

اثرات گرافن اکسید حاوی نانو ذرات سیلیسیوم دی‌اکسید بر روی برخی از متابولیت‌های ثانویه گیاه انجدان از طریق کشت کالوس

ریحانه صفری^۱، پوران‌دخت گلکار^{۱*} و مهدی بازرگانی‌پور^۲

^۱ گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

^۲ پژوهشکده نانو فناوری و مواد پیشرفته، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰)

چکیده

با توجه به اهمیت روزافزون گیاهان دارویی، تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی از طریق کشت کالوس و استفاده از الیسیتورها از نظر زمانی و اقتصادی به صرفه است. این مطالعه به منظور بهینه‌سازی تولید کالوس در گیاه مرتعی - دارویی انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch.) و همچنین تأثیر الیسیتور نانوذره گرافن اکسید حاوی سیلیسیوم دی‌اکسید (GO-SiO₂) بر میزان متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی-اکسیدانی در شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفت. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل جهت القای کالوس به محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) تغییر یافته) حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلف منتقل شدند. ترکیب رشدی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی (2,4-D) + ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کایتین (Kin) در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بهترین درصد تولید کالوس (۹۵٪) را نشان داد. جهت بررسی تأثیر الیسیتور بر روی میزان متابولیت‌های ثانویه در کالوس، غلظت‌های مختلف GO-SiO₂ (صفر، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان الیسیتور انتخاب شدند. نانو ذره انتخاب شده اثرات مثبت و تنظیم‌کننده‌ای بر میزان متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس ایجاد نمود. بالاترین میزان محتوای کل فنل (۴۷/۲۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن تر)، محتوای کل فلاونوئید (۲۸/۰۶ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP (۰/۰۹۶ میکرومول در گرم وزن عصاره)، در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر GO-SiO₂ و بیشترین میزان محتوای فلاونول (۸/۱۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر)، پراکسید هیدروژن H₂O₂ (۵/۰۹ میکرومول در گرم وزن تر) و محتوای کل آنتوسیانین (۰/۰۷ میکرومول در گرم وزن تر) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر GO-SiO₂ مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت کاروتنوئید (۲۸/۱۱ میکروگرم در گرم وزن تر) و کلروفیل (۲۳/۵۸ میکروگرم در گرم وزن تر) در تیمار GO-SiO₂ با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. مطابق با نتایج حاصل از این مطالعه، اعمال نانو ذره گرافن اکسید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند در تولید حداکثری ترکیبات کل فنولیک و فلاونوئیدی و همچنین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق کشت کالوس در گیاه ارزشمند انجدان مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، الیسیتور، فلاونوئید، محتوای کل فنل

مقدمه

ترکیبات و نیاز بشر به داروهای مؤثر طبیعی و فاقد اثرات جانبی، ضروری به نظر می‌رسد که برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی، در جهت افزایش کمی و کیفی این ترکیبات از فنون کشت بافت گیاهی به طور بهینه استفاده گردد (Zhou and Wu, 2006). کشت کالوس این موقعیت را فراهم می‌کند که تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی در شرایط کنترل شده و در زمان کوتاه‌تری انجام شود.

استفاده از الیستورهای زنده و غیرزنده یکی از مهمترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت کالوس است (Zhao et al., 2005). الیستورها از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوستز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al., 2005). نانو ذرات با اندازه و ابعاد بسیار کوچک (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) دارای خواص ارزشمندی از جمله نفوذ سریع‌تر و راحت‌تر به درون غشای سلولی و قابلیت تغییر خصوصیات شیمیایی سلول هستند (Biswas and Wu, 2005). نانوذرات خصوصیات فیزیکی شیمیایی مواد را تغییر می‌دهند و فرصتی برای تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه گیاهی از طریق فعال‌سازی مسیرهای دفاعی در گیاه فراهم می‌کنند (Marslin et al., 2017; Hatami et al., 2018). امروزه استفاده از نانوذرات به‌عنوان الیستورهای غیرزیستی در بسیاری از مطالعات کشت‌بافت انجام گرفته است (Hatami et al., 2018). به‌طور مثال در مطالعه Mandeh و همکاران (۲۰۱۲) اثرات ضدباکتریایی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم منجر به افزایش اندازه کالوس و هم‌چنین بهبود قدرت جنین‌زایی در جنین‌های بالغ جو گردید. در مطالعه تأثیر نانوذرات بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در کالوس گونه‌های مختلف آویشن، بیشترین سرعت رشد کالوس و وزن تر کالوس در غلظت ۸ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره و بیشترین غلظت تیمول (۱۶/۲۷ میلی‌گرم در لیتر) و کارواکرول (۲/۰۱۲ میلی‌گرم در لیتر) در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوآکسید روی در شرایط کشت کالوس مشاهده شد (Mosavat et al., 2019). هم‌چنین در کشت کالوس گیاه *Stevia rebaudiana*، افزایش برخی پارامترها از جمله محتوای فنل کل، محتوای فلاونوئید و

انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch.) گیاهی بوته‌ای و چندساله از تیره چتریان (Apiaceae) محسوب می‌شود (Amiri and Joharchi, 2016). این گیاه با نام عمومی Lovage، از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای به‌شمار می‌رود که دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمند دارویی است. از اسانس ریشه این گیاه در صنایع نوشابه‌سازی و غذایی به‌عنوان طعم‌دهنده استفاده می‌شود (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰). پراکنش انجدان رومی در ایران، افغانستان، اروپا، نواحی مدیترانه‌ای و آمریکای شمالی مشاهده شده است. از مناطق منحصر به فرد رویش این گیاه به صورت خودرو ایران و افغانستان است (خداشناس و همکاران، ۱۳۹۹). این گیاه، گونه بسیار مهم و در عین حال، فراموش شده‌ای از گیاهان دارویی بومی ایران محسوب می‌شود که در مناطق جغرافیایی اندکی از کشور از جمله جنوب شرق ایران (در مناطقی از کوه‌های هزار استان کرمان) رویش دارد (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰). از دم‌کرده ریشه به‌عنوان ماده‌ای مدر و درمان سوء هاضمه و نفخ و معالجه سنگ کلیه استفاده می‌شود. حدود ۷۰ درصد از مواد تشکیل‌دهنده اسانس گیاه را فتالیدها، ترپنوئیدها، اوژنول و کارواکرول تشکیل می‌دهند (Hogg et al., 2001).

