافت گیاهی درون شیشه‌ای بستگی به عوامل متعددی نظیر نژادگان، وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان، نوع ریزنمونه، روش‌های گندزدایی سطحی، محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، اندازه ظروف کشت، کیفیت طیفی، شدت نور، دوران نور و دما دارد. ترکیب محیط کشت به شدت بر پتانسیل مورفوژنیک ریزنمونه‌ها تاثیر می‌گذارد (۱۴). بین دو ریزنمونه

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

مورد مطالعه ریزنمونه هیپوکوتیل بالاترین درصد القای پینه را نشان داد و از سوی دیگر بین پنج اکوتیپ مورد سنجش اکوتیپ شیراز، اردبیل و سربیشه بالاترین القای پینه را نشان داد، پس احتمال این‌که ترکیب‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درونی بین ریزنمونه‌ها و اکوتیپ‌های مختلف، متفاوت باشد، وجود دارد. در ریزازدیادی گیاه گوجه فرنگی مشخص شد، رشد پینه و باززایی گیاه روی محیط کشت حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO، افزایش یافت. از سوی دیگر با افزایش غلظت نانوذره ZnO آنزیم های آنتی اکسیدان مانند GPX و SOD افزایش می‌یابد (۱). نانوذرات TiO_2 و ZnO در محیط کشت در تحریک ماده‌های غذایی، افزایش جذب بالای ماده‌های غذایی توسط یاخته، انباشته شدن ماده‌های غذایی درون یاخته، متیله شدن DNA ریزنمونه‌های کشت شده، افزایش سرعت رشد یاخته، تحریک یاخته‌های ریزنمونه کشت شده به سمت یک توده پینه و در استقرار و حفظ قطبیت نیز نقش دارند. به‌طور کلی متابولیسم نانوذرات TiO_2 و ZnO شامل دو واکنش بیوسنتز و واکنش‌های تغییر مولکولی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است. معمولاً برای القای پینه، تشکیل و حفظ یاخته‌های تمایز یافته از نانوذرات TiO_2 و ZnO استفاده می‌شود (۱۲). احتمال دارد، افزایش سرعت تشکیل توده‌های پینه، در نتیجه افزایش غلظت هر دو نانوذره تحت تاثیر ترکیب طیف نوری آبی و قرمز را می‌توان تاحدودی متاثر از سرعت متیله شدن DNA در ریزنمونه‌های کشت شده دانست. این امر، در مورد غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات TiO_2 و ZnO مشهودتر است. در این پژوهش مشخص شد نوع نانوذره و میزان آن‌ها و نوع طیف نوری استفاده شده، نقش مهمی برای القای پینه و سرعت القای پینه دارد.

درصد آلودگی محیط‌های کشت

ایده‌های عالی برای از بین بردن آلودگی‌های باکتری، قارچی و آلودگی درون بافتی در محیط کشت درون شیشه‌ای نیاز به ابزارهای عالی و ماده‌های شیمیایی گران‌قیمت دارند. شکی نیست که نانوذرات دارای کارایی متنوع و اثبات شده و قابلیت های بالقوه هستند. حذف آلودگی میکروبی و قارچی از کشت‌های درون شیشه‌ای برای گیاهان دارویی چالش بسیار بزرگی است. از طرف دیگر آلودگی باکتریای یا قارچی بزرگ‌ترین مشکل در کشت بافت و کشت یاخته‌ای در شرایط درون شیشه‌ای ایجاد می‌کنند. طبق بررسی‌های صورت گرفته در محیط کشت‌های شاهد (عدم وجود نانوذرات TiO_2 و ZnO) برای هر سه طیف نوری، درصد آلودگی باکتریایی و قارچی افزایش یافت. با این‌حال، بکارگیری سطوح مختلف تیمارهای غلظت نانوذرات TiO_2 و ZnO در محیط کشت درصد آلودگی قارچی و باکتریایی تحت تیمار طیف‌های نوری مختلف،کاهش متفاوتی نشان دادند. با افزایش غلظت نانوذره TiO_2 تحت تیمار ترکیب نوری آبی و قرمز درصد آلودگی قارچی و باکتریایی برای همه‌ی اکوتیپ‌ها متوقف شد. این امر نشان می‌دهد جذب نور، در تیمار نانوذره TiO_2 نسبت به نانوذره ZnO متفاوت است. اندازه، شکل و ساختار نانوذر TiO_2 نسبت به نانوذره ZnO بزرگ‌تر و به طول موج بالاتری برای جذب نیاز است. به همین دلیل هر دو طیف نور آبی و قرمز درصد آلودگی تیمار TiO_2 افزایش یافته است (شکل ۴). تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت نانوذرات را جذب و تحریک می‌کنند و باعث حرکت و حمل نانوذرات در بافت گیاهی می‌شوند. این امر برای تنظیم‌کننده رشد گیاهی اکسین مشهودتر است. با جذب نانوذرات تغییرات فیزیولوژیکی در ریزنمونه‌های کشت‌شده، ایجاد می‌شود و از آلودگی باکتریایی و قارچی جلوگیری می‌شود که برای ریزنمونه های جوان مشهودتر است. محققان در مطالعه ای گزارش کردند میزان اکسین در اندام پیر در تمام قسمت آن به‌صورت یکسان و مساوی است اما مقدار آن‌ها در اندام جوان متفاوت بوده و بیشترین میزان آن در اندام جوان در محل اتصال دمبرگ به برگ است (۱۷). بالاترین تاثیر نانوذره ZnO روی کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی در طیف نوری آبی بین ۳۰۰ – ۴۰۰ نانومتر بود. در طیف نوری مذکور با افزایش غلظت نانوذره ZnO درصد آلودگی کاهش یافت. قابل ذکر است با افزایش کیفیت طیف‌های نوری (ترکیب نوری آبی و قرمز)، میزان آلودگی در محیط‌های که حاوی ترکیب‌های نانوذره ZnO بودند کاهش یافت (شکل ۴). در پژوهشی Abdel Wahabnv و همکاران (۴۵) نشان دادند که با افزایش غلظت نانوذرات در محیط کشت درون‌شیشه‌ای درصد آلودگی قارچی و باکتریایی کاهش می‌یابد. همچنین آن‌ها اظهار کردند با افزایش غلظت نانوذره ZnO ترکیب‌های فلاونوئیدها و آنتوسیانین و میزان بیان ژن‌های آن‌ها در ریزنمونه‌های کشت افزایش یافت، و میزان اختلاف با گیاه شاهد، چشم‌گیر بود. درصد کنترل آلودگی در این مطالعه در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO تحت تیمار طیف نور آبی اختلاف چشمگیری با تیمارهای مورد مقایسه نشان داد. قابل ذکر است نانوذره ZnO در طیف پایین جذب می‌شود (۴۵).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

جدول۳- مقایسه میانگین درصد و سرعت القای پینه.

