

بررسی تأثیر نانومحرک‌ها بر رشد سلولی و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آن در کشت

سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی شیرین بیان سا (*Galega officinalis* L.)

سمیرا مینایی میناباد، رسول اصغری زکریا*، ناصر زارع و مریم خضری

ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

گالگین یکی از مواد مؤثره مهم در گیاه گالگا (*Galega officinalis* L.) است که به عنوان داروی کاهنده قند خون در درمان دیابت نوع دو مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد نانومحرک‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول و بافت گیاهی، راهکاری مفید جهت دستیابی به سطوح بالای ترکیبات با ارزش دارویی است. در این تحقیق تأثیر محرک‌های نانو نقره (۵، ۱۰ و ۲۰ mg/L)، نانو اکسید آهن (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/L) و نانو ذرات مولیبدن (۳۰، ۶۰ و ۹۰ mg/L) بر رشد سلول و تولید برخی متابولیت‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *G. officinalis* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاربرد نانوذرات نقره در کشت سوسپانسیون سلولی در غلظت ۵ و ۱۰ mg/L به مدت ۴۸ ساعت منجر به بیشترین محتوی گالگین شد. همچنین کاربرد نانواکسید آهن در غلظت ۱۰۰ mg/L و مولیبدن در غلظت ۶۰ mg/L نیز در درجه بعدی منجر به افزایش محتوی گالگین در کشت سوسپانسیون سلولی *G. officinalis* نسبت به شاهد شد. بیشترین محتوی فنول و فلاونوئید کل نیز در تیمار سلول‌ها با ۱۰۰ mg/L نانواکسید آهن حاصل شد. در کل، با توجه به اینکه تعدادی از تیمارهای مورد استفاده منجر به افزایش محتوی گالگین در مقایسه با شاهد شدند، می‌توان گفت که اعمال نانو محرک‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی را می‌توان برای تولید گالگین بیشتر از این گیاه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سوسپانسیون سلولی، گالگا (*Galega officinalis*)، گالگین، محرک‌های نانوفلزی

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: r-asghari@uma.ac.ir

مقدمه

گالگا (*Galega officinalis* L.) یک گیاه علوفه‌ای چندساله از خانواده بقولات (Fabaceae) است (۳۱ و ۳۲) که بومی جنوب شرقی اروپا و خاورمیانه (آسیای غربی) است (۴۷)، همچنین در چمن‌زارهای اروپای جنوبی و مزارع مرطوب در بریتانیا نیز به طور وحشی رشد می‌کند (۴۳). گالگا گیاهی بوته‌ای با گل‌های آبی و بنفش است که تا ارتفاع ۱/۵ متر رشد می‌کند و ساقه‌های منشعب، برگ‌های متقابل بیضوی یا نیزه‌ای و دمگل طویل دارد (۱۵). عصاره هیدروالکلی *G. officinalis* حاوی فلاونوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، رزین‌ها و استروئیدها است (۹،

۳۰ و ۴۷). همچنین این گیاه لگومی دارای دو ترکیب گوانیدینی نیتروژن‌دار به نام‌های گالگین (ایزوآمین گوانیدین) و هیدروکسی گالگین است که در تمام بخش‌های آن و طی مراحل نمو از جمله گلدهی و تشکیل میوه وجود دارند. گالگین و گوانیدین مواد مؤثره *G. officinalis* هستند (۳۵) که دارای خواص هیپوگلیسمی و گالاکتوزنیک هستند (۱۴ و ۳۱). متفورمین، فرم مصنوعی گالگین است که بر اساس مشتقات گوانیدینی جدا شده از *G. officinalis* تهیه شده و به عنوان داروی کاهنده قند خون در درمان دیابت نوع ۲ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴) و

ویژگی منحصربه‌فرد خود ورود گسترده‌ای به دنیای زیست‌شناسی و کشاورزی دارند (۴۱). خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی نانو ذرات آن‌ها را قادر می‌سازد تا به طور سودمند با سیستم متابولیک گیاهی در تعامل باشند (۲۵) و (۵۳). این ذرات در مقیاس بین ۱۰۰-۱ نانومتر، سطح ویژه بسیار بزرگ و انرژی بالایی دارند و به همین دلیل واکنش‌پذیری آنها بیشتر است (۳۳).

عوامل مختلفی مانند غلظت، مدت زمان قرارگیری در معرض محرک، سن کشت و ترکیب مواد مغذی نقش مهمی در تولید ترکیبات فعال زیستی بازی می‌کنند (۴۵). به علاوه، پاسخ به یک محرک خاص ممکن است از گیاهی به گیاه دیگر و بین لاین‌های سلولی مختلف بسیار متفاوت باشد. بنابراین، تعیین غلظت‌های مناسب محرک‌ها برای بهینه‌سازی تولید بسیار ضروری است (۶). با توجه به اهمیت گیاه گالگا، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر نانو محرک‌های فلزی بر برخی از فاکتورهای رشدی و همچنین میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی آن انجام شد.

مواد و روشها

تهیه سوسپانسیون سلولی: برای تهیه سوسپانسیون سلولی، یک گرم کالوس ترد ۴۵ روزه (حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط جامد (MS) حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin) انتخاب و به ۵۰ mL محیط کشت MS مایع، که در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده بودند، انتقال یافته و روی شیکر با دور ۱۱۰ دور در دقیقه و ۲۵°C قرار گرفتند (۳۴). لازم به ذکر است که محیط کشت مایع مورد استفاده حاوی همان تنظیم‌کننده‌های رشد برای القای کالوس بود. پس از استقرار کشت سوسپانسیون، برای تعیین بهترین لاین سلولی از نظر سرعت رشد، حجم ایستایی سلول (SCV) (Settled cell volume)، هر دو روز یک بار اندازه‌گیری و منحنی رشد آنها ثبت شد و بر این اساس، بهترین لاین

۱۹). استفاده از *G. officinalis* در طب سنتی به‌عنوان مکمل در درمان بیماری دیابت قندی در دوره قرون وسطی نیز گزارش شده است (۱۸ و ۴۷). امروزه نیز قسمت‌های هوایی گالگا به طور گسترده‌ای به عنوان یک داروی کاربردی در برابر دیابت، تب بدخیم، التهاب، عفونت انگلی، کرم‌های انگلی و افزایش تولید شیر مادر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۱).

متابولیت‌های ثانویه با منشأ گیاهی، فعالیت‌های زیستی گوناگونی داشته و ارزش تجاری فراوانی دارند اما تولید این مواد در گیاهان در شرایط طبیعی به وسیله عوامل محیطی، اکولوژیکی و آب و هوایی محدود می‌شود (۳۹). کشت سلولی برای تولید متابولیت‌های با ارزش در محیطی کنترل شده و مستقل از تغییرات آب و هوایی سودمند است (۱). از طرفی سلول‌های کشت بافت معمولاً مقادیر زیادی از ترکیبات ثانویه را فقط در شرایط خاص انباشت می‌کنند، این بدان معنی است که به حداکثر رساندن تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه توسط سلول‌های کشت شده نیاز به دستکاری عوامل محیطی، انتخاب لاین‌های سلولی پر بازده، تغذیه با پیش ماده و استفاده از محرک‌ها دارد (۲) و (۳۶).