متابولیت‌های ثانویه را می‌توان به‌عنوان گروهی از ترکیبات تعریف کرد که در فرآیندهای اولیه حیات گیاه نقش قابل توجهی ندارند، بلکه در سازگاری آن با محیط نقش ایفاء می‌کنند (Oksman-Caldentey and Inze, 2004). ترکیبات مختلف فنولیکی (از جمله فلاونوئیدها، فلاونول‌ها و آنتوسیانین‌ها) از جمله متابولیت‌های ثانویه مهم در گیاهان دارویی هستند که نقش بسیار مهمی در پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان در مقابله با تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده دارند. سرعت و قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی در شرایط طبیعی بسیار محدود است. با توجه به وجود این مشکلات برای تولید گیاهان دارویی و متابولیت‌های ثانویه، افزایش رو به رشد جمعیت، محدودیت منابع آب و زمین زراعی برای تولید، صرفه اقتصادی، افزایش تقاضا برای این

Si-NPها پتانسیل بهبود محصولات کشاورزی را برای کشاورزی پایدار دارند (Bhat et al., 2021; Rastogi et al., 2019). در مطالعه Hassanpour و همکاران (۲۰۲۰)، استفاده از نانو ذرات SiO₂ منجر به افزایش معنی‌دار محتوای کل فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه *Anthemis gilanica* شد. بررسی منابع نشان می‌دهد که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت کالوس در این گیاه ارزشمند دارویی و بومی کشور ایران صورت نگرفته است. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی تولید کالوس در گیاه انجدان رومی و بررسی تأثیر اثرات نانو ذرات اکسید گرافن حاوی سیلیسیوم دی‌اکسید بر روی متابولیت‌های ثانویه در کشت کالوس مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بهینه‌سازی القای کالوس: به منظور بهینه‌سازی جوانه‌زنی و از بین بردن خواب بذر، بذور انجدان رومی (متعلق به منطقه هزار کرمان) به مدت ۱۰ روز در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. ضد عفونی کردن بذور با هیپوکلریت سدیم (۲٪) به مدت ۱۵ دقیقه و ۳ بار آبشویی با آب مقطر دو بار استریل صورت گرفت (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰). جوانه‌زنی بذور بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) (دو خفا، هلند) حاوی ۱۰ میلی‌گرم/لیتر جیبرلیک اسید انجام گرفت. از ریز نمونه‌های هیپوکوتیلی (۲-۳ میلی‌متر) جهت القای کالوس استفاده شد. به منظور بهینه‌سازی تولید کالوس بر روی محیط کشت تغییر یافته MS (جدول ۱) (MMS) از غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکینین استفاده شد (جدول ۲) (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱). نسبت آمونیم به نترات در محیط کشت MMS کمتر است. همچنین ۱۰۰ برابر بودن غلظت تیامین و دو برابر بودن غلظت پیریدوکسین و نیکوتینیک اسید، استفاده از ساکارز ۴ درصد به جای ساکارز ۳ درصد، و غلظت بیشتر از یون‌های فسفات، آهن و پتاسیم از ویژگی‌های محیط کشت تغییر یافته (MMS) نسبت به محیط کشت معمولی (MS) جهت تولید کالوس در انجدان رومی

آنتی‌اکسیدان کل در پاسخ به تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو اکسید روی مشاهده شد (Javed et al., 2018).

در سال‌های اخیر از نانو ذرات بر پایه گرافن به عنوان یک الیستور غیر زیستی ارزشمند در تحریک رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه دارویی در گیاهان استفاده شده است. گرافن یک لایه گرافیت و شامل یک صفحه تک لایه‌ای از اتم‌های کربن است که با شبکه‌هایی کریستالی و به صورت شش ضلعی در کنار هم قرار گرفته است (Ray, 2015). به عبارت دیگر، گرافن به عنوان یک ماده جدید دو بعدی، به دلیل خصوصیات ویژه چون سطح مقطع بالا، پتانسیل بسیار خوبی در رابطه با افزایش عملکرد گیاه در مقابله با تنش‌های زیستی از خود نشان داده است (Ghorbanpour et al., 2018). تأثیر مثبت نانو ذرات گرافن اکسید (GO) بر بهبود خاصیت جوانه‌زنی در گیاهان (Khodakovskaya et al., 2009; He et al., 2017) گزارش شده است. نانو ذرات گرافن به دلیل اندازه ریز و قدرت بالای نفوذ به درون بافت‌های گیاهی، اثرات مثبت و منفی بر متابولیت‌های اولیه و ثانویه گیاه دارند. البته شدت اثرات به غلظت ماده مصرفی و گونه گیاه در معرض تیمار بستگی دارد (Hatami et al., 2018). در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه اثر الیستور نانو ذرات گرافن بر روی پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در کشت کالوس گیاهان دارویی از جمله بارهنگ (Ghorbanpour et al., 2018) و شاهی (Golkar et al., 2021) انجام شده است.

عنصر سیلیسیم (Si) به عنوان دومین عنصر فراوان در پوسته زمین یکی از عناصر فلزی مهم در افزایش تولید و کیفیت محصولات گیاهی محسوب می‌شود و نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی دارد (Bhat et al., 2021). عنصر سیلیسیم منجر به افزایش تولید رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش فتوسنتز در گیاه و بهبود رشد در گیاهان می‌شود (Epstein, 2009). در بخش کشاورزی استفاده از نانو ذرات سیلیسیم (Si-NPs) به عنوان یک سلاح در افزایش جوانه‌زنی و همین‌طور افزایش تحمل در مقابل سمیت فلزات سنگین و تنش‌های غیرزنده استفاده می‌شود. همچنین،

جدول ۱- غلظت ترکیبات مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بهینه (MMS)

محلول‌های ذخیره ماکرو		محلول‌های ذخیره میکرو		ویتامین‌ها و اسیدآمین	
غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	مواد شیمیایی	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	مواد شیمیایی	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	مواد شیمیایی
۲۵۰۰	KNO ₃	۰/۷۵	KI	۱۰۰	Myoinositol
۶۲۰	NH ₄ NO ₃	۶/۲	H ₃ BO ₃	۰/۵	Nicotinic acid
۴۴۰	CaCl ₂ .2H ₂ O	۰	MnSO ₄ .4H ₂ O ₂	۰/۵	Pyridoxine HCl
۳۷۰	MgSO ₄ .7H ₂ O	۱۰	MnSO ₄ . H ₂ O	۰/۱	Thiamine HCl
۴۴/۶	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	۸/۶	ZnSO ₄ .7H ₂ O	۲	Glycine
۳۵/۰۳	FeSO ₄ . 7H ₂ O	۰/۲۵	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		
۴۰۰	KH ₂ PO ₄	۰/۰۲۵	CuSO ₄ .5H ₂ O		

جدول ۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی برای بهینه‌سازی تولید کالوس در انجنان رومی

شماره تیمار	محیط کشت	ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده رشدی	القای کالوس (%)
۱	MS تغییر یافته	۰/۵ میلی‌گرم/لیتر Kin + ۰/۰۲۵ میلی‌گرم/لیتر NAA + ۱/۵ میلی‌گرم/لیتر 2,4-D	۹۵ ± ۲/۸۸ ^a
۲	MS تغییر یافته	۱ میلی‌گرم/لیتر 2,4-D	۴۹/۵ ^b ± ۳/۳
۳	MS تغییر یافته	۲ میلی‌گرم/لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم/لیتر 2,4-D	۱۳/۷۵ ^c ± ۲/۴
۴	MS تغییر یافته	۰/۵ میلی‌گرم/لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم/لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم/لیتر NAA	۰ ^d
۵	MS تغییر یافته	۰/۵ میلی‌گرم/لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم/لیتر Kin + ۰/۵ میلی‌گرم/لیتر NAA	۰ ^e

در ستون وجود حداقل یک حرف لاتین مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

