

Effect of nano-elicitors on the production of some secondary metabolites in hairy roots of Galega (*Galega officinalis* L.)

Parisa Ghanbari Namin 

MSc Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: parisaghanbari.6217@gmail.com

Rasool Asghari Zakaria 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: r-asghari@uma.ac.ir

Nasser Zare 

Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: zarenasser@yahoo.com

Maryam Khezri 

PhD Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: m.khezri09@ymail.com

Abstract

Objective

Galega (*Galega officinalis* L.) from the leguminous family is used to treat diabetes. Hairy root culture is a valuable system for the production of secondary metabolites on a large scale. The use of elicitors in plant tissue and cell culture is one of the most efficient biotechnological tools for inducing biosynthesis and accumulation of secondary metabolites. This study aimed to investigate the effect of iron, silver, and silicon nanoparticles on growth and galegine content in hairy roots of *G. officinalis*.

Materials and methods

In this study, induction of hairy roots in leaf, cotyledon, and hypocotyl explants of *G. officinalis* was performed using the A4 strain of *Rhizobium rhizogenes*, and the effect of different

concentrations of silver, silicon, and iron oxide nano-elicitors on growth and galegine, phenol, and flavonoids content of hairy roots was investigated.

Results

The highest rate of root induction was obtained in leaf explants with an average of 5 roots per explant. The highest root growth rate belonged to the treatments with 50 and 100 mg l⁻¹ silicon nanoparticles for 72 h. Application of all levels of silver, iron, and silicon elicitors for 36 h resulted in a significant increase in the total phenol content of hairy roots. Thus that the highest amount of total phenol was obtained in 36 h treatment of roots with a concentration of 100 mg l⁻¹ of silicon nanoparticles without significant difference with 10 and 20 mg l⁻¹ silver nanoparticles. Also, the highest amount of total flavonoids was obtained at 200 mg l⁻¹ iron nanoparticles for 36 h; and the highest content of galegine was obtained in the treatment of roots with 10 and 20 mg l⁻¹ silver, and 100 mg l⁻¹ silicon nanoparticles for 36 h.

Conclusions

The appropriate type and concentration of elicitors is an effective factors in the response of hairy roots to nano-elicitors. The highest yield of galegine (17.55 mg) was obtained in the treatment of roots with 50 mg l⁻¹ of silicon nanoparticles for 72 h. This can be attributed to both better growth of hairy roots and high galegine content at this treatment.

Keywords: Galegine, Hairy roots, Nano-elicitors, Secondary metabolites

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ghanbari Namin P, Asghari Zakaria R, Zare N, Khezri M (2022) Effect of nano-elicitors on the production of some secondary metabolites in hairy roots of Galega (*Galega officinalis* L.). *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 171-192.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 171-192 DOI: 10.22103/jab.2022.18713.1363

Received: May 8, 2022.

Received in revised form: June 19, 2022.

Accepted: June 20, 2022.


Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

تأثیر محرک‌های نانو فلزی بر تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین گیاه دارویی شیرین بیان سا (*Galega officinalis* L.)

پرینسا قنبری نمین 


دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: parisaghanbari.6217@gmail.com

رسول اصغری زکریا 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: r-asghari@uma.ac.ir

ناصر زارع 

استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: Zarenasser@yahoo.com

مریم خضری 

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: m.khezri09@ymail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۰

چکیده

هدف: گیاه شیرین بیان سا (*Galega officinalis* L.) از خانواده لگومینوز است که در درمان دیابت از آن استفاده می‌شود. کشت ریشه‌های مویین سیستم ارزشمندی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه در مقیاس وسیع است. کاربرد محرک‌ها در کشت بافت و سلول گیاهی، یکی از ابزارهای زیست‌فناورانه کارآمد برای القاء بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه است. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر نانو ذرات آهن، نقره و سیلیکون بر محتوای گالگین در کشت ریشه‌های مویین گیاه *G. officinalis* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق القای ریشه‌های مویین در ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و هیپوکوتیل *G. officinalis* با استفاده از سویه A4 باکتری *Rhizobium rhizogenes* انجام و تأثیر غلظت‌های مختلف نانو محرک‌های نقره، سیلیکون و اکسید آهن بر رشد ریشه و محتوای گالگین، فنول و فلاونوئید کل ریشه‌های مویین بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از تلقیح ریزنمونه‌های مختلف گیاه *G. officinalis* با سوبه A4 نشان داد که بیشترین میزان القای ریشه در ریزنمونه‌های برگ با میانگین پنج ریشه در هر ریزنمونه به دست آمد. در بین ریشه‌های موبین تیمار شده با محرک، بیشترین میزان رشد ریشه متعلق به تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۷۲ ساعت بود. کاربرد تمامی سطوح محرک‌های نقره، آهن و سیلیکون به مدت ۳۶ ساعت منجر به افزایش معنی‌دار میزان فنول کل ریشه‌های موبین شد به طوری که بیشترین میزان فنل کل در تیمار ریشه‌ها با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۳۶ ساعت و با میانگین ۳/۰۹ میلی‌گرم بر گرم به دست آمد. همچنین بر اساس نتایج، بیشترین میزان فلاونوئید کل در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید آهن به مدت ۳۶ ساعت و بیشترین میزان محتوای گالگین در تیمار ریشه‌ها با ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۳۶ ساعت به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نوع و غلظت مناسب نانو محرک عامل مؤثری در میزان پاسخ ریشه‌های موبین به نانو محرک‌ها است. بیشترین عملکرد گالگین (۱۷/۵۵ میلی‌گرم) در تیمار ریشه‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۷۲ ساعت به دست آمد. این امر را می‌توان هم به رشد بهتر ریشه‌های موبین و هم به محتوای بالای گالگین در این غلظت نسبت داد.

کلیدواژه‌ها: ریشه‌های موبین، گالگین، متابولیت‌های ثانویه، نانو محرک‌ها

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: قنبری نمین پریسا، اصغری زکریا رسول، زارع ناصر، خضری مریم (۱۴۰۱) تأثیر محرک‌های نانو فلزی بر تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های موبین گیاه دارویی شیرین بیان سا (*Galega officinalis* L.). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۴ (۳)، ۱۷۱-۱۹۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

گیاه شیرین بیان سا (*G. officinalis* L.) از زیر خانواده Faboidea و از خانواده بقولات است که به طور گسترده به عنوان یک محصول علوفه‌ای، زینتی، دارویی و کود سبز کشت می‌شود. *G. officinalis* یک گیاه چند ساله با گل‌های سفید، آبی، بنفش و ریشه‌های بلند است و در مناطق معتدل از جنوب شرقی اروپا، خاورمیانه، آسیای غربی و بخشی از ایالات متحده آمریکا یافت می‌شود (Bailey and Day 2004). حدود ۲۰ ماده فعال بیولوژیکی از قبیل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، گلوکوزیدها و ساپونین‌ها از *G. officinalis* استخراج شده‌اند (Atanasov 2016). متفورمین یکی از داروهای مهم بی‌گوانیدینی است که بر اساس مشتقات گوانیدینی جدا شده از *G. officinalis* تهیه شده است (Chan et al. 2010). گیاهان انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه از