استفاده از محرک‌ها در حال حاضر یکی از روش‌های مؤثر برای بهبود سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی در شرایط درون‌شیشه‌ای است (۱۰ و ۵۱). محرک‌ها، مولکول‌هایی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که با تحریک سیگنال‌های سلولی و برهمکنش مولکولی میان گیرنده‌های گیاهی در سطح غشای سلولی، بیان ژن‌های مرتبط در مسیر را تحریک می‌کنند و موجب سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (۵۶). محرک‌ها در یک غلظت دقیق می‌توانند در زمان مناسب به کشت سوسپانسیون اعمال شوند و سبب تولید میزان متابولیت بالا در مدت زمان کوتاه شوند (۲۶ و ۳۶). نانو ذرات از دسته محرک‌های غیر زیستی هستند که به دلیل اثرات خاص و

بافر فسفات سدیم ۵۰ mM حاوی گایاکول به همراه ۵۰ μ L عصاره سلولی و یک μ L H₂O₂ (۳۰٪) در کووت (Cuvette) ترکیب و مقدار عددی نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه با فاصله ۱۵ ثانیه قرائت گردید. برای محاسبه واحد آنزیمی از ضریب خاموشی معادل $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد (۵). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نیز، ۲/۵ mL بافر فسفات ۵۰ mM (pH=۷)، 200μ L پیروگالول (M) ۰/۰۲، و ۱۰۰ μ L عصاره آنزیمی مخلوط و در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه واحد آنزیمی از ضریب خاموشی معادل $24/7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد (۵).

اندازه‌گیری محتوای فنول، فلاونوئید کل و گالگین عصاره متانولی سلول‌ها: برای اندازه‌گیری میزان فنول و فلاونوئید کل و محتوای گالگین، عصاره متانولی سلول‌ها به روش Dorling و همکاران (۲۳) با اندکی تغییر تهیه شد: سلول‌ها با ازت مایع پودر شده و به ۳۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه ۱۰ mL متانول خالص اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵°C) و پس از آن به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. سپس عصاره‌های حاصل با کمک پمپ خلأ از کاغذ صافی واتمن عبور داده شده و در آون ۵۰°C تا ۱۰۰۰ μ L تغلیظ شد. سپس عصاره‌های به دست آمده از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری مقدار فنول کل، ۲۰۰ μ L از عصاره متانولی با ۲۰۰ μ L معرف فولین سیکالتو رقیق (۱۰:۱) و ۲/۵ mL آب دوبار تقطیر مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۲۵°C انکوبه شد. پس از آن ۳ mL بی‌کربنات سدیم ۰/۷٪ اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب در ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و منحنی استاندارد برحسب گالیک اسید با غلظت‌های

سلولی انتخاب و هر دو هفته زیرکشت شد تا به حجم مورد نظر برای اعمال تیمارهای محرک برسد (۳۴).

تحریک: برای تحریک سوسپانسیون‌های سلولی از غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ mg/L نانوذرات نقره (با اندازه ذرات ۸-۵ نانومتر)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/L نانو اکسید آهن (با اندازه ذرات زیر ۶۰ نانومتر)، و ۳۰، ۶۰ و ۹۰ mg/L نانوذرات مولیبدن (با اندازه ذرات ۸۰-۱۳ نانومتر) استفاده شد. هر غلظت در سه تکرار اعمال و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌ها برداشت شدند.

اندازه‌گیری رشد سلول‌ها: به منظور ارزیابی رشد در کشت سوسپانسیون سلولی از شاخص حجم ایستایی سلول (SCV) استفاده شد به این صورت که مقدار ۱۰ mL از محیط کشت حاوی سلول‌ها و توده‌های ریز سلولی در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری مدرج، به مدت ۳۰ دقیقه در حالت سکون نگهداری شدند، در نهایت حجم سلوهای رسوب کرده به عنوان حجم ایستایی سلول یادداشت شد (۲۷). همچنین برای اندازه‌گیری وزن تر سلول‌ها، سوسپانسیون موجود در ارلن‌ها بعد از گذراندن از کاغذ صافی واتمن (نمره ۴۲) و حذف محیط مایع وزن شد (۲۴).

اندازه‌گیری پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: جهت استخراج پروتئین محلول از روش علیپور و همکاران (۵) با اندکی تغییر استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا سلول‌های برداشت شده در ازت مایع پودر شده و به ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر حاصل، بافر سدیم فسفات (pH=۷) حاوی پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) ۱٪ و EDTA یک میلی‌مولار اضافه شد و سپس نمونه‌ها به خوبی ورتکس شده و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm در ۴°C سانتریفیوژ شدند، در نهایت فاز رویی برداشته شده و مورد استفاده قرار گرفت. میزان پروتئین محلول کل به روش برادفورد (۱۷) اندازه‌گیری شد. جهت ترسیم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) با ضریب تبیین بالای ۹۸٪ استفاده شد.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۹۵۰ μ L

آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p < 0.01$) با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶،۰ انجام گرفت.

نتایج

لاین سلولی با بیشترین میزان رشد، بر اساس اندازه‌گیری هر دو روز یک بار حجم ایستایی سلولی انتخاب شد (شکل ۱). طبق نتایج به دست آمده لاین سلولی شماره ۴، حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در محیط حاوی غلظت‌های ۳ mg/L 2,4-D و ۱ mg/L کینتین (Kin) بیشترین سرعت رشد را داشت. لاین مذکور تا زمان رسیدن به میزان مورد نیاز جهت اعمال نانو محرک هر دو هفته یکبار بازکشت شد (شکل ۲). همچنین انتهای فاز رشدی برای این لاین روز هشتم برآورد شد و نانو محرک‌ها در روز هشتم پس از همگن‌سازی به محیط کشت سلول‌ها اعمال شدند.