Table 3. Comparison of the mean percentage of callus induction.

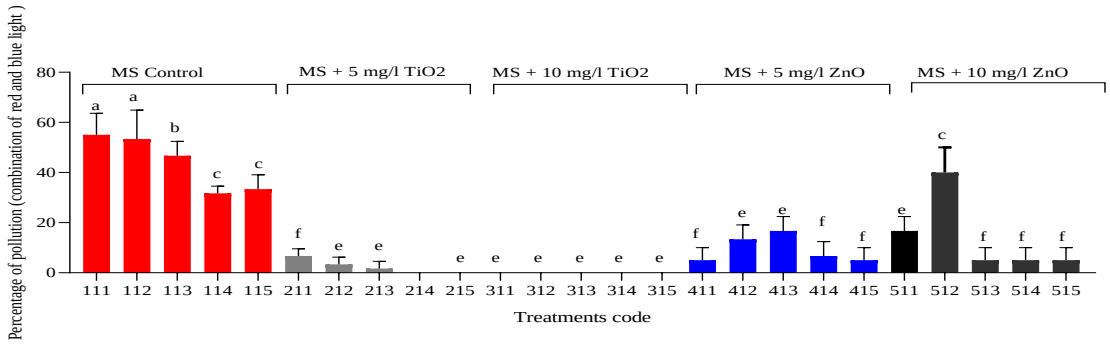
تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی	Nonoparticles نانوذرات	اکوتیپ شاهدیه	درصد القا کالوس Callus induction percentage	سرعت القا کالوس Callus induction rate	Hormones تنظیم‌کننده‌های رشدگیاه	Nonoparticles نانو ذرات	Rafsanjan Ecotype اکوتیپ رفسنجان	درصد القا کالوس Callus induction percentage	سرعت القا کالوس Callus induction rate	Hormones تنظیم‌کننده‌های رشدگیاه	Nonoparticles نانو ذرات	Sarbishe Ecotype اکوتیپ سربیشه	درصد القا کالوس Callus induction percentage	سرعت القا کالوس Callus induction rate	Hormones تنظیم‌کننده‌های رشدگیاه	Nonoparticles نانوذرات	Shiraz Ecotype اکوتیپ شیراز	درصد القا کالوس Callus induction percentage	سرعت القا کالوس Callus induction rate	Hormones تنظیم‌کننده‌های رشدگیاه	Nanoparticles نانوذرات	Ardebil Ecotype اکوتیپ اردبیل	درصد القا کالوس Callus induction percentage	سرعت القا کالوس Callus induction rate
1	1	1	0^{e}	0^{b}	1	1	2	10^{df}	6^{ab}	1	1	3	$^{bc}40$	$^{a}8$	1	1	4	30^{c}	7^{a}	1	1	5	۵^{d}	7^{ab}
1	2	1	5^{de}	6^{ab}	1	2	2	0^{e}	0^{b}	1	2	3	35^{cd}	7^{ab}	1	2	4	55^{b}	9^{a}	1	2	5	25^{bd}	9^{a}
1	3	1	0^{e}	0^{b}	1	3	2	5^{ef}	8^{ab}	1	3	3	50^{b}	8^{a}	1	3	4	0^{d}	0^{b}	1	3	5	20^{bd}	9^{a}
2	1	1	5^{de}	6^{ab}	2	1	2	5^{ef}	7^{ab}	2	1	3	25^{de}	9^{a}	2	1	4	5^{d}	5^{ab}	2	1	5	50^{b}	6^{ab}
2	2	1	70^{b}	8^{a}	2	2	2	5^{ef}	6^{ab}	2	2	3	5^{g}	6^{ab}	2	2	4	0^{d}	0^{b}	2	2	5	50^{b}	8^{a}
2	3	1	۲۵^{c}	8^{a}	2	3	2	5^{ef}	7^{ab}	2	3	3	5^{g}	6^{ab}	2	3	4	90^{a}	0^{b}	2	3	5	5^{d}	6^{ab}
3	1	1	20^{cd}	10^{a}	3	1	2	15^{ce}	12^{a}	3	1	3	100^{a}	7^{ab}	3	1	4	0^{d}	5^{ab}	3	1	5	85^{a}	6^{ab}
3	2	1	5^{de}	10^{a}	3	2	2	0^{f}	0^{b}	3	2	3	30^{de}	8^{a}	3	2	4	5^{d}	0^{b}	3	2	5	5^{d}	4^{ab}
3	3	1	0^{e}	0^{b}	3	3	2	20^{c}	8^{ab}	3	3	3	0^{g}	0^{b}	3	3	4	90^{a}	5^{ab}	3	3	5	0^{d}	2^{b}
4	1	1	10^{ce}	11^{a}	4	1	2	100^{a}	6^{ab}	4	1	3	10^{fg}	10^{a}	4	1	4	0^{d}	0^{b}	4	1	5	80^{a}	8^{a}
4	2	1	100^{a}	7^{a}	4	2	2	35^{b}	7^{ab}	4	2	3	40^{bc}	7^{ab}	4	2	4	5^{d}	5^{ab}	4	2	5	40^{bc}	7^{ab}
4	3	1	0^{e}	7^{b}	4	3	2	17^{cd}	10^{a}	4	3	3	3^{g}	6^{ab}	4	3	4	20^{c}	8^{a}	4	3	5	10^{cd}	9^{a}
5	1	1	30^{cd}	10^{a}	5	1	2	15^{ce}	10^{a}	5	1	3	100^{a}	6^{ab}	5	1	4	85^{a}	5^{ab}	5	1	5	75^{a}	5^{ab}
5	2	1	0^{e}	0^{b}	5	2	2	5^{ef}	7^{ab}	5	2	3	15^{ef}	4^{ab}	5	2	4	5^{d}	7^{a}	5	2	5	5^{d}	6^{ab}
5	3	1	5^{de}	6^{ab}	5	3	2	20^{c}	8^{ab}	5	3	3	5^{g}	7^{ab}	5	3	4	100^{a}	6^{ab}	5	3	5	20^{bd}	5^{ab}