جمله ترپنوئیدها، فنول‌ها، تانن‌ها و آلکالوئیدها را تولید می‌کنند که به عنوان واسطه‌های حیاتی برای تعامل با سایر عوامل زنده یا غیر زنده در شرایط تنش عمل می‌کنند (Hatami et al. 2019). تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش از طریق کشت بافت یا سلول گیاهی، جایگزین مناسبی برای استخراج مواد از کل گیاه است زیرا بسیاری از گیاهان که محصولات با ارزش دارویی تولید می‌کنند به سختی در سطح انبوه قابل کشت هستند، همچنین در مواردی، میزان متابولیت‌های موجود در کشت‌های درون‌شیشه‌ای بسیار بیشتر از میزان آن در گیاه کامل است (Vakil and Mendhulkar 2013). رشد سریع، سهولت نگهداری، توانایی سنتز طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی، و عدم نیاز به کاربرد تنظیم‌کننده رشد خارجی، کشت ریشه‌های مویین را به منبعی پایدار برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش دارویی، محصولات آرایشی و افزودنی‌های مواد غذایی تبدیل کرده است (Kastell et al. 2013). ریشه مویین در واقع یک بیماری است که به وسیله باکتری گرم منفی خاکزی با نام *Rhizobium rhizogenes* (که پیش‌تر با نام *Agrobacterium rhizogenes* شناخته می‌شد) ایجاد می‌شود (Gutierrez-Valdes et al. 2020). انتخاب ریزنمونه، سوبه باکتری، محیط کشت مناسب و استفاده از آنتی‌بیوتیک مناسب برای حذف باکتری عامل مهمی در ایجاد سیستم کشت ریشه مویین است (Malik et al. 2016). استفاده از محرک‌ها یکی از ابزارهای مؤثر و پرکاربرد برای القای بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در کشت بافت گیاهی است (Akula and Ravishankar, 2011; Halder et al. 2019; Wang and Wu 2013). محرک‌ها، ترکیباتی زیستی و یا غیر زیستی هستند که سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌کنند (Omidi and Abdollahi 2015). در واقع محرک‌ها ممکن است فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان را القا و سازوکارهای دفاعی را فعال کنند. استفاده از مولکول‌های پیام‌رسان به‌عنوان محرک، روشی کارآمد برای تولید ترکیبات فعال دارویی در گیاهان محسوب می‌شود (Hatami et al. 2019). محرک‌ها بسته به منشأ و ساختار مولکولی آنها، به محرک‌های فیزیکی یا شیمیایی تقسیم‌بندی می‌شوند (Radman et al. 2003). از این بین، نانوذرات از جمله محرک‌های شیمیایی و غیر زنده هستند که به دلیل اثرات خاص و ویژگی منحصر به فرد خود ورود گسترده‌ای به دنیای بیولوژی و کشاورزی داشته‌اند (Oberdörster et al. 2005). این ذرات در مقیاس بین ۱۰۰-۱ نانومتر به دلیل نسبت سطح به حجم بالا و انرژی سطحی زیاد واکنش‌پذیری بالایی دارند (Ma et al. 2010). از طرفی، نانوتکنولوژی یک حوزه علمی چندرشته‌ای است که مجموعه‌ای از ابزارها و تکنیک‌های برگرفته از مهندسی، فیزیک، شیمی و زیست‌شناسی را به کار می‌گیرد (Heidarpour et al. 2011; Mohammadabadi et al. 2009; Mohammadabadi and Mozafari, 2018). پیشرفت‌های علم و فناوری نانو، ساخت و شناسایی حامل‌های زیست فعال زیر میکرونی را به صورت معمول امکان‌پذیر کرده است. تحویل مواد فعال زیستی به نقاط هدف و رفتار آزادسازی آنها مستقیماً تحت تأثیر اندازه ذرات است (Mortazavi et al. 2005; Zarrabi et al. 2020). در مقایسه با حامل‌های میکرونی، نانوحامل‌ها نسبت سطح به حجم بیشتری را فراهم می‌کنند و پتانسیل افزایش حلالیت، بهبود رهاسازی کنترل‌شده و امکان هدف‌گیری دقیق مواد محبوس‌شده را به میزان بیشتری دارند (Heidarpour et al. 2011; Mohammadabadi and Mozafari 2019). نانو ذرات نقره را می‌توان به عنوان یک محرک مؤثر برای تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان استفاده کرد (Zhang et al. 2013). این ذرات همچنین

عاملی قوی در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا هستند (Ahmadi et al. 2012; Tadayon et al. 2016). نانو ذرات نقره ذراتی آبدوست با خواص ویژه و قطری در حدود یک تا ۱۰۰ نانومتر هستند که هسته آنها را اکسید نقره در بر گرفته است (Park et al. 2006). به دلیل داشتن سطح ویژه بالا و فرکانس زیاد اتم‌های سطحی، نانو ذرات نقره نسبت به نقره دارای خواص ضد میکروبی بیشتری هستند (Abdi et al. 2008). با استفاده از نانو ذرات نقره و دی‌اکسید تیتانیوم میزان آلوئین در کشت سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا افزایش یافت (Raee et al. 2016). آهن جزء عناصر ریزمغذی محسوب می‌شود اما از آنجایی که این عنصر به عنوان کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌ها عمل می‌کند و در فعالیت اکسیداسیون و احیا نقش اصلی را دارد، بسیار حائز اهمیت است (Sharafi et al. 2013). تیمار با نانو ذرات اکسید آهن باعث ایجاد تنش اکسایشی در گیاهان می‌شود (Kamali et al. 2017)، از سوی دیگر تأثیر کاربرد نانو ذرات اکسید آهن در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان بر افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است. با کاربرد نانو ذرات اکسید آهن در کشت ریشه‌های مویین *Dracocephalum kotschyi* بیشترین مقدار فلاونوئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به دست آمد (Nourozi et al. 2019). سیلیکون (Si)، دومین عنصر فراوان در پوسته زمین، اثرات مفیدی بر رشد و بهره‌وری انواع گونه‌های گیاهی دارد. بخشی از اثرات مفید Si بر گیاهان با اثرات مستقیم یا غیر مستقیم آن بر دیواره سلولی مرتبط است (Wang et al. 2021). مطالعات نشان داده‌اند که افزودن Si به محیط کشت، آسیب اکسیداتیو و قهوه‌ای شدن فنولی را کاهش می‌دهد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تولید متابولیت‌های ثانویه و تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را افزایش می‌دهد (Wang et al. 2021). کاربرد سیلیکون همچنین فعالیت H^+ -ATPase غشای پلاسمایی را افزایش می‌دهد، که ممکن است با کاهش آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها به واسطه سیلیکون مرتبط باشد (Gheisary et al. 2018; Liang et al. 2014; Sivanesan and Jeong 2007). بر اساس بررسی منابع انجام شده، مطالعات زیادی در مورد القای ریشه‌های مویین در گیاه *G. officinalis* و اثر تیمارهای الیستور بر آن انجام نشده است. بنابراین، با توجه به اهمیت این گیاه و تولید ریشه‌های مویین آن، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر نانو محرک‌ها بر برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در کشت ریشه‌های مویین آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به منظور شکستن خواب بذر، بذور *G. officinalis* به مدت نیم ساعت با اسید سولفوریک ۹۸ درصد تیمار شدند، سپس ضدعفونی سطحی آنها زیر هود لامینار انجام شد، بدین صورت که بذور به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد غوطه‌ور شدند. سپس ۴ الی ۵ بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور ضدعفونی شده، به منظور جوانه‌زنی به مدت ۵ روز در آب آگار در دمای ۲۵ درجه و شرایط تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت ۵ روز، بذور جوانه‌زده به محیط کشت MS (حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار) منتقل شده و در اتاقک رشد

با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای تهیه ریزنمونه جهت القای ریشه موپین، از گیاهچه‌های ۳ هفته‌ای استفاده شد.

تلقیح با باکتری: به منظور آماده‌سازی باکتری، تک کلونی از سویه A4 باکتری *R. rhizogenes* در محیط کشت MYA

حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) کشت گردید و روی شیکرانکوباتور با دمای ۲۸ °C و ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) شده و مایع رویی دور ریخته شد. سپس مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت القاء (محیط B5 ۱/۲ مایع، با pH=۵/۵) به رسوب باکتری اضافه گردیده و به مدت ۴-۳ ساعت روی شیکر انکوباتور قرار داده شدند. ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و هیپوکوتیل استریل از گیاهچه‌های سه هفته‌ای گیاه *G. officinalis* جدا شده و پس از ایجاد زخم سطحی روی آن‌ها، به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده بر روی محیط همکشتی (شامل B5 ۱/۲ جامد، pH=۵/۸، حاوی استوسرینگون ۱۵۰ میکرومولار) کشت شدند و در اتاق رشد در شرایط تاریکی قرار گرفتند. لازم به ذکر است ریزنمونه‌های تلقیح شده با محیط کشت بدون باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ۴۸ ساعت پس از تلقیح، جهت حذف باکتری‌های اضافی، ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط شستشو شامل B5 ۱/۲ حاوی سفوتاکسیم (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) شستشو و آب اضافی ریزنمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی استریل گرفته شده و روی محیط کشت جامد حاوی سفوتاکسیم ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شدند و در اتاق رشد در شرایط تاریکی قرار گرفتند. ریشه‌های القاء شده ۳-۴ سانتی‌متری از روی ریزنمونه جدا شدند و در محیط B5 ۱/۲ حاوی سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. پس از رشد بیشتر، قسمتی از ریشه‌ها جدا شده و در ارلن‌هایی در محیط کشت B5 ۱/۲ مایع حاوی سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند و روی دستگاه شیکر با دور ۱۱۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. ریشه‌های موجود در محیط جامد و مایع هر هفته یک بار واگشت شدند. در هر بار واگشت مقدار سفوتاکسیم کاهش داده شده و نهایتاً حذف گردید. وزن تر ریشه‌ها در محیط مایع هر پنج روز در شرایط استریل اندازه‌گیری و یادداشت گردید.