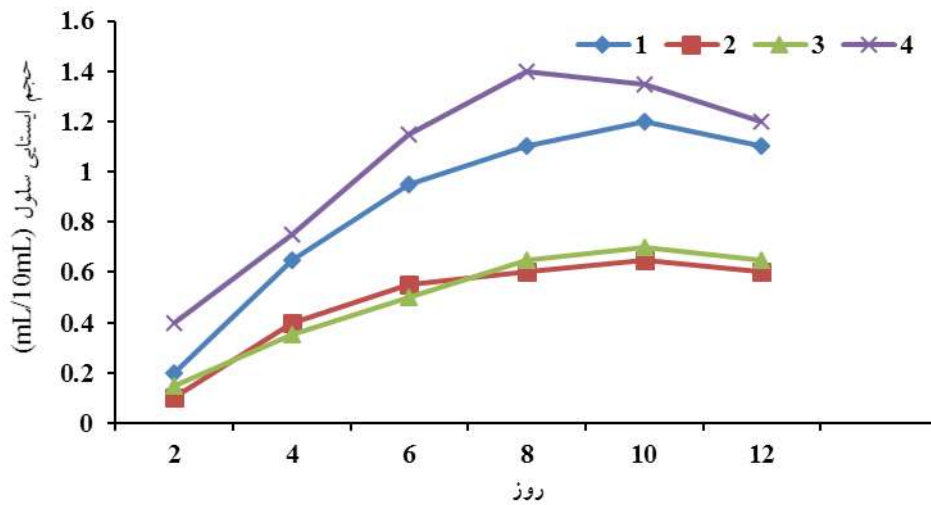
وزن تر و حجم ایستایی سلولی (SCV): بین غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره، آهن و مولیبدن از نظر تأثیر بر وزن تر و حجم ایستایی سلول (SCV) اختلاف معنی‌داری وجود داشت، اما از نظر زمان برداشت و اثر متقابل آن با نوع محرک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در هر سه نانو محرک مورد استفاده، افزایش غلظت نانو محرک، منجر به کاهش وزن تر سلول‌ها شد، به طوری که با کاربرد نانومحرک‌ها در غلظت پایین، وزن تر سلول‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد اما کاربرد غلظت‌های بالاتر این نانوذرات به طور معنی‌داری موجب کاهش وزن تر سلول‌ها شد (شکل ۳-الف). همچنین استفاده از نانو ذرات نقره، آهن و مولیبدن در کشت سوسپانسیون سلولی در غلظت‌های بالا منجر به کاهش معنی‌دار حجم ایستایی سلول شد. به طوری که بیشترین میزان حجم ایستایی سلول مربوط به نمونه شاهد بود که با غلظت پایین نانومحرک‌ها (۵ mg/L نقره، mg/L ۵۰ آهن و ۳۰ mg/L مولیبدن) اختلاف معنی‌دار نداشت ولی با افزایش غلظت نانومحرک‌ها میزان حجم ایستایی سلول به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳-ب).

مختلف (ppm ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰) ترسیم و میزان ترکیبات فنولی گیاه معادل گالیک اسید بر اساس منحنی استاندارد به صورت ppm اندازه‌گیری گردید (۴۸).

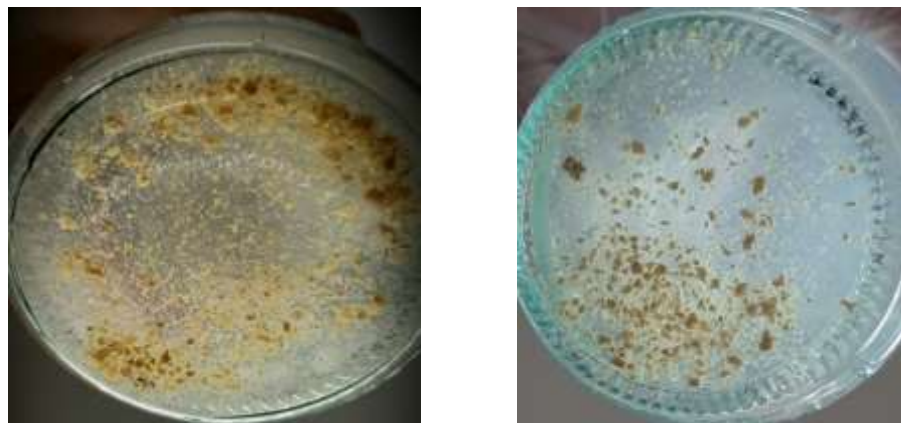
برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید، ۲۰۰ μ L عصاره متانولی با ۶۰۰ μ L متانول، ۱۰۰ μ L آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد (۱۰ گرم AlCl_3 در ۱۰۰ mL متانول)، ۱۰۰ μ L پتاسیم استات یک مولار و ۱۰۰۰ μ L آب مقطر مخلوط شد. محلول به دست آمده ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد و سپس در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) استاندارد کوئرستین استفاده شد (۲۰). قابل ذکر است برای تهیه بلانک (Blank)، همه مواد مورد استفاده برای اندازه‌گیری فاکتور مورد نظر به جز عصاره نمونه با هم ترکیب شدند و به جای عصاره نمونه از بافر عصاره‌گیری استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان گالگین، با استفاده از یک ستون فاز معکوس (250 mm x 4.6 mm) در سیستم YL9100 HPLC (YoungLin Clarity, South Korea) انجام شد. در فاز متحرک KH_2PO_4 ۰/۰۵ مولار و استونیتریل ۱۰٪ به ترتیب به نسبت ۷۰ به ۳۰ استفاده شد. pH با کمک ارتو فسفریک اسید (مرک) روی ۳/۵ تنظیم شد. میزان جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۲۰ μ L بود. برای تأیید حضور گالگین از استاندارد گالگین (Akos Consulting & Solutions GmbH, Germany AKOS 543-83-9) استفاده شد. غلظت گالگین در نمونه‌ها به روش کمی‌سازی و رسم منحنی استاندارد تعیین شد (۴۴).

آنالیز آماری: به منظور ارزیابی اثر نانو ذرات مختلف بر فاکتورهای رشدی و صفات بیوشیمیایی، تجزیه داده‌های حاصل در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و مقایسات میانگین داده‌ها بر اساس



شکل ۱- نمودار رشد لاین‌های سلولی مختلف در کشت سوسپانسیون سلولی *G. officinalis* لاین سلولی ۴ بیشترین سرعت رشد را داشت و انتهای فاز رشدی این لاین روز هشتم پس از بازکشت بود.