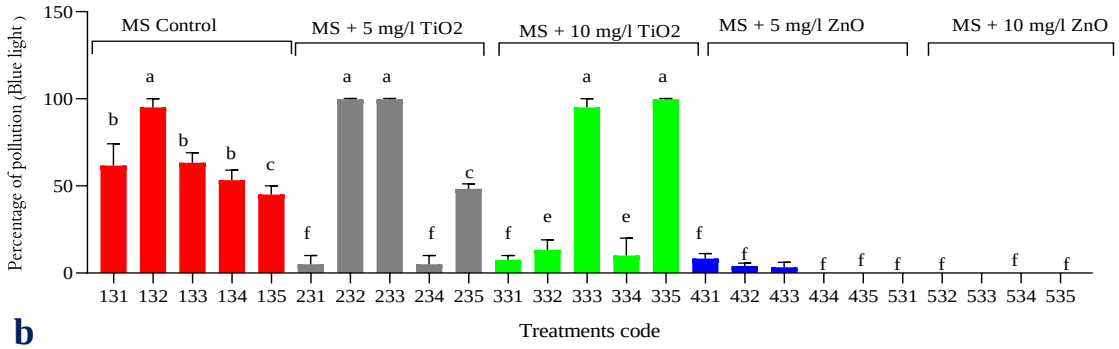
وجود دستکم یک حرف مشترک روی هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار است. مشخصات کد محیط کشت در (جدول۲) تعریف شده است.

The presence of at least one common letter on each column indicates that there is no significant difference. The culture medium code specifications are defined in (Table 2).

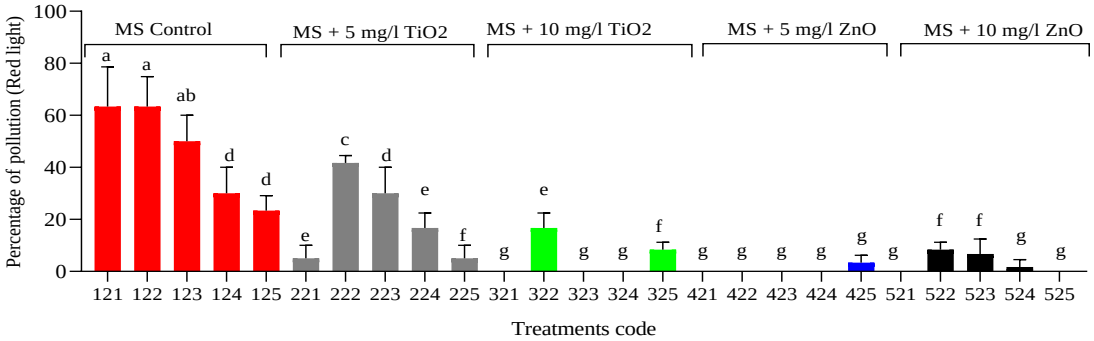
[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]





b



c

Fig. 4. a, b and c ; Percentage of fungal and bacterial contamination of ecotypes under the combination of blue and red, blue and red light and TiO2 and ZnO nanoparticles. The culture medium code specifications are defined in (Table 2).

شکل ۴- c و a, b; درصد آلودگی قارچی و باکتریایی اکوتیپ‌ها تحت تیمارترکیب نور آبی و قرمز، آبی و قرمز و نانو ذرات TiO_2 و ZnO، مشخصات کد محیط کشت در (جدول۲) تعریف شده است.

رویان رویشی و باززایی

یکی از راه‌های کاهش طول دوره رشد و تولید گیاهان در مقیاس وسیع و تجاری تولید و توسعه رویان‌های رویشی از طریق کشت بافت است. در رویان‌زایی رویشی، مجموعه‌ای از یاخته‌های غیرجنسی، تشکیل رویان می‌دهند. این رویان‌ها شبیه رویان‌های زیگوتی بوده و در محیط کشت مناسب می‌توانند به نهال تبدیل شوند. باززایی گیاهان با استفاده از رویان‌زایی رویشی از یک یاخته، در بسیاری از گونه‌های گیاهان به اثبات رسیده است (۳). در پژوهش حاضر محیط کشت MS همراه با ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