آنالیز PCR برای تأیید تراریختی: استخراج DNA از ریشه‌های موپین به روش CTAB انجام شد. سپس واکنش

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به منظور تأیید حضور ژن‌های *rolB* و *rolC* (Matvieieva et al. 2020) و همچنین اطمینان از عدم حضور ژن *virG* (El-Esawi et al. 2017) در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. توالی مربوط به آغازگر ژن‌های مذکور در جدول ۱ ذکر شده است. برنامه PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹ °C به مدت ۶۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط دستگاه ژل داگ مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند.

اعمال تیمارهای محرک در کشت ریشه‌های مویین: برای اعمال محرک‌ها در کشت ریشه‌های مویین محرک‌های نانو ذرات نقره (با ابعاد ذره کمتر از ۱۰۰ نانومتر)، نانو ذرات اکسید آهن (با ابعاد ذره زیر ۶۰ نانومتر) و نانو ذرات سیلیکون (با اندازه ذره ۱۰ نانومتر) (آرمی‌نانو، ایران) استفاده شد. به این صورت که به منظور تهیه محلول مادری نانو ذرات، پودر هر کدام از آن‌ها با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شده و به مدت ۱ دقیقه سونیکه شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه التراسونیک قرار گرفتند. پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ °C اتوکلاو شد و در غلظت‌های مورد نیاز استفاده گردید. برای تحریک ریشه‌های مویین از غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید آهن (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، نقره (۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و سیلیکون (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد به طوری که حدود ۸۰۰ میلی‌گرم از ریشه‌های مویین وزن شده و در شیشه‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت B5 ۱/۲ حاوی غلظت‌های مختلف محرک کشت شده و روی شیکر با دور ۱۱۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. اولین برداشت ۳۶ ساعت و برداشت دوم ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: جهت استخراج پروتئین محلول از روش Alipour et al. (2015)

با اندکی تغییر استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا ریشه‌های برداشت شده توسط ازت مایع پودر شده و به ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر، بافر سدیم فسفات (pH=۷) حاوی پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد 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 اندازه‌گیری شد (Bradford 1976). جهت ترسیم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) با ضریب تبیین بالای ۹۸ درصد استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در PCR برای تکثیر ژن‌های *virG* و *rolC* *rolB*

Table 1. Specifications of primers used in PCR for amplification of *rolB*, *rolC* and *virG* genes

Gene	ژن	Primer sequence	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	Product size (bp)
<i>rolB</i>		5' - CTCACTCCAGCATGGAGCCA -3'		592	
		5' - ATTGTGTGGTGCCGCAAGCTA -3'			
<i>rolC</i>		5' - TGGAGGATGTGACAAGCAGC -3'		473	
		5' - ATGCCTCACCAACTCACCAGG -3'			
<i>virG</i>		5' - AGTTC AATCGTGTACTTTTCCT -3'		319	
		5' - CTGATATTCAGTGTCCAGTCT -3'			

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۹۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار حاوی گاباکول با ۵۰ میکرولیتر عصاره ریشه مویین و ۱ میکرولیتر H₂O₂ (۳۰درصد) در کووت 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 ۱ cm⁻¹ mM⁻¹

۲۶/۶ استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز، ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷، ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالول (۰/۰۲ مولار)، و ۱۰۰ میکرولیتر 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 (Alipour et al. 2015).

اندازه‌گیری محتوای فنول، فلاونوئید کل و گالگین عصاره متانولی ریشه‌های مویین: برای اندازه‌گیری میزان

فنول و فلاونوئید کل و محتوای گالگین، عصاره متانولی ریشه‌های مویین تهیه شد (Dorling et al. 2004). ریشه‌ها با ازت مایع پودر شده و به ۳۰۰ میلی گرم از هر نمونه ۱۰ میلی لیتر متانول خالص اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه، دمای 25°C) و پس از آن به مدت ۴۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک تحت امواج فراصوت قرار گرفتند. سپس عصاره‌های حاصل با کمک پمپ خالص از کاغذ صافی واتمن عبور داده شده و در آن تغلیظ شد. سپس عصاره‌های به دست آمده از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شدند. میزان ترکیبات فنولی گیاه معادل گالیک اسید بر اساس جذب در ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (SP -UV 200) به صورت ppm در ۲۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی اندازه‌گیری گردید (Singleton et al. 1999). اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید معادل کوئرستین نیز در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد (Chang et al. 2002). اندازه‌گیری میزان گالگین، با استفاده از یک ستون فاز معکوس (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) در سیستم (YoungLin Clarity, South Korea) YL9100 HPLC انجام شد. در فاز متحرک (۰/۰۵ KH_2PO_4 مولار و استونیتریل ۱۰۰ درصد به ترتیب به نسبت ۷۰ به ۳۰) استفاده شد. pH دی‌هیدروژن پتاسیم فسفات با کمک ارتو فسفریک اسید (مرک) روی ۳/۵ تنظیم شد. میزان جریان فاز متحرک ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر بود. غلظت گالگین در نمونه‌ها به روش کمی‌سازی و رسم منحنی استاندارد آن (Akos GmbH, Germany) AKOS 543-83-9 تعیین شد (Raigond et al. 2018).

آنالیز آماری: داده‌های حاصل از بررسی تفاوت بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر پاسخ به القای ریشه توسط سویه A4 به

صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار تجزیه و تحلیل شدند، مقایسات میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p < 0/01$) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ انجام گرفت. به منظور ارزیابی اثر نانوذرات مختلف بر فاکتورهای رشدی و صفات بیوشیمیایی، تجزیه داده‌های حاصل در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p < 0/05$) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت.

نتایج و بحث

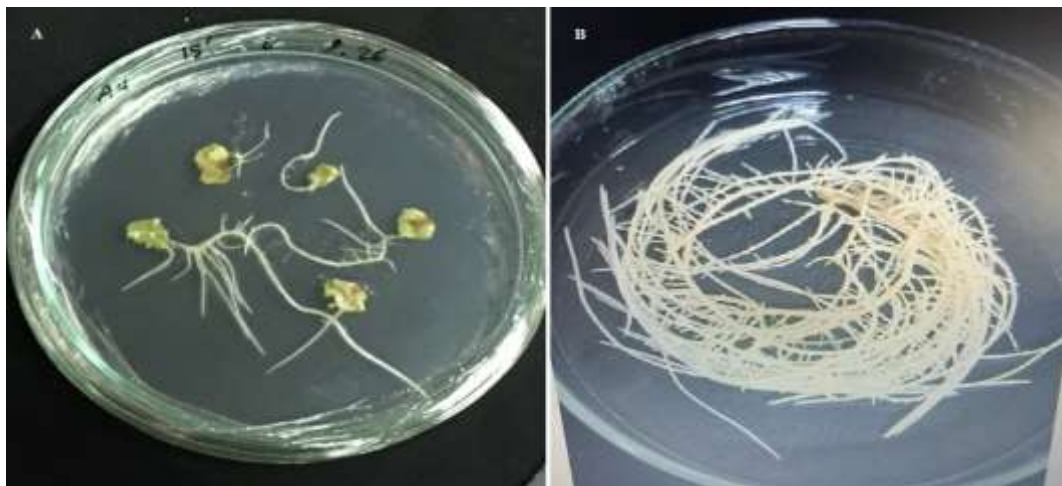
القای ریشه مویین: القای ریشه‌های مویین در گیاه *G. officinalis*، با استفاده از تلقیح ریزنمونه‌های برگ، کوتیلدون و

هیپوکوتیل این گیاه با سویه A4 باکتری *R. rhizogenes* انجام شد (شکل ۱). بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر میانگین تعداد

ریشه القا شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت و بیشترین میزان القای ریشه بعد از ۵ تا ۱۰ روز مربوط به ریزنمونه برگ با میانگین ۵ ریشه القا شده در هر ریزنمونه بود، و کمترین میزان آن مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل با میانگین ۰/۸ ریشه بود (شکل ۲).