رشدی که در مرحله بهینه‌سازی تولید کالوس مشخص شده بود، منتقل شد. این محیط رشدی شامل ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی (2,4-D) و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون کاینیتین (Kin) بود (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰). پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت، از هر غلظت نانوذره سه تکرار (پنج کالوس در هر پتری) به منظور اندازه‌گیری صفات مختلف بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، تهیه عصاره متانولی: ابتدا ۰/۲ گرم بافت تازه کالوس را با ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی در هاون چینی ساییده و در فالكون ریخته شد. پس از آن به مدت ۲۵ دقیقه و با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای

بود. به منظور القای کالوس، ریز نمونه‌های هیپوکوتیلی در داخل اتاقک رشد با ۲۴ ± ۲°C دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

القای الیستور: پس از گذشت حدود ۴۵ روز از القای کالوس، به منظور بررسی تأثیر نانوذرات گرافن اکسید حاوی سیلیسیم دی‌اکسید (GO-SiO₂)، از استوک اصلی محلول نانو ذره (تهیه شده توسط پژوهشکده نانو فناوری و مواد پیشرفته، دانشگاه صنعتی اصفهان) غلظت‌های مختلف (صفر، ۵، ۱۵، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به عنوان الیستور مورد استفاده قرار گرفت. تهیه نانوذره SiO₂ مطابق با روش Gholami و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت. غلظت‌های مختلف نانوذره به محیط کشت MMS همراه با بهترین محیط از نظر تنظیم‌کننده‌های

محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید: ابتدا ۰/۵۰ گرم از بافت تازه کالوس را به همراه ۳ میلی لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس عصاره استونی شفاف رویی را جدا کرده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b خوانده شد و غلظت نهایی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه و مطابق با فرمول های زیر تعیین شد (Arnon, 1967).

$$\text{Chl a (mg/g FW)} = [12/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{645})] \times V/W$$

$$\text{Chl b (mg/g FW)} = [22/9 (A_{645}) - 4/68 (A_{663})] \times V/W$$

$$\text{Chl total (mg/g FW)} = [20/2 (A_{645}) + 8/02 (A_{663})] \times V/W$$

در این فرمول ها، A: جذب نور در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر، V: حجم محلول صاف شده (عصاره رویی حاصل از سانتریفیوژ)، W: وزن تر نمونه بر حسب گرم بود.

به منظور اندازه گیری محتوای کل کاروتنوئید، ابتدا ۰/۵۰ گرم بافت تازه کالوس را به همراه ۳ میلی لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده و در فالكون ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس عصاره استونی رویی را که شفاف است، جدا کرده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت بر حسب میلی گرم در گرم وزن تر نمونه محاسبه و تعیین شد (Arnon, 1967).

هیدروژن پراکسید (H₂O₂): به منظور اندازه گیری H₂O₂، ابتدا ۰/۱۰ گرم بافت تازه کالوس را در ۱ میلی لیتر بافر استخراج شامل تری کلرواستیک اسید ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه در هاون چینی ساییده و عصاره را در فالكون ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را همراه ۵۰۰ میکرولیتر پتاسیم یدید ۱ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با pH برابر با ۷ مخلوط کرده و سپس جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده گردید (Velikova et al., 2000).

فعالیت آنتی اکسیدانی: به منظور اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی با روش احیاکنندگی آهن (روش FRAP)، ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه کالوس را همراه ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات

سایر اندازه گیری ها مورد استفاده قرار گرفت (Golkar and Taghizadeh, 2018).

محتوای کل فنل: برای اندازه گیری محتوای کل، ۲۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۲/۵ میلی لیتر محلول فولین - سیوکالتو (۱۰ درصد) مخلوط شد و پس از گذشت ۵ دقیقه ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق به حالت استراحت قرار گرفت و پس از آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان محتوای کل فنل و براساس میزان معادل میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش شد (Singleton et al., 1999).

محتوای کل فلاونوئید: بعد از استخراج عصاره متانولی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر عصاره را همراه ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد همراه ۵۰ میکرولیتر پتاسیم استات ۱ مولار به اضافه ۷۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد و ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر در فالكون جدید مخلوط کرده و پس از قرارگیری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار فلاونوئید از منحنی استاندارد کوئرستین (میلی گرم کوئرستین در گرم وزن تر) استفاده شد (Chang et al., 2002).

محتوای کل فلاونول: پس از استخراج عصاره متانولی، ۵۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۲ درصد را همراه ۲۵۰ میکرولیتر عصاره به اضافه ۲۵۰ میکرولیتر متانول و ۱/۵ میلی - لیتر سدیم استات ۵ درصد در فالكون جدید ریخته و مخلوط گردید. پس از گذشت ۲/۵ ساعت در دمای اتاق جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. مقدار فلاونول کل براساس منحنی کوئرستین محاسبه گردید (Chang et al., 2002).

محتوای کل آنتوسیانین: برای سنجش آنتوسیانین، ابتدا عصاره متانولی استخراج شد و سپس میزان جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد و غلظت آنتوسیانین براساس میکرومول در گرم وزن تر گزارش شد (Hara et al., 2003).

استفاده از ریز نمونه‌های برگ‌ی در محیط‌کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید، بیشترین میزان تولید کالوس و اندام‌های پروتوکورمی در انجدان رومی ایجاد نمود. در مطالعه Park و همکاران (۲۰۱۰)، مؤثرترین اندام جهت باززایی گیاه از کشت کالوس، از ریز نمونه‌های برگ و ساقه در محیط توفوردی با غلظت ۱ میلی‌گرم/لیتر در گیاه انجدان رومی بوده است.

تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره $GO-SiO_2$ بر صفات مختلف در کشت کالوس انجدان رومی، رنگ و بافت کالوس: پس از گذشت چهار هفته که کالوس‌ها تحت تأثیر الیستور بودند مشاهده شد که با افزایش غلظت الیستور، رنگ کالوس متمایل به قهوه‌ای شده و حالت نکروزه‌ای شدن بافت در غلظت بالای نانو ذره مشاهده شد. بافت کالوس از حالت نرم و آبدار به سمت سفت‌تر و خشک‌تر شدن تغییر یافت. به عبارت دیگر، غلظت‌های بالای نانوذره (۲۰ میلی‌گرم/لیتر) دارای اثرات بازدارندگی رشد و تا حدی خاصیت سمی بود.

صفات بیوشیمیایی کالوس: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف نانوذره منجر به بروز تفاوت معنی‌دار بین همه صفات اندازه‌گیری شده شد (جدول ۳) و این اختلافات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند.

پراکسید هیدروژن: در شرایط تنش‌های محیطی در گیاه، پراکسید هیدروژن نقش پیام‌رسانی دارد و باعث القای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kuzniak and Urbanek, 2000). به همین جهت اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن در شرایط تنش سلولی به‌عنوان یک عامل مهم در تشخیص میزان شدت تنش وارد شده به سلول گیاهی است. نتایج این مطالعه بیانگر افزایش معنی‌دار در میزان پراکسید هیدروژن تحت تأثیر اعمال الیستور $GO-SiO_2$ بود به طوری‌که روند صعودی در افزایش میزان H_2O_2 همراه با افزایش غلظت نانوذره مشاهده شد (شکل ۱). میزان H_2O_2 در محدوده ۲/۲۹ میکرومول در گرم وزن تر در تیمار شاهد تا ۵/۰۹ میکرومول در گرم وزن تر در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره تغییر نشان داد (شکل ۱). افزایش معنی‌دار در میزان پراکسید هیدروژن

سدیم با pH برابر با ۶/۶ و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فریک سیانید یک درصد مخلوط کرده به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به فالكون‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۵۰ سانتریفیوژ گردید. پس از آن ۲/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی در لوله‌ها را با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲۰ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد مخلوط شد و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (Benzie and Strain, 1996).