گیاهی Kin و 2.4-D برای القای رویان رویشی و باززایی گیاهچه‌ها تحت تیمارهای طیف نوری مورد مطالعه مناسب نبوده است (شکل ۵ و ۶، a) این امر احتمالا به دلیل نبودن تعادل مناسب نیترات و آمونیوم محیط کشت بوده است از سوی دیگر به دلیل سینرژیستی تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و اتیلن (سبب تشدید و آزاد شدن آنزیم پلی فنول‌اکسیداز شده و در نهایت سبب متلاشی سیتوپلاسم و واکوئل گیاه شده از سوی دیگر باعث قهوه‌ای و سیاه شدن ریزنمونه‌های (حتی پینه) کشت شده، می‌شود. تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D باعث تولید و افزایش اتیلن در محیط کشت شده است (۲۴). با ظهور القای پینه در محیط کشت MS همراه با ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kin و 2.4-D، پینه‌ها تبدیل به یک توده سفید برفکی شدند و اکثر یاخته‌های القا یافته از بین رفتند. نکته جالب این که اکثر یاخته‌های رویان‌زا در مرحله کروی یا قلبی شکل متوقف شدند. از بین رفتن یاخته‌های پیش‌رویان‌ی و کلروز و نکروز، شیشه‌ای شدن، کاهش فاصله واکشت در ریزنمونه‌ها و سوختگی بالا در پینه‌های القا یافته، و در نهایت مرگ یاخته‌های القا یافته مشاهده می‌شد. قابل ذکر است فعالیت توده سفید برفکی برخی از گیاهچه‌های باززا شده، باعث تخریب پوسته بیرونی گیاهچه‌ها و از بین رفتن آن‌ها شد، حتی با شروع فعالیت توده سفید بعضی ازپینه‌ها یا رویان‌های که در مسیر باززایی قرار داشتند، مهار باززایی گیاهچه‌ها صورت گرفت. (شکل ۷، a). این امر تا حدودی در مورد محیط کشت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره ZnO در تیمار ترکیب طیف نوری آبی و قرمز هم صادق است. باید اشاره کرد بافت‌های مختلف حاوی غلظت متفاوتی از تنظیم‌کننده های رشد است و وابستگی غلظت در بافت‌های مختلف متفاوت است. اما این مشکل احتمالا به دلیل عدم تشکیل بافت‌های آوندی چوبی بوده است یعنی بجای اینکه بافت اولیه Protoxylem به Metaxylem تبدیل شود و تمایز بافت به سمت بلوغ حرکت کند، از این عمل جلوگیری می‌شود. احتمال دارد فعالیت بالای رادیکال‌های آزاد، از فعالیت و جذب تنظیم‌کننده رشد گیاهی سایتوکنین در گیاهچه‌ها و رویان باززا شده جلوگیری کرده است. شاید بتوان گفت در محیط کشت‌های MS کامل نمک‌های معدنی، مثل نیترات به آمونیوم تبدیل شده و باعث تولید اتیلن در محیط کشت و افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد و آنزیم پلی فنول اکسیداز شده است. این پدیده می‌تواند باعث اختلال جذب تنظیم‌کننده رشد گیاهی، ماده‌های غذایی و ایجاد تاثیرات منفی و مخرب در ریزنمونه‌ها و همچنین گیاهان باززا شده شود (۴). در محیط‌های کشت ۱۰میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 و ZnO تحت تیمار ترکیب نور آبی و قرمز، مرحله‌های کروی، قلبی و اژدری شکل روی پینه‌های رویان‌زا قابل مشاهده بودند. یاخته‌های رویان‌زا به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم، در این محیط‌های کشت در کمترین زمان مشاهده شدند که این امر برای دو اکوتیپ شیراز و اردبیل مشهودتر بود. با این حال، در محیط‌های کشت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 و ZnO القای پینه رویان‌زا به سختی مشاهده شد و القای رویان رویشی به‌صورت غیرمستقیم صورت گرفت. معمولا اکثر رویان‌ها در این محیط‌های کشت تحت تیمار طیف نور آبی از بین رفتند (شکل ۶، c) یا در مرحله قلبی شکل متوقف شدند. انتقال پینه‌ها از طیف نور آبی به محیط کشت تحت تیمار طیف ترکیب آبی و قرمز، سبب شده پینه‌ها به فرم رویان‌زا تغییر پیدا کرده و رشد رویان‌های رویشی در کمترین زمان صورت گیرد. امکان دارد دلیل این تفاوت‌ها در بین محیط‌های کشت، حفظ تعادل pH در محیط‌های۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 و ZnO و عدم تعادل pH در محیط کشت بدون نانوذرات باشد. در این مطالعه ، با افزایش غلظت نانوذره TiO_2 و ZnO در محیط کشت درون شیشه‌ای، افزایش القای رویان رویشی مشهود بود، با این حال پینه و القای رویان رویشی در این محیط‌های کشت دارای کیفیت بالایی بودند، گیاهچه‌های این محیط کشت دارای رشد و اندازه مناسبی بودند. نانوذره TiO_2 و ZnO علاوه بر کنترل و تعادل pH محیط کشت، از فعالیت رادیکال‌ها آزاد جلوگیری کرده و فعالیت‌های انتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد، این امر از فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز جلوگیری می‌کند (۱۳). در پژوهش حاضر، محیط‌های که حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 و ZnO و تحت تیمار طیف ترکیب آبی و قرمز، حاوی پینه‌ها و رویان‌های زرد و سفید شیری و باززایی سالم و بدون سوختگی و قهوه‌ای شدن به رشد خود ادامه دادند. احتمال دارد دلیل این امر میزان بالای آنتی‌اکسیدانت‌ها که از فعالیت رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و حداقل فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز مهار کننده، دانست. هم‌چنین گیاهچه‌های باززا شده در این محیط‌های کشت، از رنگدانه‌های بالایی برخوردار بودند این امر بیشتر در مورد ۱۰میلی‌گرم بر لیتر نانوذره TiO_2 مشهود بود. نانوذره TiO_2 قادر است با بهبود جذب نور و فعالیت آنزیم ربیسکو و نیز افزایش جذب نیترات (۲۵) و تسریع در تبدیل ماده‌های غیر آلی به آلی (۲۰) باعث افزایش وزن تر و خشک گیاه شود. اگر چه دیوار

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

یاخته گیاهی مانند یک سد از ورود عوامل خارجی جلوگیری می‌کند، ولی نانوذرات با قطر کمتر از۲۰ نانومتر قادر هستند به راحتی از دیواره یاخته‌ای عبور کرده و وارد فضای داخلی یاخته و غشای پلاسمایی شوند (۱۹). هم‌چنین Leu و همکاران (۲۰۰۸) اظهار داشتند که بین نرخ فتوسنتز در گیاه اسفناج و نانوذره TiO_2 همبستگی زیادی وجود دارد که می‌تواند به دلیل بهبود جذب نور، انتقال و تبدیل انرژی نوری و با افزایش فعالیت آنزیم ربیسکو اکتیوار باشد. آن‌ها دریافتند که فعالیت روبیسکو اکتیوار تحت نانوذره TiO_2 افزایش یافت که منجربه بالا رفتن کربوکسیلاسیون روبیسکو و نرخ فتوسنتز و درنتیجه توسعه رشد گیاه شد. پژوهش‌ها نشان داده است که نانوذره TiO_2 قادر است با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو و مرگ یاخته جلوگیری کند (۱۵).