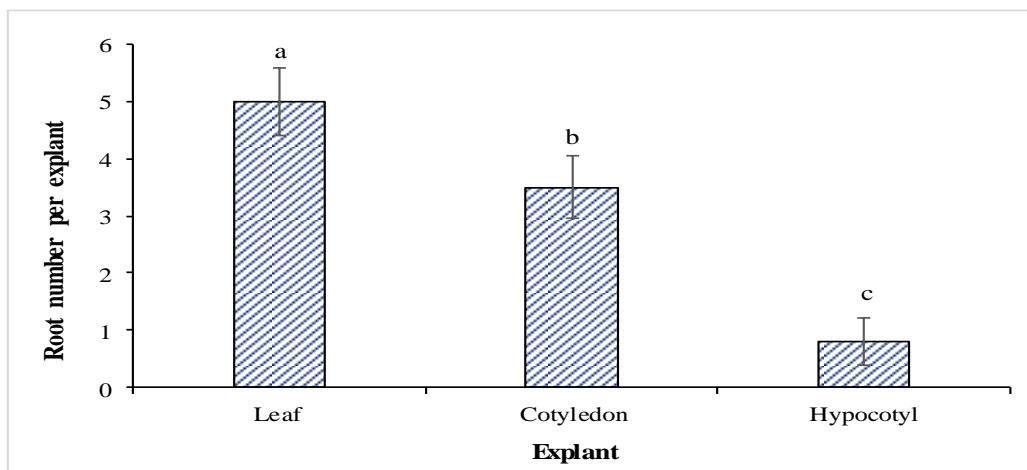
تأیید تراریختی ریشه‌ها: نتایج آنالیز PCR برای ریشه‌های تراریخته احتمالی، حضور قطعه‌ای به طول ۵۹۲ جفت باز مربوط به ژن *rolB* و قطعه‌ای با طول ۴۷۳ جفت باز مربوط به ژن *rolC* را در ریشه‌های حاصل از تلقیح با باکتری *R. rhizogenes* نشان داد (شکل ۳) که هم اندازه قطعه تکثیر شده در نمونه کنترل مثبت (باکتری *R. rhizogenes*) بود، در صورتی که در ریشه‌های شاهد، هیچ باندهای مشاهده نشد. همچنین همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است ژن *virG* با طول قطعه ۳۱۹ جفت باز تنها در حضور باکتری تکثیر شد و در PCR مربوط به ریشه‌های تراریخته، تکثیری صورت نگرفت.

انتقال پلاسمید Ri از *R. rhizogenes* به ژنوم گیاهی فرآیند پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر سویه باکتری (Crane et al. 2006)، نوع و سن ریزنمونه گیاهی و دوره همکشتی (Barik et al. 2005) قرار می‌گیرد. بنابراین، بهبود بیماری‌زایی باکتری و آمادگی سلول گیاهی، در افزایش احتمال القای ریشه موئین نقش بسزایی دارد. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق بیشترین میزان ریشه القایی از ریزنمونه‌های برگ تلقیح شده با سویه A4 به دست آمد. نتایج مشابهی در تلقیح ریزنمونه‌های مختلف گیاه گل مکزیکی (*Agastache foeniculum*) با سویه‌های A7، A4 و 9435 مشاهده شد که در آن سویه A4 بهترین سویه و ریزنمونه برگ بهترین ریزنمونه به منظور القاء ریشه‌های موئین بود (Nourozi et al. 2014). پاسخ متفاوت بافت‌های گیاهی به تراریختی توسط سویه‌های گوناگون *R. rhizogenes* در مطالعات مختلف گزارش شده است.



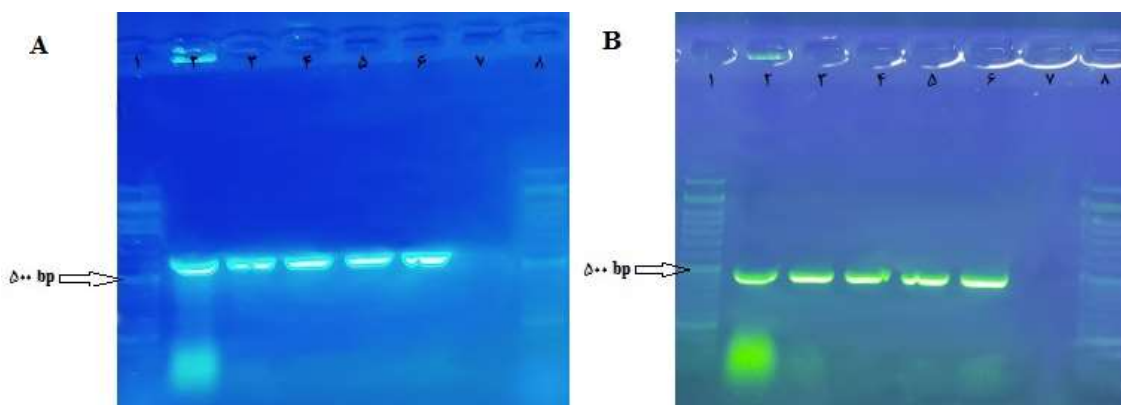
شکل ۱. ریشه‌های موئین به دست آمده از ریزنمونه برگ تلقیح شده با سویه A4 باکتری به مدت ۱۵ دقیقه (A)، ریشه‌های برداشت شده پس از ۵ روز از بازکشت (B)

Figure 1. Hairy roots induced from leaf explants inoculated with A4 strain of *R. rhizogenes* for 15 min (A), Hairy roots 5 days after subculture (B)



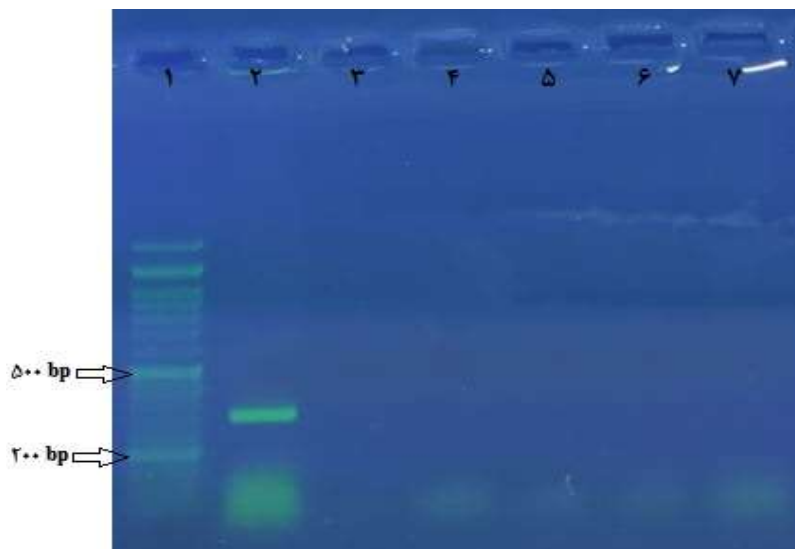
شکل ۲. میانگین تعداد ریشه‌های موئین القایی تحت تأثیر نوع ریزنمونه در *G. officinalis*. حروف غیر مشابه تفاوت معنی‌دار ($P < 0.01$) را نشان می‌دهد

Figure 2. Mean number of induced hairy roots under the influence of explant type in *G. officinalis*. Different letters show a significant difference ($P < 0.01$)



شکل ۳. آنالیز PCR ریشه‌های موئین به دست آمده از تلقیح با سویه A4 باکتری *R. rhizogenes* با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *rolB* (A) و ژن *rolC* (B). ۱ و ۸: 50 bp DNA Ladder (سینا کلون)، ۲: باکتری *R. rhizogenes* به عنوان کنترل مثبت. ۳، ۴، ۵ و ۶: ریشه‌های موئین به دست آمده از تلقیح، ۷: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی