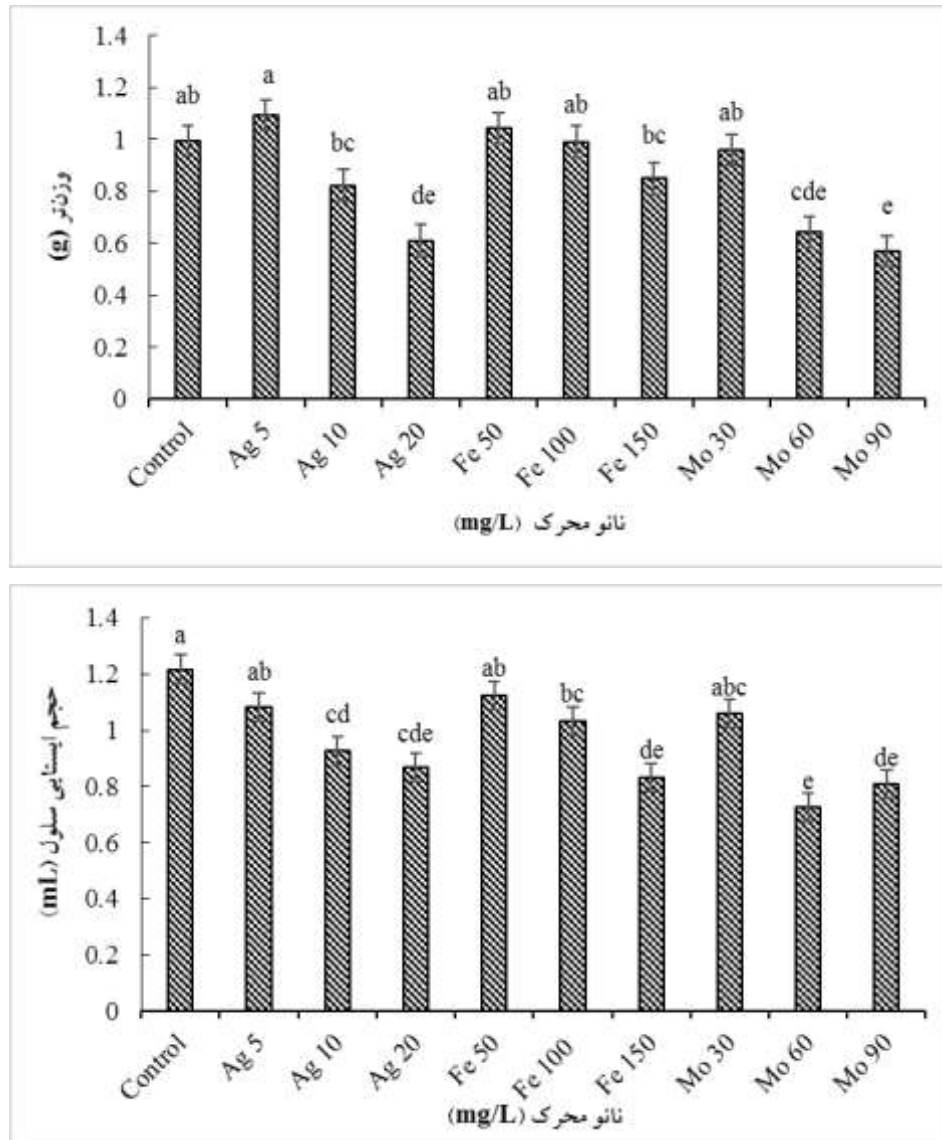


شکل ۲- سوسپانسیون سلولی *G. officinalis* در هفته دوم (راست) و هفته پنجم (چپ) پس از استقرار

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نانو محرک‌ها بر ویژگی‌های مختلف سلول‌های *G. officinalis* در کشت سوسپانسیون سلولی

منبع تغییر	درجه آزادی	وزن تر	SCV	پروتئین کل	پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	فنول کل	فلاونوئید کل	گالگین
نانو محرک (A)	۹	۰/۲۱۷**	۰/۱۵۲**	۰/۰۰۳**	۱۴۵/۲۷۲**	۱۶۷/۲۱۳**	۲/۵۱۶**	۷/۶۴۶**	۱/۵۳۶**
زمان برداشت (B)	۱	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۱۹ ^{ns}	۱۰۵/۴۸۲ ^{ns}	۰/۱۷۰*	۱/۶۷۲**	۰/۱۷۸**
A × B	۹	۰/۰۲۲ ^{ns}	۰/۰۲۵ ^{ns}	۰/۰۰۱**	۵۰/۶۶۱**	۱۶۷/۳۳۶**	۰/۱۵۹**	۱/۳۶۵**	۰/۹۰۳**
خطا	۴۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۱	۲/۸۴۰	۴۸/۳۹۳	۰/۰۳۴	۰/۰۶۵	۰/۰۹۶
ضریب تغییرات (%)		۱۶/۰۵	۱۳/۰۷	۹/۱۳	۱۲/۳۶	۲۳/۶۴	۱۱/۶۴	۱۱/۱۱	۵/۸۵

** و ^{ns} به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و اختلاف غیر معنی‌دار



شکل ۳- تأثیر نانو محرک‌های مختلف بر وزن تر (الف) و حجم ایستایی سلول (ب) در سوسپانسیون سلولی گیاه *G. officinalis*. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد توسط آزمون دانکن است.

محتوای پروتئین کل در سلول‌ها نسبت به شاهد شدند و سایر غلظت‌های مورد استفاده، از این نظر اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. در مجموع، بیشترین مقدار پروتئین کل در تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن با میانگین ۰/۱۷۳ mg/g وزن تر به دست آمد (جدول ۲). در مورد فعالیت آنزیم پراکسیداز، در تیمار ۲۴ ساعته افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۵ mg/L به ۱۰ و ۲۰ mg/L باعث افزایش فعالیت این آنزیم شد، در حالی که در مورد نانو اکسید آهن با افزایش غلظت از ۵۰ به ۱۰۰ mg/L فعالیت این آنزیم افزایش ولی در غلظت ۱۵۰ mg/L

محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز: طبق نتایج تجزیه واریانس، اثر سطوح مختلف نانومحرک و اثر متقابل آن با زمان برداشت از نظر محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار اما اثر زمان برداشت معنی‌دار نبود (جدول ۱). کاربرد اغلب تیمارهای محرک مورد استفاده (غیر از ۵ mg/L نقره و ۹۰ mg/L مولیبدن) به مدت ۲۴ ساعت، موجب افزایش سطح پروتئین کل شدند، ولی در تیمار ۴۸ ساعته تنها غلظت‌های ۱۰ mg/L نقره و ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن موجب افزایش

سلول‌ها با نانو ذرات نقره، اکسید آهن و مولیبدن به مدت ۲۴ ساعت، با افزایش غلظت نانو ذرات مذکور تا سطح متوسط محتوای فنول کل افزایش یافت اما اعمال بالاترین غلظت مورد استفاده از این نانو ذرات (یعنی ۲۰ mg/L نانو نقره، ۱۵۰ mg/L نانو اکسید آهن و ۹۰ mg/L نانو ذرات مولیبدن) منجر به کاهش میزان فنول کل در سلول‌ها شد، با این حال میزان فنول کل در این حالت در تمام سلول‌های تیمار شده نسبت به شاهد بیشتر بود. در تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، سطوح پایین و متوسط نانوذرات مورد استفاده موجب افزایش معنی‌دار محتوای فنول کل شد. اما، بالاترین غلظت مورد استفاده در هر سه نانو محرک موجب کاهش معنی‌دار محتوای فنول کل نسبت به غلظت‌های پایین‌تر شد و با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. در مجموع بیشترین میزان فنول کل در سلول‌های تیمار شده مربوط به تیمار با ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و ۱۰ mg/L نانو ذرات نقره به مدت ۴۸ ساعت بود. همچنین کمترین مقدار فنول کل به همراه تیمار شاهد مربوط به تیمار ۹۰ mg/L نانوذرات مولیبدن به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد (جدول ۲).

در تیمار ۲۴ ساعته، با افزایش غلظت نانو محرک‌های مورد استفاده، مقدار فلاونوئید کل افزایش نشان داد. در تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، کاربرد سطوح متوسط نانو محرک (یعنی ۱۰ mg/L نانو نقره، ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن و ۶۰ mg/L نانو ذرات مولیبدن) موجب افزایش محتوای فلاونوئید کل شد. هر چند تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن به مدت ۴۸ ساعت نیز باعث افزایش معنی‌دار در مقدار فلاونوئید کل نسبت به شاهد شدند ولی اعمال سایر تیمارها نسبت به شاهد در این حالت معنی‌دار نبود. در مجموع، بیشترین میزان فلاونوئید کل در سلول‌های تیمار شده مربوط به تیمار ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن به مدت ۴۸ ساعت با میانگین ۵/۶۱ mg/g وزن تر بود (جدول ۲).