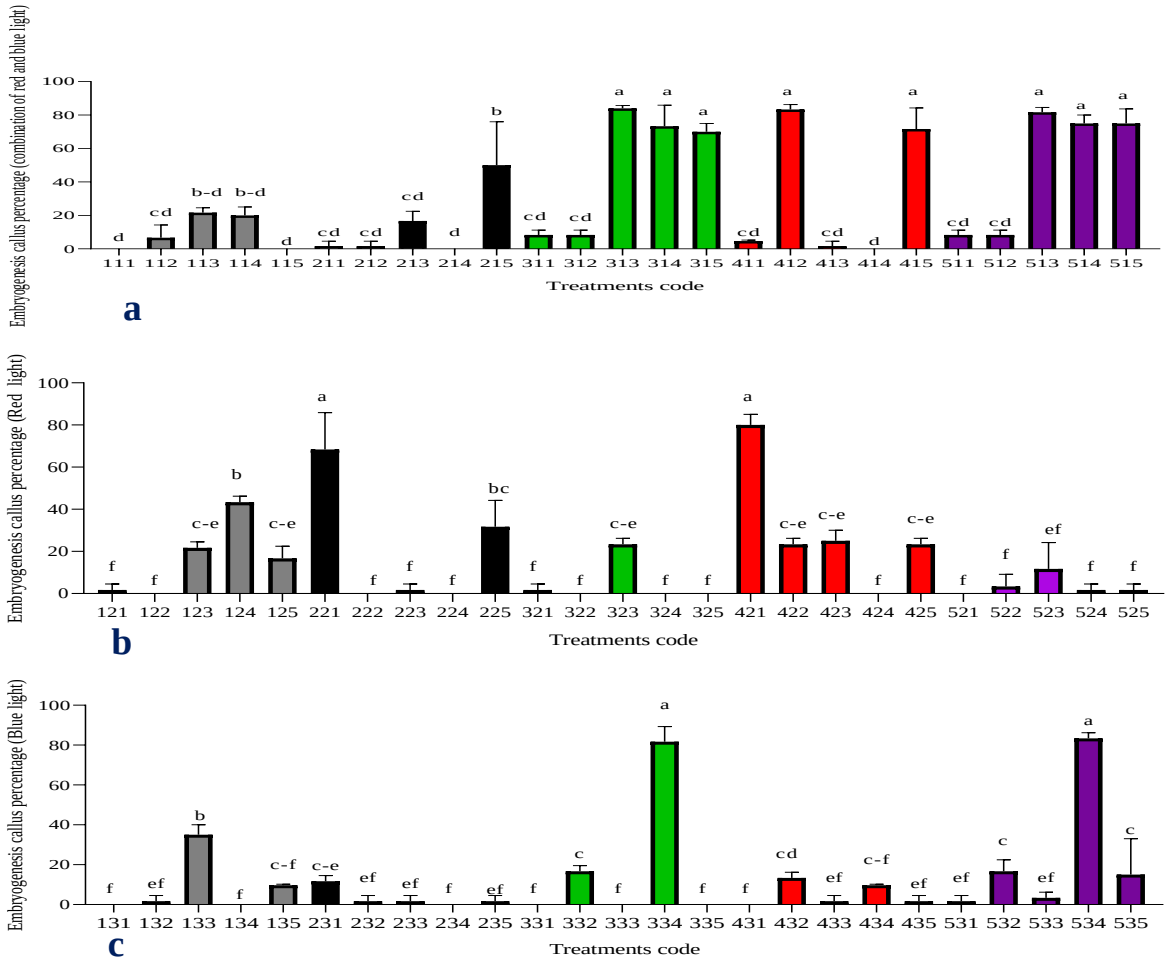


Fig. 5. a, b and c; Percentage of embryogenic calluses of ecotypes under the combination of blue and red, blue and red light and TiO_2 and ZnO nanoparticles. The culture medium code specifications are defined in (Table 2).

شکل ۵- c و a, b; درصد پینه رویان‌زا اکوتیپ‌ها تحت ترکیب نور آبی و قرمز، آبی و قرمز و نانو ذرات TiO_2 و ZnO. مشخصات کد محیط کشت در (جدول۲) تعریف شده است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

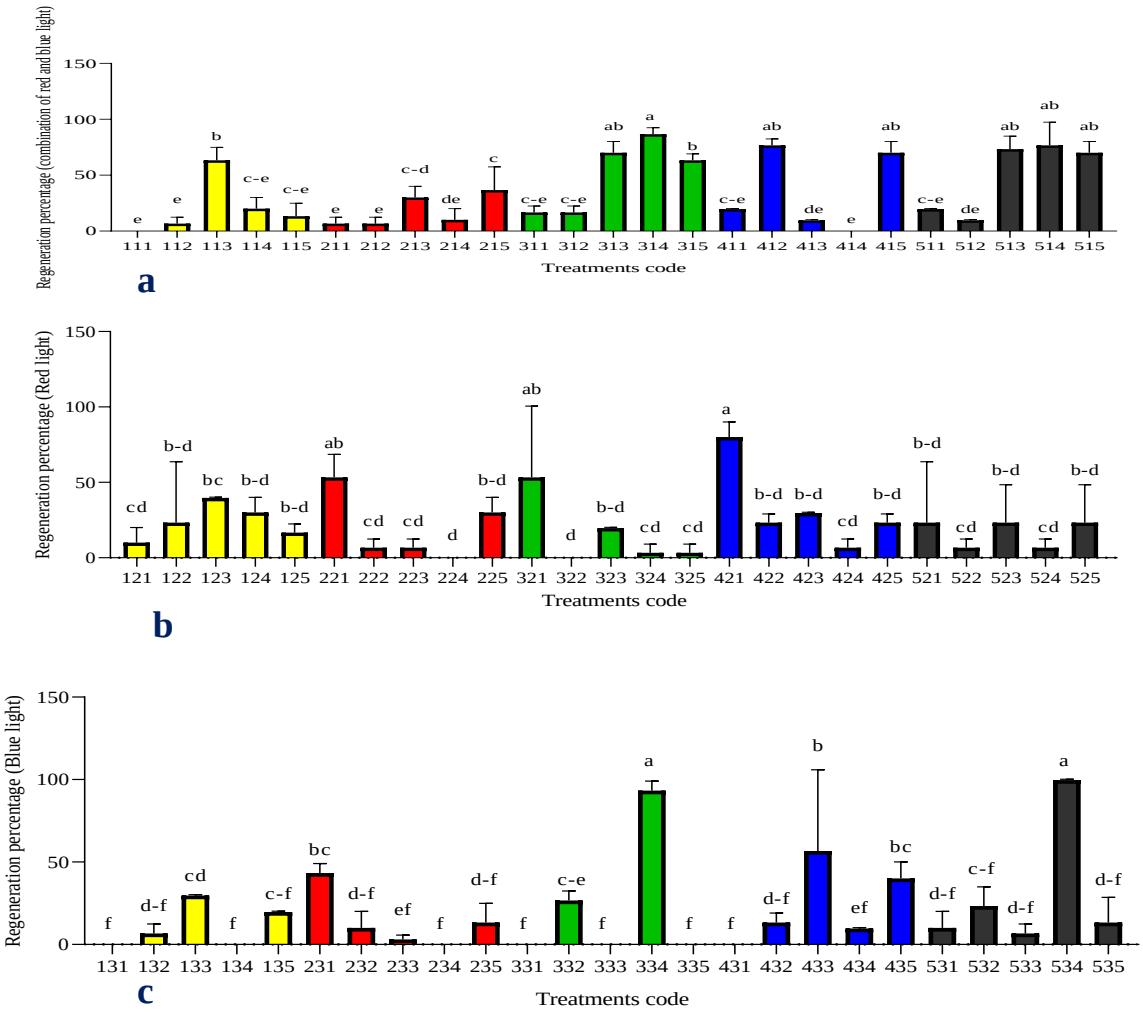
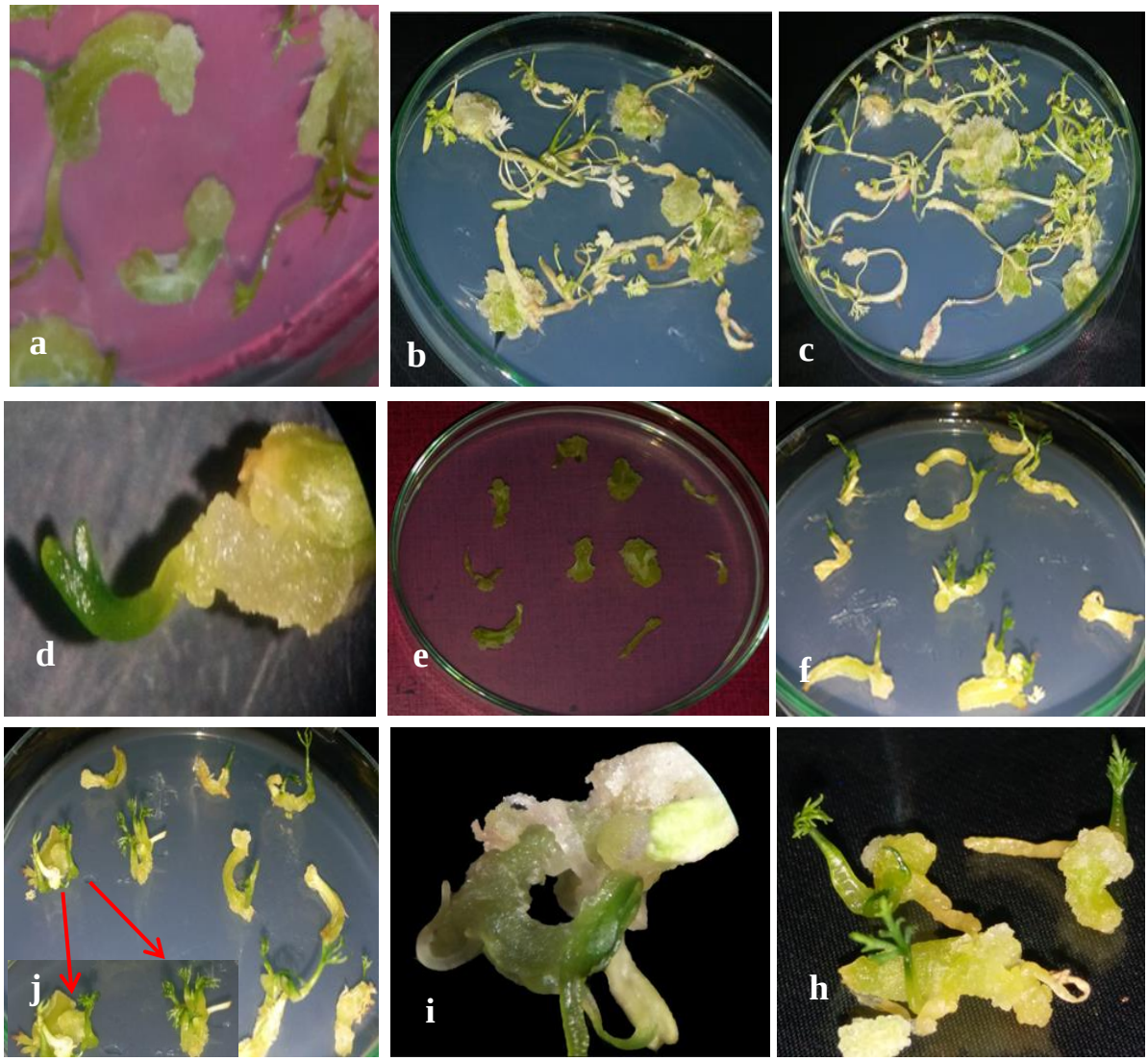