Figure 3. PCR analysis of hairy roots obtained from inoculation with A4 strain of *R. rhizogenes* using specific primer of *rolB* (A) and *rolC* (B) genes. 1 and 8: 50 bp DNA Ladder (Sina clone), 2: *R. rhizogenes* as positive control. 3, 4, 5 and 6: hairy roots obtained from inoculation, 7: DNA-free PCR reaction as a negative control



شکل ۴. آنالیز PCR برای تایید تریاریختی ریشه‌های موئین با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *virG*. ۱: 50 bp DNA Ladder (سینا کلون)، ۲: پلاسمید Ri از باکتری *R. rhizogenes* به عنوان کنترل مثبت. ۳: واکنش PCR بدون DNA به عنوان کنترل منفی. ۴، ۵، ۶ و ۷: ریشه‌های موئین به دست آمده از تلقیح

Figure 4. PCR analysis of hairy roots using *virG* specific gene primer. 1: 50 bp DNA Ladder (Sinaclone), 2: Ri plasmid of *R. rhizogenes* as positive control. 3: DNA-free PCR reaction as a negative control. 4, 5, 6 and 7: hairy roots obtained from inoculation

نرخ رشد ریشه‌های موئین: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اثرات اصلی و متقابل غلظت‌های مختلف و مدت زمان اعمال محرک‌ها بر وزن تر و نرخ رشد (درصد افزایش وزن نسبت به وزن اولیه) ریشه‌های موئین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در تیمار ۳۶ ساعته، به جز در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای محرک و تیمار شاهد از لحاظ وزن تر و نرخ رشد ریشه‌های موئین وجود نداشت، ولی در تیمار ۷۲ ساعته، با افزایش غلظت نانو محرک‌های نقره و آهن در محیط کشت، وزن تر و نرخ رشد ریشه‌های موئین کاهش یافت. به طوری که با کاربرد نانومحرک‌های مذکور در دو غلظت پایین آنها، وزن تر و نرخ رشد ریشه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد اما کاربرد غلظت بالاتر این نانو ذرات به طور معنی‌داری موجب کاهش وزن تر ریشه نسبت به شاهد شد (جدول ۲). در حالی که استفاده از محرک‌های نانو ذرات سیلیکون در کشت ریشه‌های موئین در تیمار ۷۲ ساعته منجر به افزایش معنی‌دار وزن تر و نرخ رشد ریشه‌ها نسبت به شاهد شد. بر اساس این نتایج، بیشترین میزان وزن تر ریشه متعلق به ریشه‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۷۲ ساعت و کمترین وزن تر مربوط به تیمار با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره به مدت ۳۶ ساعت بود. همچنین بیشترین میزان نرخ رشد مربوط به تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت

۷۲ ساعت بود (جدول ۲). استفاده از الیسیتورها از جمله اقدامات مؤثر برای افزایش زیست توده و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه است (Soleimani et al. 2012). در گزارش‌های مختلف نتایج مختلفی از تأثیر نانو ذرات بر رشد بافت و سلول‌های گیاهی در کشت درون شیشه‌ای ارائه شده است (Jasim et al. 2017). به طور مثال، گزارش شده است که رشد ریشه‌های موبین *Artemisia annua* در تیمار با نانو ذرات نقره افزایش داشت (Zhang et al. 2013).

محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲)

اثر مدت زمان اعمال محرک‌های مورد استفاده بر میزان پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز معنی‌دار نبود، اما اثر تیمارهای محرک و نیز اثرات متقابل آن با مدت زمان اعمال بر صفات مذکور معنی‌دار به دست آمد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد کاربرد نانو محرک‌های مورد استفاده در کشت ریشه موبین در اکثر سطوح، موجب افزایش قابل توجه میزان پروتئین کل شد و این افزایش در بیشتر سطوح (غیر از غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات آهن در هر دو زمان تیمار و غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره در تیمار ۳۶ ساعته) نسبت به شاهد معنی‌دار بود. همچنین، در بالاترین سطوح مورد استفاده از هر یک از نانو محرک‌های مورد استفاده فعالیت آنزیم پراکسیداز به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید آهن در تیمار ۳۶ ساعته و غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون در تیمار ۷۲ ساعته بود (جدول ۲).

میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بیشتر سطوح تیمار با نانومحرک‌ها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. به طوری که در تیمار ۳۶ ساعته تنها کاربرد غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات آهن منجر به کاهش معنی‌دار میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز شد و در تیمار ۷۲ ساعته نیز کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات آهن، ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون موجب افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز گردید (جدول ۲). گزارش شده است که تیمار با محرک نانو نقره، باعث افزایش مقدار پروتئین کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های *Cuminum cyminum* L. نسبت به گروه شاهد شد (Yousefi et al. 2015). Aminizadeh و همکاران (۲۰۱۶) هم با اعمال دو نانو ذره آهن و روی در غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر در گیاه *Lepidium draba* نشان دادند که فعالیت پراکسیداز پس از ۸ ساعت به طور قابل توجهی در تیمار با این دو نانو ذره (به ویژه در غلظت‌های بالاتر) افزایش یافت ولی پس از ۱۶ ساعت به شدت کاهش پیدا کرد. این نشان می‌دهد که نانو ذره آهن در غلظت‌های پایین باعث افزایش میزان پراکسیداز می‌شود ولی در غلظت‌های بالا احتمالاً به دلیل سمی بودن منجر به کاهش تولید پروتئین کلی و میزان پراکسیداز می‌شود (Aminizadeh et al. 2016) که با نتایج این آزمایش همخوانی داشت.

فنول و فلاونوئید کل: بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات، زمان برداشت و اثر متقابل آنها بر

میزان فنول و فلاونوئید کل ریشه‌های موبین معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد تمامی سطوح

محرک‌های نقره، آهن و سیلیکون به مدت ۳۶ ساعت منجر به افزایش معنی‌دار میزان فنول کل کشت ریشه مویین شد. در تیمار ریشه‌ها با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات آهن به مدت ۷۲ ساعت، میزان فنول کل تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت و میزان تنها در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۲). در مورد نانو ذرات نقره در تیمار ۳۶ ساعته غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر آن بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر منجر به تولید مقدار فنول بیشتری شدند. در حالی که در تیمار ۷۲ ساعته با نانو ذرات نقره بیشترین میزان فنول کل مربوط به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بود و با افزایش غلظت آن به ۲۰ میلی‌گرم در لیتر مقدار فنول کل به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مورد تیمار با نانو ذرات سیلیکون نیز مشاهده شد که بیشترین میزان فنول کل در تیمار ۷۲ ساعته مربوط به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در تیمار ۳۶ ساعته مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر این نانو ذره بود. این امر نشان می‌دهد که تأثیر نانو ذرات مورد استفاده در این آزمایش بر فنول کل تابعی از غلظت و زمان تیمار است و با افزایش زمان تیمار غلظت‌های پایین‌تر تأثیر مشابه با غلظت‌های بالا در زمان تیمار کمتر دارند (جدول ۲). هر چه میزان ترکیبات فنولی در گیاه بیشتر باشد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بیشتر می‌شود. ترکیبات فنولی به‌عنوان دهنده هیدروژن با حذف رادیکال‌های آزاد نقش آنتی‌اکسیدانی دارند (Golluce et al. 2007). گزارش شده است که نانو ذرات اکسید آهن منجر به افزایش محتوای فنول و فلاونوئید و توان آنتی‌اکسیدانی در کشت ریشه‌های مویین گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) داشت (Mohebodini and Fathi 2021). همچنین بر اساس نتایج مقایسه میانگین، در تیمار ۳۶ ساعته تمامی سطوح محرک‌های مورد استفاده نسبت به شاهد منجر به افزایش معنی‌دار میزان فلاونوئید کل در ریشه‌های مویین شد، اما تیمار ۷۲ ساعته کاربرد تمامی سطوح نانو ذرات اکسید آهن و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون موجب افزایش معنی‌دار در میزان فلاونوئید کل شد و سایر تیمارهای مورد استفاده در کشت ریشه‌های مویین تفاوت معنی‌داری در میزان فلاونوئید کل با شاهد نداشتند. در تیمار ۳۶ ساعته با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید آهن مقدار فلاونوئید کل افزایش نشان داد ولی در مورد دو نانوذره دیگر با افزایش غلظت نانو ذرات مقدار فلاونوئید کل ابتدا افزایش و سپس کاهش یافته یا تغییر معنی‌داری ایجاد نشد. در مجموع، بیشترین میزان فلاونوئید کل مربوط به تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید آهن به مدت ۳۶ ساعت به دست آمد (جدول ۲). مشابه با نتایج ما، مقدار فنول، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده با نانو ذرات آهن، نقره و مولیبدن در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *G. officinalis* به دوز و مدت زمان اعمال نانو محرک وابسته بود (Minaei et al. 2021).