به منظور بهینه‌سازی تولید کالوس و ارزیابی اثرات الیستور بر صفات رشدی و متابولیت‌های ثانویه از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده و مقایسه آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (ver. 9.3.1) انجام شد. به منظور رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (Excel) استفاده شد.

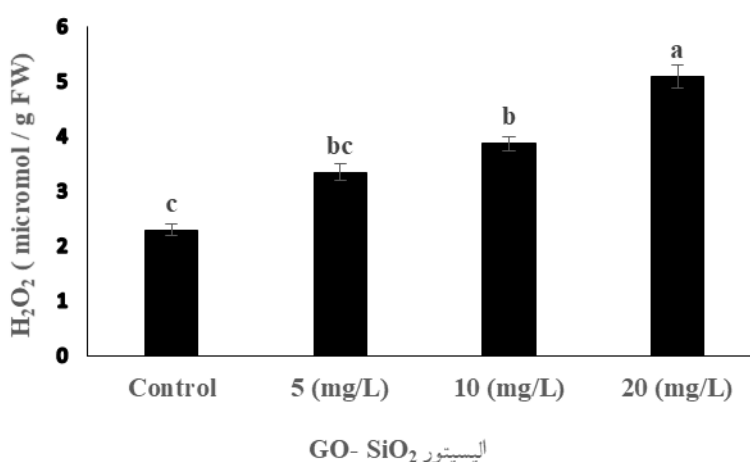
نتایج و بحث

بهینه‌سازی القای کالوس: نتایج آزمایش القای کالوس در گیاه انجدان رومی نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین ترکیب‌های مختلف رشدی از نظر صفت درصد کالوس‌زایی بود (جدول ۲). در این مطالعه، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر $Kin + 0.25$ میلی‌گرم در لیتر $NAA + 1/5$ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۵٪) و تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر $BAP + 1$ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی دارای کمترین میزان کالوس‌زایی (۱۳/۷۵ درصد) بود (جدول ۲). در این مطالعه، اثرات ترکیبی اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها از عوامل اساسی برای تحریک تقسیم سلولی و القای کالوس در گیاه انجدان بودند. علت اینکه هیپوکوتیل از نظر کالوس‌زایی دارای عملکرد بهتری است، می‌تواند ناشی از ماهیت سلولی همگن و در دسترس بودن آسان مواد رشدی به هر سلول از بافت‌های همگن هیپوکوتیل باشد. بررسی منابع نشان می‌دهد که مطالعات اندکی در مورد بهینه‌سازی تولید کالوس در گیاه انجدان رومی صورت گرفته است (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج مطالعات Khodashenas و همکاران (۲۰۱۵) نشان می‌دهد که

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی اندازه گیری شده در کالوس انجدان رومی تحت تأثیر الیستور GO-SiO₂

میانگین مربعات									
منبع تغییر	درجه آزادی	پراکسید هیدروژن	محتوای کل فنل	محتوای کل فلاونوئید	محتوای کل فلاونول	محتوای کل آنتوسیانین	محتوای کل کلروفیل	محتوای کل کاروتنوئید	فعالیت آنتی اکسیدانی
تیمار	۳	۴/۰۷**	۳۶/۶۰**	۲۸۳/۵۷**	۲۲/۳۲**	۰/۰۰۰۰۲**	۳۲/۶۵**	۱۹۸/۴۷**	۰/۰۰۵**
خطای آزمایش	۸	۰/۰۷۷	۲/۸۳	۲/۰۲	۰/۰۱۰	۰/۰۰۰۰۰۰۴	۰/۲۷	۱/۰۹	۰/۰۰۰۰۰۰۶
ضریب تغییرات (%)		۷/۶۳	۳/۵۴	۹/۲۸	۲/۱۵	۲۰/۷۶	۲/۶۳	۴/۶۸	

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

شکل ۱- تأثیر غلظت های مختلف نانو ذره GO-SiO₂ بر محتوای پر اکسید هیدروژن در کشت کالوس انجدان رومی

محتوای کل فنل (۴۷/۲۶ میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن تر) در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر از نانو ذره GO-SiO₂ و کمترین مقدار (۳۹/۰۱ میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن تر) در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۴). با افزایش غلظت نانو ذره از ۱۰ میلی گرم د لیتر کاهش معنی داری در محتوای کل فنل مشاهده شد (جدول ۴). مطابق با نتایج این مطالعه، اثرات تحریک کنندگی نانو ذرات کربنی در تولید و انباشت ترکیبات فنولیکی وابسته به غلظتشان است. در مطالعه Zlotek و همکاران (۲۰۲۰) از الیستورهای جاسمونیک اسید و عصاره مخمر در حالت رویشی بر روی گیاه انجدان استفاده شد و فرآیند الیستیشن منجر به افزایش محتوای کلروفیل، محتوای کل فنل و آنزیم پلی فنل اکسیداز شد. در مطالعه ای، تأثیر نانو لوله های کربنی بر

تحت تأثیر نانوذرات گرافن اکسید در کالوس بارهنگ (Ghorbanpour *et al.*, 2018) و نانوذرات نقره در کدو حلویایی (Chung *et al.*, 2018) و نانو لوله های کربنی در مرزه خوزستانی (Ghorbanpour and Hadian, 2015) گزارش شده است. در مطالعه حلقومی و همکاران (۱۳۹۹) افزایش معنی دار در محتوای پراکسید هیدروژن تحت غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر از الیستور نانو لوله کربنی در گیاه ریحان مشاهده شد.

محتوای فنل کل: ترکیبات فنولیکی گروه بزرگی از متابولیت های ثانویه هستند که نقش دفاعی و آنتی اکسیدانی بسیاری در گیاهان ایفا می کنند (Naikoo *et al.*, 2019). ترکیبات فنولیکی در بافت های گیاهی تحت تأثیر تنش افزایش می یابند. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مختلف بیوشیمیایی کالوس در انجندان رومی تحت تأثیر الیستور GO-SiO₂