Fig. 6. a,b and c; Percentage of regeneration of ecotypes under the combination of blue and red light, blue and red and TiO_2 and ZnO nanoparticles,. The culture medium code specifications are defined in (Table 2).

شکل ۶- c و a, b; درصد باززایی اکوتیپ‌ها تحت ترکیب نور آبی و قرمز، آبی و قرمز و نانو ذرات TiO_2 و ZnO، مشخصات کد محیط کشت در (جدول۲) تعریف شده است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]



شکل ۷- a; القای پینه تحت تیمارهای تنظیم‌کننده رشدگیاهی b; القای پینه تحت تیمار نوری قرمز با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2. c; باززایی پینه‌های رویان‌های‌زا برای اکوتیپ سربیشه، تحت تیمار نوری قرمز، به ترتیب با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO. d; باززایی پینه رویان زا، مرحله لپه ای برای اکوتیپ سربیشه، تحت تیمار نوری قرمز، به ترتیب با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2. f و e; باززایی پینه‌های رویان‌زا به ترتیب برای اکوتیپ شیراز و اردبیل تحت تیمار نوری قرمز و آبی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2 j; باززایی اکوتیپ اردبیل با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO تحت تیمار نوری قرمز و آبی. i وh; باززایی پینه رویان‌زا برای اکوتیپ اردبیل، شیراز و سربیشه تحت تیمار نوری آبی و قرمز و با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر TiO_2.

Fig. 7. a; Callus induction under hormonal treatments b; callus induction under red light treatment with a concentration of 5 mg L^{-1} TiO2. d and c; regeneration of embryogenic calluses for Sarbishe ecotype, under red light treatment, with a concentration of 10 mg L^{-1} ZnO and TiO2 f and e; Regeneration of embryonic calli for Shiraz and Ardebil ecotypes under red and blue light treatment with a concentration of 10 mg L^{-1}. j; Regeneration of Ardebil ecotype with a concentration of 10 mg L^{-1}ZnO under red and blue light treatment. i,h; Regeneration of embryonic callus for Ardebil, Shizaz and Sarbisheh ecotypes under blue and red light treatment with a concentration of 10 mg $L^{-1}TiO_2$

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

ماتریس ضرایب همبستگی بین ویژگی‌ها

بر اساس میانگین داده‌ها، ماتریس ضرایب همبستگی بین ویژگی‌ها برای هر پنج اکوتیپ، محاسبه شد. مشاهده‌ها بر مبنای کلیه ویژگی‌ها نشان داد که با افزایش القای پینه، درصد القای رویان رویشی و باززایی گیاهچه‌ها افزایش می‌یابد. بیشترین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین ویژگی‌های درصد القای پینه رویان‌زا و درصد القای پینه (r= 0.99)، درصد القای پینه رویان‌زا و باززایی (r=0.83)، درصد القای پینه و باززایی (r=0.84)، درصد القای پینه و وزن تر پینه (r =0.52)، درصد پینه رویان‌زا با وزن تر پینه (r =0.42) و درصد القای پینه با مساحت پینه (r =0.43) است. لازم به ذکر است ویژگی‌های سرعت القای پینه و باززایی، همان‌طور که انتظار می‌رود، هیچ همبستگی با هم ندارند (r=0.36). مشاهدات بر مبنای کلیه ویژگی‌ها نشان داد که بیشترین همبستگی منفی و معنی‌دار بین ویژگی‌ها در درصد القای پینه و درصد آلودگی محیط کشت ($r =-0.40^{ns}$) است (شکل ۹). دومانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند با افزایش وزن تر پینه درصد القای پینه رویان‌زا نیز افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش درصد پینه، درصد پینه رویان‌زا نیز افزایش می‌یابد (۷).