آن دوباره کاهش یافت. برای نانو اکسید مولیبدن نیز فعالیت این آنزیم در غلظت ۶۰ mg/L آن بیشتر از غلظت‌های ۳۰ و ۹۰ mg/L آن بود. در تیمار ۴۸ ساعته با افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۵ به ۱۰ mg/L فعالیت این آنزیم افزایش ولی در غلظت ۲۰ mg/L آن دوباره کاهش یافت. در حالی که در مورد نانو اکسید آهن تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف آن در تیمار ۴۸ ساعته مشاهده نشد. در مورد نانو اکسید مولیبدن نیز بین غلظت ۳۰ و ۶۰ mg/L آن تفاوت معنی‌داری از لحاظ فعالیت این آنزیم مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت آن به ۹۰ mg/L کاهش در فعالیت این آنزیم مشاهده شد به طوری که در این غلظت با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار ۱۰۰ mg/L نانو اکسید آهن و کمترین میزان آن مربوط به تیمار شاهد و ۵ mg/L نقره هر دو با زمان تیمار ۲۴ ساعت بود (جدول ۲).

میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در سلول‌های تیمار شده تا حدودی متفاوت بود به طوری که در تیمار ۲۴ ساعته از بین محرک‌های مورد استفاده، تنها غلظت ۱۰ mg/L نانوذرات نقره منجر به افزایش معنی‌دار میزان فعالیت این آنزیم شد. در تیمار سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، تنها تیمارهای ۵ mg/L نانوذرات نقره، ۵۰ mg/L نانو اکسید آهن و ۶۰ mg/L نانو ذرات مولیبدن موجب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز شدند، و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. در مجموع، بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز متعلق به تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با ۱۰ mg/L نانو نقره و تیمار ۴۸ ساعته آنها با ۵۰ mg/L نانو اکسید آهن و ۶۰ mg/L نانو ذرات مولیبدن بود (جدول ۲).

میزان فنول و فلاونوئید کل: اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات، زمان برداشت و اثر متقابل آنها بر میزان فنول و فلاونوئید کل سلول‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). در تیمار

جدول ۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف نانومحرک از لحاظ برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی سلول‌ها در سوسپانسیون سلولی *G. officinalis*

تیمار	زمان (ساعت)	پروتئین کل (mg/g)	پراکسیداز (mg/g)	پلی فنول اکسیداز (mg/g)	فنول کل (mg/g)	فلاونوئید کل (mg/g)	گالگین (mg/g)
شاهد	۲۴	۰/۰۷۰۷ ^j	۳/۰۷۰ ⁱ	۱۹/۹۱۹ ^{cde}	۰/۴۲۳ ^l	۰/۷۰۳ ^l	۳/۳۲۵ ^f
	۴۸	۰/۰۹۳۹ ^{ghi}	۷/۵۷۵ ^{gh}	۱۰/۰۴ ^e	۰/۸۷۶ ^{jk}	۱/۲۴۶ ^{ijk}	۴/۷۶۶ ^{de}
۵	۲۴	۰/۰۸۰۵ ^{hij}	۴/۸۹۵ ^{hi}	۱۳/۹۶۷ ^{de}	۱/۴۰۹ ^{fg}	۱/۲۸۶ ^{jk}	۴/۳۵۳ ^{ef}
	۴۸	۰/۱۱۱۵ ^{c-g}	۱۳/۰۹۳ ^{cde}	۲۵/۳۰۳ ^{a-d}	۱/۸۲۵ ^{de}	۱/۹۳۷ ^{hi}	۸/۸۱۳ ^a
۱۰ (mg/L)	۲۴	۰/۱۱۷۳ ^{b-f}	۱۴/۶۱۶ ^{cd}	۳۶/۵۹۹ ^a	۲/۲۳۲ ^{bc}	۲/۰۹۵ ^{gh}	۵/۸۲۳ ^{cde}
	۴۸	۰/۱۳۴۰ ^b	۲۰/۶۷۱ ^b	۱۸/۰۱۶ ^{cde}	۲/۴۵۵ ^{ab}	۲/۵۵۵ ^{def}	۷/۷۹۸ ^{ab}
۲۰	۲۴	۰/۱۱۶۰ ^{b-f}	۱۵/۲۵۶ ^{cd}	۲۵/۱۴۱ ^{a-d}	۱/۳۲ ^{fgh}	۲/۱۲۵ ^{fgh}	۷/۳۰۳ ^b
	۴۸	۰/۰۹۷۴ ^{fgh}	۱۲/۴۶۳ ^{def}	۱۲/۸۳۴ ^{de}	۱/۰۵۷ ^{hij}	۱/۵۱۷ ^{ij}	۵/۷۲۲ ^{cde}
۵۰	۲۴	۰/۱۳۱۱ ^{bc}	۱۲/۲۱۷ ^{def}	۲۴/۳۷۲ ^{a-d}	۲/۱۱۲ ^{cd}	۱/۶۲۴ ^{ij}	۴/۳۱۱ ^{ef}
	۴۸	۰/۱۰۳۰ ^{fg}	۱۴/۷۲۹ ^{cd}	۳۶/۳۱۵ ^{ab}	۲/۱۵۹ ^{bc}	۲/۷۷۹ ^{de}	۶/۳۹۳ ^{cd}
۱۰۰ (mg/L)	۲۴	۰/۱۷۳۲ ^a	۲۶/۳۸۹ ^a	۲۲/۴۶۹ ^{cde}	۲/۳۹۵ ^{ab}	۳/۸۳۷ ^c	۵/۹۶۸ ^{cd}
	۴۸	۰/۱۲۷۶ ^{bcd}	۱۶/۱۹۶ ^c	۱۲/۵۹۱ ^{de}	۲/۶۵۹ ^a	۵/۶۰۵ ^a	۶/۴۷۳ ^{cd}
۱۵۰	۲۴	۰/۱۳۳۲ ^b	۱۹/۵۱۸ ^b	۱۶/۳۱۵ ^{cde}	۱/۵۷۱ ^{ef}	۴/۴۱۷ ^b	۵/۲۹۲ ^{de}
	۴۸	۰/۱۰۴۸ ^{efg}	۱۳/۷۱۵ ^{cde}	۱۴/۲۱ ^{de}	۱/۱۹۱ ^{ghi}	۳/۰۰۳ ^d	۳/۶۹۷ ^{ef}
۳۰	۲۴	۰/۱۰۴۲ ^{efg}	۱۱/۲۸۶ ^{ef}	۲۸/۷۰۴ ^{abc}	۱/۰۰۱ ^{ij}	۱/۰۰۰ ^{kl}	۴/۵۶۸ ^{def}
	۴۸	۰/۱۲۴۷ ^{b-e}	۱۴/۲۰۳ ^{cde}	۲۳/۲۷۹ ^{b-e}	۱/۲۰۹ ^{ghi}	۱/۴۹۴ ^{ij}	۳/۲۵۹ ^f
۶۰ (mg/L)	۲۴	۰/۱۰۷۹ ^{defg}	۱۹/۵۰۳ ^b	۱۹/۵۹۵ ^{cde}	۱/۷۹۷ ^e	۱/۶۸۷ ^{hij}	۶/۶۱۸ ^{cd}
	۴۸	۰/۱۰۵۷ ^{efg}	۱۶/۱۶ ^c	۲۸/۳۸ ^{abc}	۲/۲۳۷ ^{bc}	۲/۶۲۶ ^{de}	۶/۸۶۲ ^{bc}
۹۰	۲۴	۰/۰۷۴۷ ^{ij}	۹/۷۶۷ ^{fg}	۱۹/۲۷۱ ^{cde}	۱/۰۳۸ ^{hij}	۲/۴۸۳ ^{efg}	۴/۱۹۲ ^{ef}
	۴۸	۰/۰۷۷۸ ^{ij}	۷/۱۶۹ ^{gh}	۱۸/۸۶۶ ^{cde}	۰/۶۹۵ ^{kl}	۱/۸۳۴ ^{hi}	۳/۵۰۸ ^f