محتوا و عملکرد گالگین: نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) نشان داد که تیمار ریشه‌ها با تمامی

سطوح نانو ذرات نقره و سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون در هر دو زمان برداشت موجب افزایش معنی‌دار محتوای گالگین نسبت به شاهد شد، اما کاربرد هیچ کدام از غلظت‌های مورد استفاده نانو ذرات اکسید آهن در هر دو زمان برداشت افزایش معنی‌داری در میزان گالگین نسبت به شاهد ایجاد نکرد. در مجموع بیشترین میزان محتوای گالگین در تیمار ریشه‌ها با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۳۶ ساعت به دست آمد (جدول ۲).

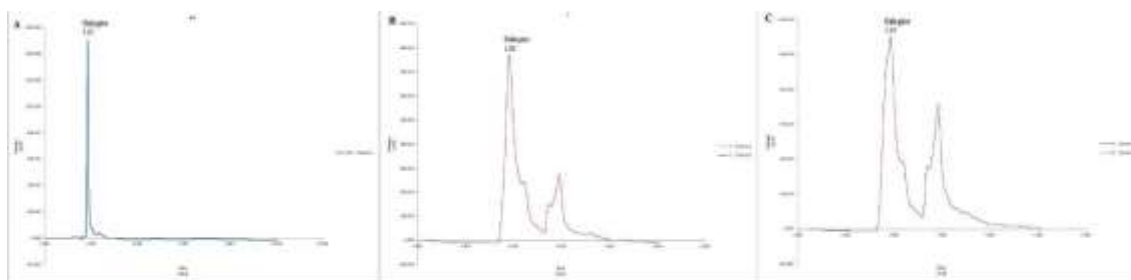
جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تأثیر نانو محرک‌های مختلف بر برخی فاکتورهای رشدی و بیوشیمیایی در کشت ریشه موین گیاه *G. officinalis* در دو زمان برداشت ۳۶ و ۷۲ ساعته

Table 2. Results of variance analysis and mean comparison of the effects of different nanoelicitors on some growth and biochemical properties in hairy root culture of *G. officinalis* at 36 and 72 hours

زمان Time (h)	محرک Elicitor	غلظت Concentration (mg l ⁻¹)	وزن تر Fresh weight (g)	نرخ رشد (درصد) Growth rate (%)	پروتئین کل Total protein (mg g ⁻¹)	پراکسیداز Peroxidase (mg g ⁻¹)	پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase (mg/g)	فنل کل Total phenol (mg g ⁻¹)	فلاونوئید کل Total flavonoid (mg g ⁻¹)	گالگین Galegine (mg g ⁻¹)	عملکرد گالگین Galegine yield (mg)
36 h	شاهد control	0	0.87 ^b	19.26 ^{bc}	0.05 ^c	13.41 ^f	363.43 ^{ab}	2.04 ^e	0.44 ^g	6.56 ^c	5.71 ^c
	نانو ذرات	50	0.92 ^{ab}	28.60 ^{abc}	0.25 ^a	39.57 ^b	306.15 ^c	2.38 ^d	1.05 ^f	6.70 ^c	6.17 ^c
	اکسید آهن	100	0.96 ^{ab}	35.01 ^{ab}	0.28 ^a	60.31 ^a	338.034 ^{bc}	2.75 ^b	2.35 ^{cd}	6.80 ^c	6.58 ^c
	Fe NP	200	0.83 ^b	14.06 ^{bc}	0.09 ^c	13.89 ^e	323.80 ^{bc}	2.56 ^c	4.37 ^a	6.64 ^c	5.54 ^c
	نانونقره	5	0.94 ^{ab}	34.72 ^{ab}	0.08 ^c	25.79 ^d	395.70 ^a	2.79 ^b	1.41 ^{ef}	9.79 ^b	9.24 ^b
	Ag NP	10	0.86 ^b	18.82 ^{bc}	0.17 ^b	37.58 ^{bc}	393.84 ^a	3.00 ^a	3.48 ^b	12.22 ^a	10.51 ^a
		20	0.80 ^b	12.62 ^c	0.19 ^b	25.22 ^d	355.87 ^{ab}	3.03 ^a	2.76 ^c	10.36 ^{ab}	8.32 ^b
	نانو	25	1.03 ^a	47.30 ^a	0.19 ^b	38.21 ^{bc}	355.34 ^{ab}	2.60 ^c	1.18 ^f	7.19 ^{bc}	7.46 ^{bc}
	سیلیکون	50	0.92 ^{ab}	30.41 ^{abc}	0.27 ^a	45.23 ^b	359.27 ^{ab}	2.74 ^b	2.11 ^d	8.91 ^b	8.26 ^b
	Si NP	100	0.96 ^{ab}	25.66 ^{bc}	0.16 ^b	28.96 ^{cd}	357.41 ^{ab}	3.09 ^a	1.85 ^{de}	10.88 ^{ab}	10.52 ^a
72 h	شاهد control	0	1.32 ^D	83.82 ^D	0.07 ^E	17.02 ^E	319.43 ^D	2.64 ^{EF}	1.25 ^{EF}	7.34 ^C	9.72 ^C
	نانوذرات	50	1.4 ^{CD}	95.27 ^{CD}	0.20 ^{BC}	45.26 ^B	335.54 ^{CD}	2.80 ^{CD}	2.02 ^{BCD}	6.80 ^{CD}	9.53 ^C
	اکسید آهن	100	1.44 ^{CD}	100.22 ^{BCD}	0.19 ^{CD}	45.60 ^B	394.69 ^{AB}	2.54 ^{FG}	2.73 ^A	7.11 ^C	10.26 ^C
	Fe NP	200	1.11 ^E	55.66 ^E	0.10 ^E	17.46 ^E	300.40 ^D	2.57 ^{FG}	2.57 ^{AB}	5.65 ^D	6.28 ^D
	نانونقره	5	1.36 ^D	90.31 ^{CD}	0.18 ^{CD}	33.39 ^{CD}	421.01 ^A	2.71 ^{DE}	1.25 ^{EF}	8.27 ^B	11.28 ^{BC}
	Ag NP	10	1.12 ^E	52.17 ^E	0.2 ^{BC}	41.26 ^{BC}	332.39 ^{CD}	2.92 ^B	1.35 ^{EF}	8.63 ^{AB}	9.73 ^C
		20	1.01 ^E	44.03 ^E	0.24 ^{AB}	29.46 ^D	320.20 ^D	2.47 ^G	1.17 ^F	8.67 ^{AB}	8.79 ^C
	نانو	25	1.53 ^{BC}	106.02 ^{BC}	0.27 ^{AB}	54.07 ^A	368.22 ^{BC}	2.74 ^{DE}	2.19 ^{ABC}	7.73 ^{BC}	11.87 ^{BC}
	سیلیکون	50	1.77 ^A	139.90 ^A	0.16 ^{CD}	40.34 ^{BC}	346.8 ^{CD}	3.05 ^A	1.74 ^{CDE}	8.89 ^A	17.55 ^A
	Si NP	100	1.65 ^{AB}	118.77 ^B	0.14 ^D	31.90 ^{CD}	334.25 ^{CD}	2.88 ^{BC}	1.61 ^{DEF}	8.48 ^B	14.05 ^B
Elicitor (E)	F _(9, 40)	0.13 ^{**}	2252.86 ^{**}	0.023 ^{**}	1341.01 ^{**}	4337.56 ^{**}	0.23 ^{**}	3.19 ^{**}	4.66 ^{**}	47.27 ^{**}	
زمان برداشت (T) Harvest time	F _(1, 40)	3.19 ^{**}	57604.83 ^{**}	0.000 ^{ns}	90.72 ^{ns}	871.34 ^{ns}	0.02 [*]	1.46 ^{**}	2.79 [*]	*9.12 [*]	
E × T	F _(9, 40)	0.05 ^{**}	914.38 ^{**}	0.007 [*]	95.85 [*]	2081.63 ^{**}	0.18 ^{**}	2.06 ^{**}	1.17 [*]	3.89 ^{**}	
CV (%)		7.64	19.16	15.22	16.53	7.15	2.37	10.47	4.63	7.02	