صفات اندازه‌گیری شده						
تیمار GO-SiO ₂	فنل کل (میلی گرم گالیک اسید در گرم وزن تر)	محتوای کل فلاونول	فلاونوئید کل (میلی گرم کوئرستین در گرم وزن تر)	آنتوسیانین کل (میکرومول در گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی گرم در گرم وزن تر)	کاروتنوئید کل
شاهد	۳۹/۰۱ ^c ± ۰/۳۳	۲/۰۷ ^d ± ۰/۰۵۷	۴/۶۴ ^c ± ۰/۲۷	۰/۰۰۱۲ ^b ± ۰/۰۰۱	۱۵/۷۳ ^d ± ۰/۰۴	۹/۲۶ ^d ± ۰/۰۰۵
۵ میلی‌گرم در لیتر	۴۱/۰۹ ^{bc} ± ۰/۰۶	۳/۰۷ ^c ± ۰/۰۰۳	۱۳/۵۱ ^b ± ۰/۵۵	۰/۰۰۱۹ ^b ± ۰/۰۰۰۳	۲۳/۵۸ ^a ± ۰/۵۲	۲۸/۱۱ ^a ± ۰/۷۸
۱۰ میلی‌گرم در لیتر	۴۷/۲۶ ^a ± ۰/۷۰	۵/۵۱ ^b ± ۰/۰۹۸	۲۸/۰۶ ^a ± ۱/۴۹	۰/۰۰۲ ^b ± ۰/۰۰۰۶	۲۰/۸۰ ^b ± ۰/۱۱۵	۱۸/۸۸ ^b ± ۰/۲۲
۲۰ میلی‌گرم در لیتر	۴۳/۱۸ ^b ± ۱/۴۴	۸/۱۸ ^a ± ۰/۰۲۷	۱۵/۲۹ ^b ± ۰/۲۸	۰/۰۷ ^a ± ۰/۰۰۷	۱۸/۹۱ ^c ± ۰/۲۶	۱۳/۴۶ ^c ± ۰/۸۹

هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف لاتین مشترک هستند در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

باعث افزایش معنی‌داری در محتوای فلاونوئید در غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در ریحان شد. در مطالعه رستمی و شوشتری (۱۳۹۸) اعمال نانوذرات اکسید سیلیس در کشت درون شیشه‌ای ریحان، منجر به افزایش معنی‌دار محتوای کل فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد شد و با افزایش غلظت الیستور کاهش معنی‌داری در میزان فلاونوئید مشاهده شد که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی داشت. مشابه با نتایج این مطالعه، استفاده از الیستور نانوذرات گرافن اکسید منجر به افزایش محتوای کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در کالوس شاهی (Golkar *et al.*, 2021) و بارهنگ (Ghorbanpour *et al.*, 2018) شد.

محتوای کل فلاونول: در این مطالعه، افزایش معنی‌دار در محتوای کل فلاونول تحت تأثیر نانوذره GO-SiO₂ مشاهده شد به طوری که میزان آن از مقدار ۲/۰۷ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر در تیمار شاهد تا حداکثر مقدار ۸/۱۸ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۴). در مطالعات قبلی تأثیر معنی‌دار الیستورهای زیستی و غیرزیستی بر افزایش معنی‌دار محتوای فلاونول‌ها در کشت کالوس گزارش شده است (Yazdani *et al.*, 2022; Rahmati *et al.*, 2023).

محتوای کل آنتوسیانین: آنتوسیانین‌ها، در انتهای مسیر بیوسنتز فلاونوئید در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند و زیر مجموعه‌ای از فلاونوئیدها محسوب می‌شوند (Tsuda, 2012).

روی کشت درون شیشه‌ای گیاه مرزه خوزستانی بررسی شد و نتایج نشان داد که بیشترین میزان محتوای فنل در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و تیمار شاهد نشان داد (Ghorbanpour and Hadian, 2015).

محتوای کل فلاونوئید: فلاونوئیدها گروه‌های بزرگی از ترکیبات فنلی متشکل از ۱۵ کربن هستند که در گیاهان در معرض تنش، به‌عنوان جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد در سلول‌های گیاهی عمل می‌کنند و کار پاکسازی OH را انجام می‌دهند و از این رو نقش مهم محافظت از گیاه در برابر تنش‌ها را ایفا می‌کنند (Lin *et al.*, 2016). در این مطالعه بیشترین (۲۸/۰۶ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر) و کمترین (۴/۶۴ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن تر) میزان فلاونوئید به‌ترتیب در غلظت‌های ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره و تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۴). تفاوت معنی‌داری از نظر محتوای فلاونوئید در غلظت‌های ۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از نانو ذره مشاهده نشد (جدول ۴). الیستورها باعث تأثیرات مثبت در افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سنتز ترکیبات فنولیک می‌شوند و از جمله سبب افزایش سنتز محتوای فلاونوئید کل و در نتیجه افزایش مقدار تجمع فلاونوئیدها تحت تأثیر الیستور می‌شوند (Talukder *et al.*, 2016). در مطالعه حلقومی و همکاران (۱۳۹۹) تأثیر الیستور نانو لوله‌های کربنی چند لایه

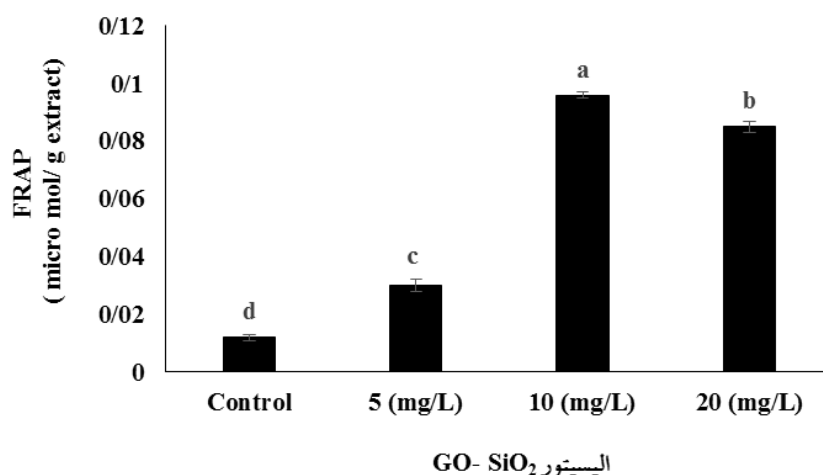
تولید آنتوسیانین‌ها، تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی افزایش یا کاهش می‌یابد (Lev-Yadun and Gould, 2009). مطابق با نتایج جدول ۴، اعمال نانوذره منجر به افزایش تصاعدی در محتوای آنتوسیانین کل در کالوس انجدان شد به طوری که بیشترین میزان (۰/۰۷ میکرومول در گرم وزن تر) در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذره مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. افزایش معنی‌دار در محتوای کل آنتوسیانین با سایر مطالعات در کالوس بن‌سرخ (Yazdani et al., 2022)، شاهی (Golkar et al., 2021) و بادرنجبویه (موسوی و رضوی‌زاده، ۱۴۰۰) مطابقت نشان می‌دهد. در مطالعه چمنی و همکاران (۱۴۰۰) تأثیر نانوذرات نقره بر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی استویا تحت شرایط درون شیشه‌ای افزایش معنی‌داری در محتوای آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد نشان داد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت این نانوذره روی این گیاه و محتوای آنتوسیانین آن بوده است.