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد توسط آزمون دانکن است.

به طور معنی‌داری بیشتر شد. ولی با افزایش غلظت آن به ۱۵۰ mg/L میزان گالگین کاهش یافت و با شاهد در این حالت تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲). هم چنین غلظت ۶۰ mg/L نانو ذرات مولیبدن، هم در تیمار ۲۴ و هم در تیمار ۴۸ ساعته موجب افزایش معنی‌دار میزان گالگین در سلول‌ها نسبت به شاهد شد، اما سایر تیمارهای این نانو محرک، تغییر معنی‌داری از نظر محتوای گالگین با شاهد نشان ندادند. در مجموع بیشترین میزان محتوای گالگین در تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۵ و ۱۰ mg/L ذرات نقره به دست آمد (جدول ۲).

میزان گالگین: نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که در تیمار سلول‌ها با نانو ذرات نقره به مدت ۲۴ ساعت، با افزایش غلظت نانو نقره محتوای گالگین در سلول‌ها افزایش یافت، برعکس در تیمار ۴۸ ساعته افزایش غلظت این نانومحرک به ۲۰ mg/L منجر به کاهش میزان گالگین شد. در تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با نانو اکسید آهن، افزایش غلظت محرک تا سطح ۱۰۰ mg/L بدون اختلاف معنی‌دار با غلظت ۱۵۰ mg/L باعث افزایش میزان گالگین نسبت به شاهد شد. اما در تیمار ۴۸ ساعته آن در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ mg/L بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر، مقدار گالگین نسبت به شاهد

بحث و نتیجه‌گیری

محرک‌ها در واقع مواد شیمیایی یا فاکتورهای زیستی یا منشأ مختلف هستند که قادر به ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در موجود زنده بوده (۵۵) و از آن‌ها برای افزایش زیست توده و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (۴۹). با این حال، تحقیقات مختلف نتایج متفاوتی در این مورد گزارش کرده‌اند که احتمالاً به تحمل گیاه و غلظت نانو محرک اعمال شده وابسته باشد. به عنوان مثال، استفاده از نانوذرات نقره در کشت‌های سوسپانسیون سلولی *Linum usitatissimum* L. وزن تر سلول‌ها را در مقایسه با تیمار شاهد، چندین برابر افزایش داد (۵۲). از طرفی، اثرات وابسته به دوز نانوذرات نقره بر رشد درون شیشه‌ای گیاه *Lupinus Termis* L. گزارش شده است، به طوری که در غلظت‌های پایین‌تر آن رشد گیاه بیشتر می‌شود ولی غلظت‌های بالاتر آن اثر بازدارنده دارند (۱۱). نتایج حاضر نشان داد که در بیشتر موارد، افزایش غلظت نانو ذرات نقره، اکسید آهن و مولیبدن منجر به کاهش وزن تر و حجم ایستایی سلول‌ها نسبت به شاهد شد. این امر می‌تواند از سمیت و ایجاد تنش اکسیداتیو (تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROS) ناشی از غلظت‌های بالای این نانو ذرات باشد که منجر به کاهش رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود.

گیاهان با دو سازوکار دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی ROSهای حاصل از تیمار با فلزات سنگین را از بین برده و از آسیب آنها به ترکیبات غشاء و ماکرومولکول‌های سلولی جلوگیری می‌کنند (۱۲). در دفاع آنزیمی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید-دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز (۵۰) و در سازوکار غیر آنزیمی محتوای متابولیت‌هایی مانند پرولین، کارتنوئیدها، ویتامین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها (۲۹ و ۵۰) در سلول دستخوش تغییر می‌شود. یون‌های فلزی نظیر آهن، مس، روی، کبالت و نیکل که جز عناصر کم مصرف

هستند، در فعالیت‌های کارکردی بسیاری از پروتئین‌های مشارکت‌کننده در حفظ رشد و نمو موجودات زنده نقش دارند. با وجود این، غلظت‌های بالای آنها می‌تواند برای موجودات زنده مضر باشند (۷ و ۲۶). افزایش میزان پروتئین کل و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه در شرایط اعمال نانومحرک‌ها نشان می‌دهد که سلول‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی با جهش‌های اکسایش ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مواجه بوده و از طریق افزایش فعالیت این آنزیم‌ها که نقش کلیدی در پالایش ROSها دارند سعی در حذف اثرات منفی آنها می‌کند. با این حال، با افزایش بیشتر غلظت این نانوذرات سلول توانایی کافی برای مقابله با آنها را نخواهد داشت و این ممکن است از سمیت بالای این عناصر در غلظت‌های بالا و کاهش فعالیت متابولیکی سلول ناشی شود. گزارش شده است که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حضور غلظت‌های پایین نانو ذرات افزایش یافته در حالی که غلظت‌های بالاتر نانو ذرات موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌شود (۴۶). نتایج حاصل (جدول ۲) نشان داد که میزان پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز در سلول‌های تیمار شده با نانو محرک‌های نقره، اکسید آهن و مولیبدن بسته به غلظت و مدت زمان اعمال نانو محرک متفاوت است و به طور معمول در غلظت‌های متوسط این عناصر افزایش محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز مشاهده می‌شود. مشابه با نتایج ما گزارش شده است که مقدار پروتئین کل و نیز فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) (۸) و *Lepidium draba* L. (۱۳) به دوز و مدت زمان اعمال نانو محرک وابسته است.