*، ** و ^{ns} به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و اختلاف غیر معنی‌دار. حروف غیر مشابه کوچک و بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارهای محرک به ترتیب در زمان اعمال ۳۶ و ۷۲ ساعته هستند *، ** and ^{ns} show significant differences at the 5 and 1% probability levels and non-significant differences, respectively. Different uppercase and lowercase letters indicate significant differences in the 5% probability level among elicitation treatments at 36 and 72 h, respectively

در شکل ۵ نمونه‌ای از کروماتوگرام به دست آمده از HPLC نمونه ریشه مویین تحت تاثیر غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به عنوان بهترین تیمار در مقایسه با نمونه ریشه مویین بدون اعمال محرک (شاهد) آورده شده است.



شکل ۵. کروماتوگرام HPLC حاصل از استاندارد گالگین (A)، ریشه مویین بدون اعمال محرک به عنوان شاهد (B)، و ریشه مویین تحت تاثیر غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانو محرک نقره (C)

Figure 5. Chromatogram HPLC of Galegine standard (A), Non elicited Hairy root (control) (B), and hairy root elicited by 10 mg/L Ag nano-particles (C).

در خصوص عملکرد گالگین نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای محرک وجود داشت. به طوری که در زمان برداشت ۳۶ ساعت اختلاف معنی‌داری بین سطوح نانو ذرات اکسید آهن مورد استفاده با یکدیگر و با شاهد وجود نداشت ولی در زمان برداشت ۷۲ ساعت افزایش غلظت نانو ذرات اکسید آهن به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار عملکرد گالگین نسبت به شاهد گردید. در حالی که استفاده از نانو ذرات نقره به مدت ۳۶ ساعت در هر سه سطح باعث افزایش عملکرد گالگین نسبت به شاهد شد. با این حال، در تیمار ۷۲ ساعت با توجه به کاهش رشد ریشه‌ها عملکرد گالگین نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. از سوی دیگر استفاده از نانو ذرات سیلیکون در تیمار ۳۶ ساعته باعث افزایش عملکرد گالگین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر شد. به طور کلی در زمان برداشت ۳۶ ساعت، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به همراه غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره بیشترین عملکرد گالگین (با میانگین ۱۰/۵ میلی‌گرم) را در مقایسه با تیمارهای دیگر محرک به خود اختصاص دادند. در تیمار ۷۲ ساعته استفاده از نانو ذرات سیلیکون در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر باعث بیشترین افزایش عملکرد گالگین (با میانگین ۱۷/۵ میلی‌گرم) نسبت به شاهد شد. در حالت کلی بیشترین عملکرد گالگین در تیمار ریشه‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۷۲ ساعت به دست آمد (جدول ۲). این امر را می‌توان هم به رشد بهتر ریشه‌های مویین و هم به محتوای گالگین بالاتر در این غلظت نسبت داد. تیمار ریشه‌های مویین گیاه *Silybum marianum* (L.) Gaertn. با غلظت‌های مختلف نانو نقره نشان داد که کاربرد نانو نقره در کشت ریشه مویین این گیاه منجر به افزایش میزان تجمع سیلیمارین (Silymarin) شد (Khalili et al. 2010). همچنین استفاده از سه نانو ذره مس، آهن و سیلیکون، منجر به افزایش متابولیت‌های پاپاورین، تباتین و کدئین در سوسپانسیون سلولی خشک‌شده شد (Bondarian et al. 2013). با بررسی اثر نانو ذرات اکسید آهن و روی بر میزان

تولید هایپررین و هایپر فورین در کشت سوسپانسیون سلولی گل راعی (*Hypericum perforatum L.*) مشاهده شد که نانو ذرات اکسید روی در غلظت ۱۰۰ ppm بر میزان متابولیت‌های ثانویه دارای اثرات مثبت بود در حالی که نانو ذرات اکسید آهن در همان غلظت، دارای اثرات منفی بود (Sharafi et al. 2013).

نتیجه گیری: در این تحقیق پروتکل مناسبی برای تولید ریشه‌های موئین در گیاه *G. officinalis* با استفاده از باکتری *R. rhizogenes* به دست آمد، و مشخص شد که ریزنمونه برگ بهترین ریزنمونه برای القای ریشه‌های موئین در این گیاه با استفاده از سویه A4 است. همچنین با اعمال محرک‌های مختلف در محیط کشت ریشه‌های موئین مشاهده شد که برخی از نانو محرک‌های مورد استفاده موجب کاهش رشد ریشه و افزایش صفات بیوشیمیایی نسبت به شاهد شدند. بیشترین میزان گالگین در تیمار با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات نقره و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۳۶ ساعت حاصل شد که حدود ۱/۸۵ برابر بیشتر از شاهد بود. هر چند بیشترین عملکرد گالگین در تیمار ریشه‌ها با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات سیلیکون به مدت ۷۲ ساعت به دست آمد. بر این اساس پیشنهاد می‌شود با شناسایی ژن‌های مسیر بیوسنتز گالگین در این گیاه، تأثیر اعمال محرک‌های مختلف بر بیان این ژن‌ها نیز مورد مطالعه قرار گیرد تا بتوان با دستکاری و تنظیم دقیق این ژن‌ها امکان افزایش تولید گالگین را در شرایط درون شیشه‌ای فراهم کرد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- احمدی جعفر؛ محمدی راضیه؛ گروسی قاسمعلی؛ حسینی رامین (۱۳۹۱). بهینه‌سازی کالوس‌زایی و سوسپانسیون سلولی پروانش (*Catharanthus roseus*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۴(۱)، ۱-۱۸.
- تدین رضا؛ میرزایی سعید؛ رحیمی مهدی؛ سالاری حسن (۱۳۹۵). بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر ماندگاری میوه پرتقال *Citrus sinensis* مجله پژوهش‌های گیاهی ۲۹(۲)، ۳۱۹-۳۲۷.
- راعی منا؛ امیدوی منصور؛ ترابی سپیده؛ خدایاری مهدیه (۱۳۹۵). کاربرد الیستورهای نانویی برای تولید آلوئین در سوسپانسیون سلولی گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera L.*). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۲(۲)، ۲۶۳-۲۵۶.
- علیپور سجاد؛ نصیبی فاطمه؛ فرمند همایون (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 ۲۷(۵)، ۹۰۴-۹۱۴.
- کمالی نادیا؛ صادقی‌پور احمد؛ سوری مهشید (۲۰۱۷). بررسی سمیت نانوذره اکسید آهن بر جوانه‌زنی و رشد اولیه دو گونه *Agropyron desertorum* و *Agropyron elongatum* مرتع ۱۱(۳)، ۳۳۰-۳۲۱.

محب‌الدینی مهدی؛ فتحی رقیه (۱۴۰۰) تأثیر نانو ذرات اکسید آهن بر القای ریشه‌های موین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه

(*Portulaca oleracea* L.). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۳(۳)، ۶۹-۹۰

مینایی سمیرا؛ اصغری زکریا رسول؛ زارع ناصر؛ خضری مریم (۱۴۰۰) بررسی تأثیر نانومحرک‌ها بر رشد سلولی و برخی ویژگی‌های

بیوشیمیایی آن در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی شیرین بیان سا (*Galega officinalis* L.). مجله پژوهش‌های

گیاهی گیاهی (انتشار آنلاین)

یوسفی کبری؛ ریاحی مدوار علی؛ باقی‌زاده امین (۱۳۹۴) بررسی تأثیر الیسیتورهای 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

۲۸(۱)، ۲۲۳-۲۱۰.