محتوای کل کلروفیل: کلروفیل از مهمترین رنگیزه‌های فتوسنتزکننده گیاهی است که تولید و تجمع آن در سلول‌های گیاهی تحت تأثیر تنش‌های محیطی دچار تغییر می‌شود. در این مطالعه بیشترین غلظت کلروفیل (۲۳/۵۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) تحت غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره مشاهده شد که دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد بود (جدول ۴). به‌عبارت دیگر غلظت پایین نانوذره منجر به تحریک فعالیت مسیرهای ساخت کلروفیل شد (جدول ۴). غلظت‌های متوسط و بالای نانوذره (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) منجر به کاهش معنی‌دار در محتوای کل کلروفیل شد که این نتیجه می‌تواند ناشی از تأثیر منفی غلظت‌های بیشتر نانو ذره بر ساختارهای کلروپلاستی و تخریب این ساختارها باشد. جلوگیری از عملکرد سیستم‌های فتوسنتزی می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار در محتوای کل کلروفیل در کالوس انجدان شده باشد. در مطالعه موسوی و رضوی‌زاده (۱۴۰۰) اعمال فلز سنگین کادمیوم به‌عنوان الیسیتور منجر به کاهش معنی‌دار در محتوای کل کلروفیل شد که با نتایج این مطالعه مطابقت نشان می‌دهد. تأثیر الیسیتورهای مختلف بر محتوای کل کلروفیل در کشت

کالوس گیاهان مختلف از جمله بن‌سرخ (Yazdani et al., 2022) و تنباکو (Huang et al., 2019)، منجر به افزایش معنی‌دار در محتوای کل کلروفیل شد که این تفاوت در نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع و غلظت الیسیتور استفاده شده و همین طور گونه گیاهی تحت مطالعه باشد.

محتوای کل کاروتنوئید: کاروتنوئیدها (شامل کاروتن و گزانتوفیل‌ها) آنتی‌اکسیدان‌های چربی دوستی هستند که به‌عنوان ساختارهایی با وزن مولکولی کم در کلروپلاست مشاهده می‌شوند و تحت تنش‌های محیطی، غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. مطابق با نتایج این مطالعه بیشترین میزان کل کاروتنوئید (۲۸/۱۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره و کمترین مقدار (۹/۲۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۴). غلظت‌های متوسط و بالای نانوذره (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) منجر به کاهش معنی‌دار در محتوای کل کاروتنوئید نسبت به غلظت کم نانوذره (۵ میلی‌گرم در لیتر) شد (جدول ۴). مشابه با نتایج این مطالعه، بیشترین محتوای کل کاروتنوئید در کشت کالوس بن‌سرخ (یزدانیان، ۱۳۹۹)، تحت تأثیر غلظت ۵۰ میکرومولار از الیسیتور متیل جاسمونات گزارش گردید که افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. مطالعه موسوی و رضوی‌زاده (۱۴۰۰) با افزایش غلظت الیسیتور کادمیوم کاهش معنی‌داری در میزان کاروتنوئید در کالوس بادرنجبویه مشاهده شد. کاهش میزان کاروتنوئیدها ناشی از تخریب رنگدانه‌های کاروتنوئیدی کالوس هست که توسط نانوذره $GO-SiO_2$ در غلظت‌های متوسط و بالا ایجاد شده است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی احیاکنندگی آهن (FRAP): آنتی‌اکسیدان‌ها از دسته ترکیباتی گیاهی هستند که به‌صورت مؤثر و راه‌های مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده و در کاهش مرگ سلولی و آسیب لپیدی سلول‌های گیاهی مؤثر بوده‌اند. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس‌های انجدان رومی تحت تأثیر الیسیتور با استفاده از



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره GO-SiO₂ بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP در کشت کالوس انجدان رومی

جدول ۵- همبستگی بین صفات مختلف اندازه‌گیری شده در کشت کالوس انجدان رومی

H ₂ O ₂	FRAP	محتوای کل کاروتنوئید	محتوای کل کلروفیل	محتوای کل آنتوسیانین	محتوای کل فلاونوئید	محتوای کل فلاونول	محتوای کل فنول
							۱
							محتوای کل فنل
						۱	۰/۵۶*
							محتوای کل فلاونول
					۱	۰/۵۱	۰/۸۷**
							محتوای کل فلاونوئید
				۱	۰/۱۲	۰/۸۸**	۰/۱۲
							محتوای کل آنتوسیانین
			۱	-۰/۰۸	۰/۵۰	۰/۰۸	۰/۳۷
							محتوای کل کلروفیل
		۱	۰/۹۷**	-۰/۲۴	۰/۳۶	-۰/۱۲	۰/۲۱
							محتوای کل کاروتنوئید
	۱	۰/۰۱	۰/۲۲	۰/۴۸	۰/۸۵**	۰/۸۶**	۰/۸۴**
							FRAP
۱	۰/۷۹**	۰/۰۱	۰/۲۹	۰/۸۲**	۰/۴۹	۰/۹۴**	۰/۶*
							H ₂ O ₂

* و ** به ترتیب بسیار معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

کربنی نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد و این افزایش معنی‌داری در بالاترین غلظت نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر در غلظت بالای الیستور استفاده شده بود. در مطالعه هاشمیان و همکاران (۱۳۹۹) افزایش معنی‌داری خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP با افزایش الیستورهای متیل جاسمونات (۵۰ میکروگرم در لیتر) و سالیسیلیک اسید (۱۰۰ میکروگرم در لیتر) در گیاه کلپوره گزارش شد.

همبستگی صفات: همبستگی بین صفات مختلف اندازه‌گیری شده در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که نشان داده است، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین محتوای کل

روش تخمین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP Ferric Reducing Ability of Plasma) انجام گرفت. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار GO-SiO₂ با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (۰/۰۹۶ میکرومول آهن در گرم عصاره) و کمترین مقدار در تیمار شاهد (۰/۰۱۲ میکرومول آهن در گرم عصاره) مشاهده شد (شکل ۲). برخی مطالعات انجام‌شده در کشت کالوس بیانگر افزایش معنی‌دار در فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش FRAP بوده است (Sarkate *et al.*, 2017). در مطالعه حلقومی و همکاران (۱۳۹۹)، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی FRAP در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانولوله

تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت کالوس در انجدان رومی داشت. تأثیر هر الیستور برای پاسخ حداکثری در تولید متابولیت ثانویه، به غلظت الیستورو زمان انکوباسیون با الیستور دارد. استفاده از الیستور ۱۰ میکرومولار نانو ذره منجر به افزایش معنی‌داری میزان محتوای کل فنل (۱/۲۱ برابر) و فلاونوئید (۶/۲۹ برابر) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۸ برابر) نسبت به شاهد شد. غلظت ۲۰ میکرومولار منجر به افزایش معنی‌داری در میزان محتوای فلاونول کل به میزان (۳/۹۵ برابر) نسبت به شاهد شد. غلظت ۵ میکرومولار منجر به افزایش معنی‌دار در محتوای کلروفیل کل (۱/۵۳ برابر) و محتوای کاروتنوئید (۳/۰۳ برابر) نسبت به شاهد شد. نانوذره GO-SiO₂ (۲۰ میکرومولار) منجر به افزایش معنی‌داری میزان محتوای H₂O₂ کل به میزان (۲/۲۲ برابر) نسبت به شاهد شد. بنابراین استفاده از غلظت بهینه نانو ذره GO-SiO₂ در کشت کالوس می‌تواند منجر به تولید بهینه متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در دارویی در گیاه انجدان رومی شود. این نتایج کارایی بالای نانوذره GO-SiO₂ را به‌منظور افزایش متابولیت‌های ثانویه مختلف و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کالوس گیاه انجدان رومی نشان داد.