همچنین، در این تحقیق، نوع و غلظت نانومحرک‌های مورد استفاده منجر به تغییر معنی‌دار در میزان فنول، فلاونوئید کل شد. به طوری که کاربرد نانو اکسید آهن به ویژه در غلظت ۱۰۰ mg/L منجر به بیشترین افزایش در میزان این

صفات شد. تولید مداوم ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در پاسخ به مواد محرک ممکن است به عوامل مختلفی مانند سن گیاه، دوز ماده محرک و مدت زمان تیمار بستگی داشته باشد (۳۸ و ۴۰). این ترکیبات می‌توانند با اتصال به ذرات فلزات سنگین اثرات تنش حاصل از آنها را کاهش دهند و مقاومت سلول‌های گیاهی را در برابر تنش بالا ببرند (۲۲). به نظر می‌رسد افزایش محتوای فنول‌ها و فلاونوئیدها در سلول در پاسخ به تنش حاصل از حضور نانوذرات در غلظت‌های متوسط می‌تواند در کاهش اثرات تنش مؤثر باشد. گزارش شده است که نقره به عنوان بازدارنده قوی اتیلن می‌تواند با مهار فعالیت اتیلن، سنتز فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها را افزایش دهد (۱۲).

از نانوذرات فلزی می‌توان به عنوان یک محرک مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه در بیوتکنولوژی گیاهی استفاده کرد (۵۴). کارایی تحریک برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه به گونه گیاهی، ترکیبات مورد نظر، نوع و غلظت محرک‌ها و زمان تیمار بستگی دارد (۲۱). در تحقیق حاضر کاربرد نانومحرک‌های نقره، آهن و مولیبدن منجر به افزایش وابسته به دوز محتوای گالگین در سلول‌ها شد. در واقع حضور این نانوذرات در محیط کشت می‌تواند با اعمال تنش به سلول، سیگنال‌های سلولی لازم برای افزایش بیان ژن و تحریک فعالیت آنزیم‌های مورد نیاز در مسیر بیوشیمیایی تولید این متابولیت‌های ثانویه را در کشت‌های سلولی سبب شوند. افزایش متابولیت‌های پاپاورین، تبائین و کدئین در سوسپانسیون سلولی پاپاور (*Papaver*

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با کاربرد محرک در کشت سوسپانسیون سلولی *G. officinalis* می‌توان محتوای گالگین را در مدت زمان کوتاهی افزایش داد. بر این اساس، می‌توان از کشت وسیع سوسپانسیون سلولی این گیاه برای تولید مقدار زیاد گالگین برای اهداف تجاری استفاده کرد. این کار می‌تواند با استفاده از بیوراکتورهای مختلف انجام شود. همچنین این یافته‌ها می‌تواند برای مطالعات بیشتر در زمینه کشت سوسپانسیون سلولی گیاه گالگا به عنوان ابزاری برای مهندسی متابولیک گیاهی آن مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر، در دانشگاه محقق اردبیلی و در قالب طرح پژوهشی مربوط به پایاننامه کارشناسی ارشد به شماره ۵۱/۲۴۵۴ انجام شد و اعتبار آن از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه تأمین گردید که بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

۱. احمدی، ج.، محمدی، ر.، گروسی، ق.، حسینی، ر. ۱۳۹۱. بهینه سازی کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*) مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱: ۱-۱۸.

۲. سیاه منصور، ش.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف. ۱۳۹۷. تأثیر محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی بر رشد ریشه موئین

۳. بایسته، ب.، ابریشم‌چی، پ.، اصیلی، ج.، ذاکر، آ. ۱۴۰۰. تولید درون شیشه‌ای تانشینون‌ها در ریشه‌های نوپدید گیاه برازمیل *Perovskia abrotanoides* Kar. با استفاده از نیترات نقره و عصاره مخمر. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۴(۱): ۱۳۹-۱۵۱.

۱. احمدی، ج.، محمدی، ر.، گروسی، ق.، حسینی، ر. ۱۳۹۱. بهینه سازی کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*) مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱: ۱-۱۸.

۲. سیاه منصور، ش.، اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف. ۱۳۹۷. تأثیر محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی بر رشد ریشه موئین

۳. بایسته، ب.، ابریشم‌چی، پ.، اصیلی، ج.، ذاکر، آ. ۱۴۰۰. تولید درون شیشه‌ای تانشینون‌ها در ریشه‌های نوپدید گیاه برازمیل *Perovskia abrotanoides* Kar. با استفاده از نیترات نقره و عصاره مخمر. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۴(۱): ۱۳۹-۱۵۱.

۴. شرفی، ا. ۱۳۹۰. بررسی اثر نانومواد آهن و روی بر تولید هایپرین در کشت کالوس و کشت سوسپانسیون سلولی گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شاهد، ایران.
۵. علیپور، س.، نصیبی، ف.، فرهمند، ه. ۱۳۹۳. بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سدیم نیترو پروساید (SNP) بر صفات فیزیولوژیکی و افزایش عمر گلجایی گل شاخه بریده مریم (*Polianthes tuberosa* L.). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۹۰۴-۹۱۴.
۶. فرجامی‌نژاد، ر.، زارع، ن.، اصغری زکریا، ر.، فرجامی‌نژاد، م. ۱۳۹۴. تاثیر ال-تیروزین بر تولید تبائین در کشت سوسپانسیون
- سلولی خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum*). فصلنامه گیاهان دارویی ۱۵(۲): ۱۱۰-۱۱۹.
۷. قاسمی ب.، حسینی، ر.، دهقان‌نیری، ف. ۱۳۹۴. تأثیر نانو الیستورهای کبالت و کیتوزان بر میزان تولید آرتیمیزین و بیان دو ژن کلیدی SQS و DBR2 در گیاه (*Artemisia annua*). دوفصلنامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ۲۵: ۴-۳۹.
۸. یوسفی، ک.، ریاحی مدوار، ع.، باقی‌زاده، ا. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر الیستورهای نقره و مس بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در گیاهچه‌های زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بومی ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۱۰: ۲۸۰-۲۲۳.
9. Abtahi-Evari S-H, Shokoohi M, Abbasi A, et al. 2017. Protective Effect of *Galega officinalis* extract on streptozotocin-induced kidney damage and biochemical factor in diabetic rats. Crescent J Med Biol Sci. 4: 108-114.
10. Akula R, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signal Behav 6: 1720-1731.
11. Al-Huqail AA, Hatata MM, Al-Huqail AA, Ibrahim MM. 2018. Preparation, characterization of silver phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings. Saudi J Biol Sci 25: 313-319.
12. Alaoui-Sossé B, Genet P, Vinit-Dunand F, et al. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. Plant Sci. 166: 1213-1218.
13. Aminizadeh M, Riahi mali, Mohammadi M. 2016. Nano-Metal oxides induced sulforaphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). Prog. Biophys. Mol. Biol. 6 (1): 75-83.
14. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Ares I, Martínez MA. 2018. Poisonous Plants of the Europe. In: Veterinary Toxicology. Elsevier, pp 891-909.
15. Bézard M, Grancher D, Vialard J, Debarnot P. 2002. Un troupeau ovin intoxiqué par le galéga officinal. Point Vétérinaire 33: 66-67.
16. Bondarian F, Omid M, Torabi S. 2013. The effect of nanoelicitors on alkaloid production of *Papaver somniferum* in suspension cell culture. Int J Curr Res. 7 (10): 20955-20957.
17. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254
18. Carlson TJ, King SR. 1997. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. Diabetologia 40: 614-617.
19. Chan LK, Lim PS, Choo ML, Boey PL. 2010. Establishment of *Cyperus aromaticus* cell suspension cultures for the production of Juvenile hormone III. Vitro Cell Dev Biol. 46: 8-12.
20. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J food drug Anal 10.
21. Chong TM, Abdullah MA, Lai OM, et al. 2005. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. Process Biochem. 40: 3397-3405.
22. Chung IM, Rajakumar G, Subramanian U. 2019. Impact of copper oxide nanoparticles on enhancement of bioactive compounds using cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. Appl Sci 9:2165
23. Dorling PR, Colegate SM, Huxtable CR. 2004. Poisonous sedges: the galegine content of *Schoenus rigens* at various growth stages. Poisonous plants Relat toxins 298-303
24. Farjaminezhad R, Garoosi G. 2019. New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. 3 Biotech 9:1-17