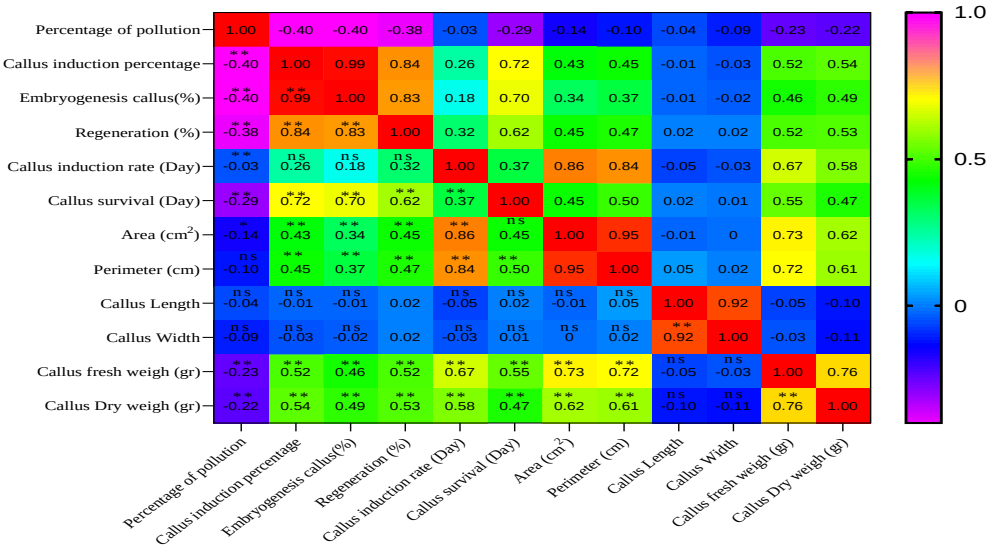


Fig. 8. Correlation degree with using Heat Map for the studied ecotypes.

شکل ۸- همبستگی ویژگی‌ها با استفاده از نقشه Heat Map.

نتیجه‌گیری

یکی از مشکلات کشت بافت، آلودگی باکتریایی و قارچی است. معمولا برای جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی در محیط کشت از آنتی بیوتیک‌ها استفاده می‌شوند این امر افزون بر اینکه برای تخریب محیط زیست، در به خطر انداختن سیستم ایمنی انسان نقش منفی ایفا می‌کند، در محیط کشت از القای پینه، تشکیل رویان رویشی و باززایی گیاهچه‌ها ممانعت به‌عمل می‌آورد. برای رهایی از این مشکل باید راهکار جدیدی را پیشنهاد کرد، امروزه در دنیا، از میان نانوذرات مختلف معمولا از نانوذرات TiO_2 و ZnO، در محیط کشت افزون بر رفع آلودگی قارچی و باکتریایی، به‌عنوان تحریک کننده و حمل ماده‌های غذایی و جذب راحت ماده‌های غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد به وسیله ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت صورت می‌گیرد و از سوی دیگر به القای پینه، القا و تشکیل رویان رویشی و باززایی گیاهچه‌ها کمک می‌کند. این امر به‌دلیل کاهش و تولید اتیلن در محیط کشت به وسیله ریزنمونه‌های کشت شده، ثابت بودن pH محیط کشت، شانس ضعیف تبدیل نیترات به آمونیاک بوده است. در نتیجه، با به‌کارگیری نانوذرات TiO_2 و ZnO موفق به ارائه یک پروتکل موثر و مفید برای القای رویان رویشی و باززایی در کمترین زمان در محیط کشت شد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