فنل با محتوای کل فلاونول (*۰/۵۶)، محتوای کل فلاونوئید (**۰/۸۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (**۰/۸۴) و پراکسید هیدروژن (*۰/۶)، مشاهده شد. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای کل فلاونول با فعالیت آنتی‌اکسیدانی (**۰/۸۶) و محتوای کل فلاونوئید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی (**۰/۸۵) دیده شد. مطابق با نتایج این مطالعه ترکیبات فنلی موجود در کالوس انجدان رومی نقش عمده و مؤثری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه در شرایط کشت سلولی داشتند. همبستگی مثبت بین محتوای کل فنل، فلاونول و فلاونوئید با فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان‌دهنده این است که استفاده از الیستور منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی به‌وسیله تجمع یافتن بیشتر ترکیبات فنولیکی، فلاونولی و فلاونوئیدی در کشت کالوس انجدان رومی شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق به‌صورت کلی نشان داد که تیمار سرمادهی قبل از کشت بذور در انجدان و اضافه کردن اسید جیبرلیک به محیط کشت، بهترین تیمار ترکیبی جهت افزایش جوانه‌زنی در این گیاه مرتهی بود. استفاده از غلظت‌های مختلف نانو ذرات گرافن اکسید حاوی نانو ذرات سیلیسیوم تأثیر معنی‌داری بر

منابع

- خطیب‌زاده، راحله، عزیزی، مجید، آرویی، حسین، و فارسی، محمد (۱۳۹۰). مطالعه اثر نوع ریزنمونه و سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد بر کال‌زایی در گیاه دارویی *Levisticum officinale* Koch - فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۹(۲)، ۳۹۸-۳۸۷. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2863>
- خداشناس، منصوره، غنچه‌پور، ماشالله، جم‌زاد، زیبا، جلیلی، عادل، و محمودی، محمد (۱۳۹۹). جایگاه حفاظتی گونه نادر *Levisticum officinale* در ایران. نشریه طبیعت ایران، ۵(۳)، ۱۲۹-۱۳۵. <https://doi.org/10.22092/irn.2020.122123>
- حلقومی، رقیه، حسینی سرقین، سیاوش، خارا، جلیل، و حسینی، بهمن (۱۳۹۹). تأثیر اثر تیمار با نانولول‌های کربنی چند لایه به عنوان الیستور در افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.). فرآیند و کارکرد گیاهی، ۱۰(۴۲)، ۲۶۷-۲۸۲. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.23222727.1400.10.42.16.8>
- رستمی، فاطمه، و شوشتری، لیلیا (۱۳۹۸). بررسی نقش الیستوری نانوذرات اکسید سیلیس و اکسید آلومینیوم بر تغییرات ترکیبات ثانویه و محتوای موسیلاژ در کشت درون شیشه‌ای گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.). مقاله کنفرانسی، شانزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان.

موسوی، نسیم سادات، و رضوی زاده، رویا (۱۴۰۰). بررسی تغییرات ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه کالوس‌ها و گیاهچه‌های بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت تنش فلز سنگین کادمیوم. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۱۰(۴۱)، ۱۷. <http://dorl.net/dor/20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7>

چمنی، اسماعیل، گل محمدی، نوشین، پوربیرامی هیر، یونس، و شهبازی یاجلو، رقیه (۱۴۰۰). تأثیر نانوذرات نقره بر تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی استویا تحت شرایط درون شیشه‌ای. پنجمین کنگره بین‌المللی توسعه کشاورزی، منابع طبیعی، محیط زیست و گردشگری ایران.

یزدانیان، عصمت (۱۳۹۹). اثرات متیل جاسمونات و پوتریسین بر متابولیت‌های ثانویه در گیاه بن‌سرخ (*Allium jesdianum* Boiss). پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و مهندسی مرتع - گیاهان دارویی و صنعتی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

هاشمیان، ملیحه، گنجعلی، علی، و چینیانی، منیره (۱۳۹۹). تأثیر البیسیتورهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کلپوره (*Teucrium polium* L.) در شرایط *in vitro*. زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۱۲(۴۴)، ۷۶. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2020.118410.1164.76>

Amiri, M. S. & Joharchi, M. R. (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(6), 621-635.

Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1), 112-121.

Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

Bhat, J. A., Rajora, N., Raturi, G., Sharma, S., Dhiman, P., Sanand, S., Shivaraj, S. M., Sonah, H., & Deshmukh, R. (2021). Silicon nanoparticles (SiNPs) in sustainable agriculture: Major emphasis on the practicality, efficacy and concerns. *Nanoscale Advances*, 3(14), 4019-4028. <https://doi.org/10.1039/D1NA00233C>

Biswas, P. D. & Wu, C. Y. (2005). Critical review: Nanoparticles and the environment. *Journal Air Waste Manager*, 55, 708-746. <https://doi.org/10.1080/10473289.2005.10464656>

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>

Chung, M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018). Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter melon. *National Center for Biotechnology Information*, 8(10), 412. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1439-0>

Epstein, E. (2009). Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology*, 155, 155-160. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00343.x>

Ghorbanpour, M. & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749-759. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.056>

Gholami, T., Salavati-Niasari, M., Bazarganipour, M., & Noori, E. (2013). Synthesis and characterization of spherical silica NPs by modified Stöber process assisted by organic ligand. *Superlattices and Microstructure*, 61, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2013.06.004>

Ghorbanpour, M., Farahani, A. H. K., & Hadian, J. (2018). Potential toxicity of nano-graphene oxide on callus cell of *Plantago major* L. under polyethylene glycol-induced dehydration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 910-922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.061>

Golkar, P., Abdollahi Bakhtiari, M., & Bazarganipour, M. (2021). The effects of nanographene oxide on the morpho-biochemical traits and antioxidant activity of *Lepidium sativum* L. under *in vitro* salinity stress. *Scientia Horticulturae* 288, 110301. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110301>

Golkar, P. & Taghizadeh, M. (2018). *In vitro* evaluation of phenolic and osmolite compounds, ionic content, and antioxidant activity in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under salinity stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134, 357-368. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-018-1427-4>

Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., & Kuboi, T. (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Science*, 164(2), 259-265. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00408-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00408-9)