25. Fazal H, Abbasi BH, Ahmad N, Ali M. 2016. Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. Appl Biochem Biotechnol. 180: 1076–1092.
26. Ghazvini RF, Heidari R. 2011. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. Mashhad University Press.
27. González-Cabrero N, Ruiz-Galea M, Alegre J, et al. 2018. Growth, morphology and maturation ability of *Pinus pinea* embryogenic suspension cultures. Plant Cell, Tissue Organ Cult 135:331–346.
28. Hatami M, Naghdi Badi H, Ghorbanpour M. 2019. Nano-Elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells: A review. Journal of Medicinal Plants, 18(71): 6-36.
29. Hsieh T-H, Lee J, Charng Y, Chan M-T. 2002. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. Plant Physiol. 130: 618–626.
30. Kahkeshani N, Hadjiakhoondi A, Maafi N, Khanavi M. 2015. Standardization of a galactogogue herbal mixture based on its total phenol and flavonol contents and antioxidant activity. Res J Pharmacogn. 2: 35–39.
31. Karakas FP, Turker AU, Karakas A, Mshvildadze V. 2016. Cytotoxic, anti-inflammatory and antioxidant activities of four different extracts of *Galega officinalis* L. (Goat's rue). Trop J Pharm Res. 15: 751–757.
32. Luka C., Omoniva B. 2012. Effect of some phytochemicals extracted from goat's rue (*Galega officinalis*) on some biochemical parameters in normal and alloxan-induced diabetic rats. Nat Prod PLANT Resour. 2: 628–632.
33. Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. Sci Total Environ. 408: 3053–3061.
34. Mendoza D, Cuaspud O, Arias JP, et al. 2018. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. Biotechnol reports 19:e00273
35. Mooney MH, Fogarty S, Stevenson C, et al. 2008. Mechanisms underlying the metabolic actions of galegine that contribute to weight loss in mice. Br J Pharmacol. 153: 1669–1677.
36. Mulabagal V, Tsay H-S. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J Appl Sci Eng. 2: 29–48.
37. Murasnige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tohaoco tissue cultures. Physiol plant. 15: 473–497.
38. Murthy HN, Lee E-J, Paek K-Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 118: 1–16.
39. Nagella P, Murthy HN. 2011. Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 104: 119–124.
40. Namdeo AG. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacogn Rev. 1: 69–79.
41. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, et al. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol. 2(1): 1-35.
42. Österman J, Chizhevskaja EP, Andronov EE, et al. 2011. *Galega orientalis* is more diverse than *Galega officinalis* in Caucasus—whole-genome AFLP analysis and phylogenetics of symbiosis-related genes. Mol Ecol. 20:4808–4821.
43. Pundarikakshudu K, Patel JK, Bodar MS, Deans SG. 2001. Anti-bacterial activity of *Galega officinalis* L.(Goat's Rue). J Ethnopharmacol. 77: 111–112.
44. Raigond P, Kaundal B, Sood A, et al. 2018. Quantification of biguanide and related compounds (anti-diabetic) in vegetables and fruits. J Food Compos Anal 74:82–88
45. Ramezannezhad R, Aghdasi M, Fatemi M. 2019. Enhanced production of cichoric acid in cell suspension culture of *Echinacea purpurea* by silver nanoparticle elicitation. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 139: 261–273.
46. Rizwan M, Ali S, Qayyum MF, et al. 2017. Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: a critical review. J Hazard Mater 322:2–16

47. Shokri F, Shokoohi M, Abadi ARR, Kalarestaghi H. 2019. The ameliorative effect of *Galega officinalis* extract on histological damages, oxidative stress induced by torsion-detorsion in adult rats' ovarian. *Int J Womens Heal Reprod Sci.* 7:119-123.
48. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178
49. Soleimani T, Keyhanfar M, Piri K, Hasanloo T. 2012. Morphological evaluation of hairy roots induced in *Artemisia annua* L. and investigating elicitation effects on the hairy roots biomass production. *Int J Agric Res Rev.* 2:1005-1013.
50. Tang L, Kwon S-Y, Kim S-H, et al. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep.* 25: 1380-1386.
51. Thakur M, Bhattacharya S, Khosla PK, Puri S. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 12: 1-12.
52. Zahir A, Nadeem M, Ahmad W, et al. 2019. Chemogenic silver nanoparticles enhance lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 136: 589-596.
53. Zaka M, Abbasi BH, Rahman L, et al. 2016. Synthesis and characterisation of metal nanoparticles and their effects on seed germination and seedling growth in commercially important *Eruca sativa*. *IET Nanobiotechnol.* 10: 134-140.
54. Zhang B, Zheng LP, Yi Li W, Wen Wang J. 2013. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Curr Nanosci.* 9: 363-370.
55. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 23: 283-333.
56. Zhao J, Sakai K. 2003. Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J Exp Bot.* 54: 647-656.

Evaluation of the effect of nanoelicitors on cell growth and some biochemical properties in cell suspension culture of *Galega officinalis* L.

Minaei Minabad S., Asghari Zakaria R., Zare N. and Khezri M.

Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

Abstract

Galegine is one of the most important active ingredients in the Galga (*Galega officinalis* L.), which is used as a drug for lowering blood sugar in the treatment of type 2 diabetes. The use of nano-elicitors to increase the production of secondary metabolites in plant cell and tissue culture is a useful method to achieve high levels of compounds with medicinal worth. In this study, the effects of nano-silver (5, 10, and 20 mg/L) stimuli, iron nano oxide (50, 100, and 200 mg/L), and molybdenum nanoparticles (30, 60, and 90 mg/L) on cell growth and production of some metabolites were studied in cell suspension culture of *G. officinalis*. The results showed that the application of silver nanoparticles in cell suspension culture at 5 and 10 mg/L for 48 h resulted in the highest galegine content. Also, the application of 100 mg/L iron nano oxide and 60 mg/L molybdenum led to an increase in galegine content in the cell suspension culture of *G. officinalis* compared with the control. The highest content of total phenols and flavonoids was obtained in the treatment of cells with 100 mg/L iron nano oxide. In general, considering that some treatments used increased the content of galegine in comparison with the control, it can be suggested that applying nano-elicitors in the cell suspension culture can be used to produce more galegine of this plant.

Keywords: Cell suspension, *Galega officinalis*, Galegine, Nanoelicitors