

## تغییرات تولید دیوسژنین در گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) در کشت درون شیشه‌ای

ثنا حقی قراقلو<sup>۱</sup>، بابک عبدالمهی مندولکانی<sup>۲</sup> و محمدرضا قلمبران<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده

شنبلیله یک گیاه دو لپه و یکساله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. است که کاربرد بسیاری در صنعت داروسازی و طب سنتی دارد. دیوسژنین یک ساپونین استروئیدی با فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع است که در گیاهان مختلفی از جمله شنبلیله وجود دارد و در اندام‌های هوایی، ریشه و دانه آن یافت می‌شود و به عنوان پیش‌ساز هورمون‌های پروژسترون و استروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزایش تولید دیوسژنین در شنبلیله مستلزم تحریک تولید ساپونین است و تولید ساپونین‌ها تحت تأثیر عوامل زیستی یا غیرزیستی قرار دارد. در مطالعه حاضر تأثیر مصرف نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) بر مقدار تولید دیوسژنین در ریشه گیاه شنبلیله در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط کشت MS ارزیابی شد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکرومولار در سه محیط کشت MS مایع در شرایط آزمایشگاه بودند. نتایج حاصل نشان داد که نوع محیط کشت بر طول ریشه، طول اندام هوایی و وزن خشک ساقه تأثیر معنی‌داری دارد به طوری که بیش‌ترین رشد در محیط MS پایه مشاهده شد. همچنین تأثیر نانوذرات بر وزن تر ریشه و سطح برگ معنی‌دار شد ولی وزن خشک ریشه تحت تأثیر قرار نگرفت. اثرات متقابل محیط کشت در نانوذرات بر وزن تر ساقه و میزان دیوسژنین معنی‌دار بود به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) بیش‌ترین مقدار دیوسژنین در محیط کشت MS مایع بدون حضور کمپلکس Fe-EDTA (اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید) در غلظت ۳۰۰ میکرومولار در ریشه تولید شد که دو برابر میزان دیوسژنین در شاهد بود. همچنین اثر متقابل هر دو عامل بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌ها نیز مربوط به محیط کشت فاقد آهن و با حضور EDTA بود.

واژگان کلیدی: شنبلیله، دیوسژنین، کشت درون شیشه‌ای، نانوذرات آهن، متابولیت ثانویه

### مقدمه

تولید داروهای مختلف از آن‌ها استفاده می‌شود. از مزایای مهم

عمدتاً مواد دارویی گیاهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در مواد دارویی گیاهی برخلاف مواد سنتز شده شیمیایی، داشتن

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۱۹، بازنگری: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳، پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۷، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۱۲

\* نویسنده مسئول، رایانامه: [m\\_ghalamboran@sbu.ac.ir](mailto:m_ghalamboran@sbu.ac.ir)



حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. © ۱۴۰۳

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

بیش از گذشته مورد توجه است مانند تبدیل ترکیبات از اندازه‌های میکرو به مقیاس نانوذرات، که می‌تواند فرایندهای جذب عنصر و متابولیسم سنتز ترکیبات و مواد مؤثره دارویی گیاهی حائز اهمیت باشند (Liu et al., 2010). براساس مطالعات گذشته تغییر ابعاد ذرات از میکرو به نانو می‌تواند واکنش‌پذیری هر ماده‌ای را به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد. در حقیقت با این تغییر در ابعاد ذرات، نسبت سطح به حجم ذرات افزایش خواهد یافت و این همان عامل تشدید و تقویت واکنش‌پذیری ماده در واکنش‌های بیوشیمیایی و شیمیایی است، لذا امروزه از این ویژگی برای اصلاح و کارآمدی مکانیسم‌های زیستی و تغییرات مورد نظر در واکنش‌ها شیمیایی استفاده کرد (Zaman et al., 2025). برخی از نانوذرات می‌توانند گیاه را در برابر تنش‌های غیرزیستی محافظت کرده و رشد گیاه را بهبود بخشند (Ioannou et al., 2020).