- Hassanpour, H., Ahmadi, N., Hekmati, M., & Ghanbarzadeh, M. (2020). Effect of SiO₂ nanoparticles on phytochemical and anatomical alterations in *Anthemis gilanica*. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 10(3), 3223-3231. <http://dx.doi.org/10.30495/IJPP.2020.1890482.1194>
- Hatami, M., Naghdi Badi, H., & Ghorbanpour, M. (2018). Nano-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells. *Journal of Medicinal Plants*, 18(71), 6-36. <http://dx.doi.org/10.29252/jmp.3.71.6>
- He, Y., Hu, R., Zhong, Y., Zhao, X., Chen, Q., & Zhu, H. (2017). Graphene oxide as a water transporter promoting germination of plants in soil. *Journal Home Nano Research*, 11(4), 1928-1937. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1810-1>
- Hogg, C. L., Svoboda, K. P., Hampson, J. B., & Brocklehurst, S. (2001). Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from lovage (*Levisticum officinale* W. D. J. Koch). *The International Journal of Aromatherapy*, 11 (3), 567-575. [http://dx.doi.org/10.1016/S0962-4562\(01\)80050-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-4562(01)80050-3)
- Huang, J., Feng, P., Chen, N., Liu, P., Li, P., & Liao, X. (2019). Effect of GO on the formation and differentiation of tobacco leaf callus and its antioxidant capacity. *Materials Science and Engineering*, 493, 012015. <http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/493/1/012015>
- Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., & Gurel, E. (2018). Elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Stevia rebaudiana* bertoni grown under ZnO and CuO nanoparticles stress. *Sugar Tech*, 20, 194-201. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0539-1>
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Yang, X., Zhongrui, L., Watanabe, F., & Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *American Chemical Society Nano*, 3(10), 3221-3227. <https://doi.org/10.1021/nn900887m>
- Khodashenas, M., Keramat, B., & Emamipoor, Y. (2015). Callus induction and PLBs production from *Levisticum officinale* koch (a wild medicinal plant). *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 5(10), 172-180.
- Kuzniak, E. & Urbanek, H. (2000). The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22, 195-203. <https://doi.org/10.1007/s11738-000-0076-4>
- Winefield, Ch., Davies, K., & Gould, K. (2009). Role of anthocyanins in plant defence. In: Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications (eds. Lev-Yadun, S. and Gould, K. S.) Pp. 22-28. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3-2>.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21, 1374. DOI: 10.3390/molecules21101374
- Mandeh, M., Omid, M., & Rahaie, M. (2012). *In Vitro* influences of TiO₂ nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue culture. *Biological Trace Element Research*, 150(1-3), 376-380. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-012-9480-z>
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in Plant Science*, 8, 832-828. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832>
- Mosavat, N., Golkar, P., Yousefifard, M., & Javed, R. (2019). Modulation of callus growth and secondary metabolites in different thymus species and *Zataria multiflora* micropropagated under ZnO nanoparticles stress. *Journal Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(3), 316-322. <https://doi.org/10.1002/bab.1727>
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F. A., & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant Signaling Molecules*, 157-168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>
- Oksman-Caldentey, K. M. & Inze, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Service Civil International*, 9, 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>
- Park, W. T., Kim, Y. K., Uddin, M. R., Park, N. I., Kim, S. G., Lee, S. Y., & Park, S. U. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration of Lovage (*Levisticum officinale* koch). *Journal Plant Omics*, 3(5), 159-161. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0735-1>
- Rahmati, M., Golkar, P., & Tarkesh, M. (2023). Effects of methyl jasmonate elicitation on the carvone and limonene contents, phenolic compounds and antioxidant activity in caraway (*Carum carvi* L.) callus cultures. *Natural Product Research*, 1-6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2169862>
- Ray, S. (2015). Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials: William Andrew. *Journals Materials Research Society Bulletin*, 41(2), 92. <https://doi.org/10.1557/mrs.2016.17>
- Rastogi, A., Tripathi, D. K., Yadav, S., Chauhan, D. K., Zivcak, M., Ghorbanpour, M., El-Sheery, N., & Brestic, M. (2019). Application of silicon nanoparticles in agriculture. *Journal Review 3 Biotech*, 9(3), 90. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1626-7>
- Sarkate, A., Banerjee, S., Mir, J. I., Roy, P., & Sircar, D. (2017). Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 130(3), 641-649. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-017-1253-0>

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Talukder, P., Talapatra, S., Ghoshal, N., & Sen Raychaudhuri, S. (2016). Antioxidant activity and high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds during *in vitro* callus culture of *Plantago ovata* Forsk. and effect of exogenous additives on accumulation of phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 232-244. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7086>
- Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(1), 159-170. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science*, 151(1), 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Yazdani, E., Golkar, P., Vahabi, M. R., & Taghizadeh, M. (2022). Elicitation effects on some secondary metabolites and antioxidant activity in callus cultures of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse.: Methyl jasmonate and putrescine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(2), 601-619.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03643-4>
- Zhou, L. G. & Wu, J. Y. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23(5), 789-810. <https://doi.org/10.1039/b610767b>
- Złotek, U., Szymanowska, U., Rybczyńska-Tkaczyk, K., & Jakubczyk, A. (2020). Effect of jasmonic acid, yeast extract elicitation, and drying methods on the main bioactive compounds and consumer quality of lovage (*Levisticum officinale* Koch). *Foods*, 9(3), 323. <https://doi.org/10.3390/foods9030323>

Effects of graphene oxide incorporated with silicon dioxide on some secondary metabolites of *Levisticum officinale* Koch. through callus culture

Reihaneh Safary¹, Pooran Golkar^{1*}, Mehdi Bazarganipour³

¹ Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, 84156-83111, Isfahan, Iran

² Research Institute for Nanotechnology and Advanced Materials, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: 2023/04/18, Accepted: 2023/06/20)

Abstract

Considering the importance of medicinal compounds in medicinal plant species, the production of secondary medicinal metabolites through callus cultivation and subsequent elicitation is economical and time-saving. *Levisticum officinale* Koch. is one of the valuable indigenous rangeland plants of Iran, which has many medicinal and industrial properties. This study was carried out to optimize callus induction and the effects of different concentrations of GO-SiO₂ on the amounts of different secondary metabolites and antioxidant activity under callus culture. For callus induction, the hypocotyl explants were transferred to Murashige and Skoog (MS) culture medium containing different growth regulators. Analysis of variance showed that different plant growth regulators had a significant effect on The MS media supplemented with 1.5 mg/L 2,4-D + 0.025 mg/L (NAA) + 0.5 Kin showed the best percentage of callus production (95%). In order to investigate the effect of the elicitor on the amount of secondary metabolites in the callus, different concentrations of GO-SiO₂ (0, 5, 10 and 20 mg/L) were chosen as elicitors. The selected nanoparticle showed positive and stimulatory effects on the amount of secondary metabolites and antioxidant activity in the callus. The highest content for total phenolics (47.26 mg GAE/g FW), total flavonoids (28.06 mg QE/g FW) and antioxidant activity FRAP (0.096 μ mol /g extract) was observed under 10 mg/L of GO-SiO₂. The highest contents for total flavonols (8.18 mg QE /g FW), H₂O₂ (5.09 μmol/g FW) and total anthocyanin (0.07 μmol/g FW) were observed under 20 mg/L GO-SiO₂ treatment. The highest level of carotenoid content (28.11 mg/g FW) and chlorophyll (23.58 mg/g FW) were observed under 5 mg/ L GO-SiO₂. The results of this study can be used to optimize the production of secondary medicinal metabolites in this valuable medicinal plant. According to the results of this study, the application of graphene oxide nanoparticle GO-SiO₂ (10 mg/L) could be used for the highest production of total phenolics and flavonoids as well as increasing the antioxidant activity through callus culture in this valuable plant of Iran.

Keyword: Antioxidants, Elicitor, Flavonoid, Total phenol content

Corresponding author, Email: poorangolkar@gmail.com; golkar@iut.ac.ir