References

- Abdi G, Salehi H, Khosh-Khui M (2008) Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physioli Plant* 30, 709-714.
- Ahmadi, J, Mohammadi R, Garoosi G, Hossini R (2012). Optimization of callus induction and cell Suspension in *Catharanthus roseus*. *Agric Biotechnol J* 4(1), 1-18 (In Persian).
- Akula R, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* 6, 1720-1731.
- Alipour S, Nasibi F, Farahmand H (2015) Effect of different concentrations of sodium nitroprusside on physiological characteristics and the vase life of cut flowers of toberose (*Polianthes tuberosa* L.). *J Plant Res (Iran J Biol)*, 27(5), 904-914 (In Persian).
- Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M (2016) Nano-metal oxides induced sulfuraphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae) *Prog Biol Sci* 6(1), 75-83.
- Atanasov A (2016) Anti-platelet fraction isolated from *Galega officinalis*. *Acta Medica Bulg* 43, 5-10.
- Bailey CJ, Day C (2004) Metformin: its botanical background. *Pract Diabetes Int* 21, 115-117.
- Barik DP, Mohapatra U, Chand PK (2005) Transgenic grass pea (*Lathyrus sativus* L.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 24, 523-531.
- Bondarian F, Omid M, Torabi S (2013) The effect of nanoelicitors on alkaloid production of *Papaver somniferum* in suspension cell culture. Msc thesis Azad university of Tehran (In Persian).

- 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.
- Chan M, Zhao J, Brown P, Khan IA (2010) Phytochemical Study of *Galega officinalis*. *Planta Med* 76(05), P62.
- 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.
- Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang ZY (2006) Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223, 1344–1354.
- Dorling PR, Colegate SM, Huxtable CR (2004) Poisonous sedges: the galegine content of *Schoenus rigens* at various growth stages. *Poisonous Plants and Related toxins* 298–303.
- El-Esawi MA, Elkelish A, Elansary HO, et al. (2017) Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxid Med Cell Longev* 2017, e 5604746.
- Gheisary B, Hosseini B, Hassanpour H, Rahimi A (2018) Effects of silicon and AgNO₃ elicitors on biochemical traits and antioxidant enzymes activity of henbane (*Hyoscyamus reticulatus* L.) Hairy Roots. *J Med Plant By-product* 7, 135–144.
- Golluce M, Sahin F, Sokmen M et al. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from (*Mentha longifolia* L.) ssp. *longifolia*. *Food Chem* 103, 1449-1456.
- Gutierrez-Valdes N, Häkkinen ST, Lemasson C, et al. (2020) Hairy root cultures—a versatile tool with multiple applications. *Front Plant Sci* 11, e33.
- Halder M, Sarkar S, Jha S (2019) Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci* 19, 880–895.
- Hatami M, Naghdi Badi H, Ghorbanpour M (2019) Nano-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells: A review. *J Medic Plant* 18(71), 6-36 (In Persian).
- Heidarpour F, Mohammadabadi MR, Zaidul ISM, et al. (2011) Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective. *Pharmazie* 66 (5), 319-324
- Jasim B, Thomas R, Mathew J, Radhakrishnan EK (2017) Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Saudi Pharm J* 25, 443–447.
- Kamali N, Sadeghipour A, Souri M (2017) Investigating the toxicity effects of nano Fe₃O₄ on germination and early growth of *Agropyron desertorum* and *Agropyron elongatum*. *Rangeland* 11(3), 321-330 (In Persian).

- Kastell A, Smetanska I, Ulrichs C, et al. (2013) Effects of phytohormones and jasmonic acid on glucosinolate content in hairy root cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. Appl Biochem Biotechnol 169, 624–635.
- Khalili M, Hasanloo T, Kazemi Tabar SK (2010) Ag enhanced silymarin production in hairy root cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Plant Omics 3, 109–114.
- Liang Y, Sun W, Zhu Y-G, Christie P (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. Environ Pollut 147, 422–428.
- 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 (16), 3053–3061.
- Malik S, Andrade SA, Mirjalili MH, et al. (2016) Biotechnological approaches for bioremediation: in vitro hairy root culture. In Transgenesis and secondary metabolism (Vol. 1). Springer International Publishing.
- Matvieieva NA, Morgun BV, Lakhneko OR, et al. (2020) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb. Plant Physiol Biochem 152, 177–183.
- Minaei Minabad S, Asghari Zakaria R, Zare N, Khezri M (2021) Effect of nanoelicitors on some biochemical properties in cell suspension cultures of *Galega officinalis*. J Plant Res (In Persian).
- Mohammadabadi MR, El-Tamimy M, Gianello R, Mozafari MR (2009) Supramolecular assemblies of zwitterionic nanoliposome-polynucleotide complexes as gene transfer vectors: Nanolipoplex formulation and in vitro characterization. J liposome Res 19 (2), 105-115.
- Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2018) Enhanced efficacy and bioavailability of thymoquinone using nanoliposomal dosage form. J Drug Deliv Sci Technol 47 (1), 445–453.
- Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2019) Development of nanoliposome-encapsulated thymoquinone: evaluation of loading efficiency and particle characterization. J Biopharm 11 (4), 39-46
- Mohebodini M, Fathi R (2021) Effect of iron oxide nanoparticles on hairy root induction and antioxidant activity in Purslane (*Portulaca oleracea*). Agric Biotechnol J 13(3), 70-90.
- Mortazavi SM, Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2005) Applications and in vivo behaviour of lipid vesicles. In: Nanoliposomes From Fundamentals to Recent Developments (pp. 67-76). Trafford Publishing.

- Nourozi E, Hosseini B, Hassani A (2014) A reliable and efficient protocol for induction of hairy roots in *Agastache foeniculum*. *Biologia* 69(7), 870-879.
- Nourozi E, Hosseini B, Maleki R, Abdollahi Mandoulakani B (2019) Iron oxide nanoparticles: a novel elicitor to enhance anticancer flavonoid production and gene expression in *Dracocephalum kotschyi* hairy-root cultures. *J Sci Food Agric* 99, 6418–6430.
- 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.
- Omidi M, Abdollahi P (2015) Biotechnology for large scale production of plants secondary metabolites. *Mod Genet J* 9(4), 391-402.
- Park HJ, Kim SH, Kim HJ, Choi SH (2006) A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *Plant Pathol J* 22, 295–302.
- Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem* 37, 91–102.
- Raei M, Omidi M, Torabi S, Khidayari M (2016) Application of nano-elicitors to produce aloin in cell suspension of *Aloe vera* L.. *Iran J Medic Aromat Plants Res*, 32(2), 256-263 (In Persian).
- 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.
- Sharafi E, Fotokian MH, Loo H (2013) Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of John'swort (*Hypericum perforatum* L). *J Medic Plant By-product* 2(2), 177-184.
- 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.
- Sivanesan I, Jeong BR (2014) Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of *Ajuga multiflora* Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. *Sci World J* 2014, e521703.
- 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* 2, 1005-1013.
- Tadayon R, Rahimi M, Salari H (2016) Evaluation the silver nanoparticles on shelf life of *Citrus Sinensis*. *J Plant Res* 29(2), 319-327 (In Persian).

- Vakil MMA, Mendhulkar VD (2013) Enhanced synthesis of andrographolide by *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* elicitors in cell suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. Bot Stud 54, 1–8.
- Wang JW, Wu JY (2013) Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. Biotechnol Hairy Root Syst 81, 55-89.
- Wang M, Wang R, Mur LAJ, et al. (2021) Functions of silicon in plant drought stress responses. Hort Res 8, 1–13.
- Yousefi K, Riahi A, Baghizadeh A (2015) Investigation of the effects of Ag and Cu elicitors on flavone synthase 1 gene expression and some biochemical parameters on *Cuminum cyminum* L. endemic from Iran. J Plant Res 28(1), 210-223 (In Persian).
- Zarrabi A, Alipoor Amro Abadi M, Khorasani S, et al. (2020) Nanoliposomes and tocosomes as multifunctional nanocarriers for the encapsulation of nutraceutical and dietary molecules. Molecules 25 (3), 638.
- 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.