References منابع

1. Abdel Wahab, D., N. Othman. and A. Hamada. 2020. Zinc Oxide Nanoparticles Induce Changes in the Antioxidant Systems and Macromolecules in the Solanum nigrum Callus. J. Bot. 60(2): 503-517.
2. Allington, G.R.H., and T.J. Valone. 2010. Reversal of desertification: the role of physical and chemical soil properties. J. Arid Environ. 74(8): 973-977.
3. Alvarez, S.P., M.A.M. Tapia., M.E.G. Vega, E.F.H. Ardisana, J.A. C.Medina, G.L. F.Zamora. and D.V. Bustamante. 2019. Nanotechnology and Plant Tissue Culture. In Plant Nanobionics. Springer International Publishing, Cham, Switzerland. pp.333-370.
4. Chakroun, A., A. Jemmali, K.B. Hamed, C. Abdelli, and P. Druart. 2007. Effet du nitrate d'ammonium sur le développement et l'activité des enzymes anti-oxydantes du fraisier (*Fragaria x ananassa* L.) micropropagé. Biotech. Agron. Soc. Environ. 11 (2): 89–95
5. Chandana, B.C., H.C.Kumari Nagaveni, M.S. Heena, S.K. Shashikala. and D. Lakshmana.2018. Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. J. Pharm. 7(3): 246-251.
6. Chutipaijit, S., and T. Sutjaritvorakul. 2018. Titanium Dioxide (TiO2) nanoparticles induced callus induction and plant regeneration of indica rice cultivars (Suphanburi1 and Suphanburi90). J. Nanomater Bios. 13(4):1003-1010.
7. Dumani, Y., S.M.M., Mortazavian, A. Izadi-Darbandi, H. Ramshini., and M. Bahmankar. 2020. The Study of effective factors in callus induction, somatic vegetative and regeneration in *Paulownia ShanTong*. J. For. Res. 6(2): 347-366. (In Persion)
8. Dumani, Y., S.M.M. Mortazavian, A. Izadi-Darbandi, H. Ramshini., and F. Amini. 2022. Titanium dioxide nanoparticles affect somatic embryo initiation, development, and biochemical composition in *Paulownia sp* Seedlings. J. Ind. Crops Prod. 176 : 1-14
9. Ewais, E.A., S.A. Desouky, and E.H. 0Elshazly. 2015. Evaluation of callus responses of *Solanum nigrum* L. exposed to biologically synthesized silver nanoparticles. J. Nanosci Nanotechnol. 5 (3): 45-56.
10. Fazeli-nasab, B., and Z. Fooladvand. 2016. A review on Iranian *Carum copticum* L. Composition and biological activities. J. Med. Plants. 12(1):1-8.
11. Jain, S.M., and P.K. Gupta (Eds.). 2018. Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants. Springer: Cham, Switzerland. pp. 25–38.
12. Kasemets, K., A. Ivask, H.C. Dubourguier, and A. Kahru. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO2 to yeast Saccharomyces cerevisiae. J.Toxicol In Vitro. 23(6): 1116-1122.
13. Kouhi, S.M.M., M. Lahouti, A. Ganjeali, and M.H. Entezari. 2015. Comparative effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk particles, and Zn 2+ on *Brassica napus* after long-term exposure: changes in growth, biochemical compounds, antioxidant enzyme activities, and Zn bioaccumulation. J. Water Air Soil Pollut. 226(11): 364-375.
14. Kumar, K.R., K.P. Singh, D.V.S. Raju, R. Bhatia, and S. Panwar. 2020. Maternal haploid induction in African marigold (*Tagetes erecta* L.) through in vitro culture of un-fertilized ovules. Plant Cell Tissue Organ Cul. 143(3):549-564.
15. Lei, Z., S. Mingyu, W. Xiao, L. Chao, Q. Chunxiang, C. Liang, and Fashui, H. 2008. Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. J. Biol Trace Elem Res. 121(1): 69-79.
16. Lei, Z., M.Y. Su, X. Wu, C. Liu, C.X. Qu, L. Chen, and H. FS. 2008. Interactions between manufactured nanomaterials and plants. J. Biol. Trace Elem. Res. 121: 69-79.
17. Mahendran, D., P. B. Kavi Kishor, N. Geetha, and P. Venkatachalam. 2018. Phycomolecule-coated silver nanoparticles and seaweed extracts induced high-frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gloriosa superba* L. J. Appl. Psychol. 30(2): 1425-1436.
18. Mandeh, M., M. Omidi, M. Rahaie. 2012. In Vitro Influences of TiO2 Nanoparticles on Barley (*Hordeum vulgare* L.) Tissue Culture. J. Biol. Trace Elem. Res. 150: 376–380.
19. Moore, M. N. 2006. Environmental risk management–The state of the art. J. Environ. 32(8): 967-976.
20. Nair, R., S.H. Varghese, B.G. Nair, T. Maekawa, Y. Yoshida, and D.S. Kumar. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. J. Plant Sci. 179(3): 154-163.
21. Sharma K.S. Dubey. 2011.Biotechnology and conservation of medicinal plants. J. Expl Sci 2:60–61
22. Soltani Howyzeh, M., S.A. Sadat Noori, J. V., Shariati, and M. Niazian. 2018. Essential oil chemotype of Iranian Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). J. Essen. Oil Bear. Plants. 21(1): 273-276.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

23. Valizadeh, M., A., Safarnezhad, Nematzadeh, G.A., Kazemi, T.S. and H. Hamidi. 2008. Regeneration of Plantlets from Fragmented Embryo Explant of Parsi Zira (*Bunium persicum Boiss*). J..Seed Plant. 24(3): 389-397. (In Persion)
24. Wang, C., S.S. Li, and G.Z. Han. 2016. Commentary: plant auxin biosynthesis did not originate in charophytes. Front. J. Plant Sci. 7:158-165
25. Yang, F., F. Hong, W. You, C. Liu, F. Gao, C. Wu, and P. Yang. 2006. Influence of nano-anatase TiO 2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. J. Biol. Trace Elem. Res. 110(2): 179-190.
26. Zare, E., S. Pourseyedi. M. Khatami. and E. Darezereshki. 2017. Simple biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using nature's source, and it's in vitro bio-activity. J. Mol. Struct. 1146: 96-103.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 23 (3): 447-462 (2022)
Research article

Assessment of the Effect of Optical Spectra (LED) and TiO_2 and ZnO Nanoparticles on Vegetative Embryogenesis and Regeneration of Some Ecotypes in Ajowan (*Trachyspermum ammi* L)

N. Moradi, S.A. Sadat Noori, Y. Dumani and F. Amini[1]

Ajowan (*Trachyspermum ammi* L) belongs to the Apiaceae family. Using plant tissue culture techniques, plant genetic diversity can be conserved in a controlled environment. The aim of the present study was to investigate the effect of different concentrations of ZnO and TiO_2 nanoparticles and light qualities on somatic embryogenesis of ajowan and regeneration. The present experiment was framed in factorial (factors including ecotype, nanoparticles, optical spectrum) based on completely randomized design in three replicates. After the addition of nanoparticles to the MS medium, the explants were placed under red, blue, and light spectra and combined of them. The results showed that the use of ZnO and TiO_2 nanoparticles reduced the percentage of fungal and bacterial contamination compared to the control treatment. With increasing the concentration of TiO_2 nanoparticles under blue and red spectra, there was no contamination. Also, the highest rate of callogenesis, somatic embryogenesis and regeneration was obtained in Shiraz and Ardebil ecotypes with TiO_2 nanoparticle under the combinational use of blue and red spectra. The blue light spectrum had the greatest effect on the control of contamination using ZnO nanoparticle. The formation of embryonic cells increased in TiO_2 culture medium with a concentration of 10 mg L^{-1} under the combinational use of blue and red lights. With increasing nanoparticle concentration and light intensity, the accumulation of free radicals and activity of polyphenol oxidase were inhibited and the nutrient uptake by growing cells increased. In contrast, the regenerated control plants turned into white mass and causing the death of embryogenic calli, and seedlings. This study, using TiO_2 and ZnO nanoparticles, it was possible to present an effective and useful protocol for induction of vegetative embryo and regeneration in the shortest time in the culture medium.

Keywords: Callus induction, Free radicals, Nano particle, Optical spectra, Polyphenol oxidase enzyme.

1. Ph.D. Student, Professor, former M.Sc. Student and Assistant Professor of Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, respectively Pakdasht, Tehran, Iran.
* Corresponding Author, Email: (Na_moradi@ut.ac.ir).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.3.3.5]