عنصر آهن یکی از عناصر ضروری و مهم در رشد و نمو گیاهان است که نقش بسیار مهمی در فتوسنتز، تنفس و تثبیت نیتروژن دارد و همچنین برای سنتز کلروفیل و RNA مورد نیاز است. در بخش کاتالیزوری بسیاری از آنزیم‌های اکسیداسیون و احیا آهن مورد نیاز است که در طبیعت به دو فرم موجود است، فرم محلول در آب (فرو  $Fe^{2+}$ ) و فرم غیرمحلول (فریک  $Fe^{3+}$ ) (Thomine and Vert, 2013) می‌تواند منتج به بهبود فرآیند بیوسنتز و تولید دیوسژنین شود. در نتیجه مدیریت دقیق آهن و حضور مؤثر آن در گیاه موجب تقویت مسیرهای متابولیت‌های ثانویه و افزایش فعالیت آنزیم‌های وابسته به آهن می‌شود (Kobayashi and Nishizawa, 2012). رایج‌ترین انواع کوفاکتورهای آهن، به ترتیب فراوانی شامل کمپلکس آهن-گوگرد، هم (heme)، آهن دوگانه (di-iron) یا آهن تک هسته‌ای هستند که هر یک دامنه عملکردی متفاوتی دارند و این کوفاکتورها برای بسیاری از آنزیم‌های کاتالیزکننده واکنش‌های اکسیداتیو ضروری‌اند، از جمله سیتوکروم P450 که چند مرحله هیدروکسیلاسیون در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه انجام می‌دهد (Balk and Schaedler, 2014; Nguyen

عوارض سوء جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی است (Kooti et al., 2016; Rates, 2001). گیاه شنبلیله که یک گیاه دولپه‌ای و یکساله و از خانواده Leguminoase است، که به دلیل داشتن ترکیبات مؤثره دارویی مهم جز گیاهان دارویی پرمصرف محسوب می‌شود و قسمت‌های مختلف آن برای درمان برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای نمونه، دانه‌های شنبلیله که حاوی موسیلاژ قوی هستند در درمان زخم معده و مشکلات گوارشی و کاهش التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرند، همچنین طبق تحقیقات انجام‌شده برگ‌ها و دانه‌های این گیاه خواص ضدالتهاب، ضدکلسترول و ضدسرطان دارند (Mehrafarin et al., 2011). یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه تولیدی در گیاه شنبلیله، دیوسژنین است که یک ساپونین استروئیدی است و به‌عنوان یکی از پیش‌سازهای مهم سنتز هورمون‌های استروئیدی استفاده می‌شود (Diarra et al., 2013). همچنین از اسانس این گیاه به‌عنوان طعم‌دهنده غذاها استفاده می‌شود. از دیگر ترکیبات مؤثره دارویی در گیاه شنبلیله، وجود ترکیبات کولین، اسید لینولنیک، اسید لینولئیک و اسید استتاریک است. البته میزان هر یک از این ترکیبات بسته به نوع گونه گیاهی و شرایط کاشت، آب و هوا و سایر عوامل زراعی تغییر پیدا می‌کند (Sarwar et al., 2020). براساس تحقیقات گذشته بیان شده است که دیوسژنین از دو مسیر آنزیمی در گیاه سنتز می‌شود، مسیر تبدیل اسکوالن به لانوسترول و تبدیل اسکوالن به سیکلوآرتنول (Chaudhary et al., 2015).

کشت درون‌شیشه‌ای (in vitro) اندام‌ها و سلول‌های گیاهی یکی از راهکارهای مهم برای تولید متابولیت‌های ثانویه است. این ترکیبات می‌توانند با بهینه‌سازی ترکیب محیط‌کشت، افزودن پیش‌سازها و محرک‌ها (elicitors) و فراهم آوردن شرایط مناسب افزایش یابند. نانوذرات به‌عنوان منبع غذایی و محرک در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه عمل می‌کنند (Heydari et al., 2020).

امروزه کاربرد عناصر به فرمی که امکان جذب و بهبود فرایندهای متابولیسم آنها نسبت به فرم‌های گذشته ارتقاء یابد

می‌توانند میزان دیوسژنین را تحت تأثیر قرار دهند مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

**استریل کردن بذر:** بذره‌های گیاه شنبلیله از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. تمام وسیله‌های مورد نیاز جهت استریل شامل صافی پارچه‌ای، کاغذ صافی، پنس، بشر، آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. پتری‌دیش‌ها در زیر نور UV به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. بذرها ابتدا توسط آب مقطر استریل‌شده شستشو داده شدند سپس به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ (V/V) قرار گرفتند و بعد با آب مقطر استریل‌شده مجدد به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. در مرحله آخر بذرها به مدت ۵ دقیقه در داخل محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ (V/V) قرار داده شدند و در نهایت چهار بار به مدت زمان ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه توسط آب مقطر استریل‌شده شستشو داده شدند. پس از اتمام ضدعفونی ۲۵ عدد بذر داخل پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی و ۴ میلی‌لیتر آب با فاصله از هم قرار داده شدند و اطراف پتری‌دیش‌ها توسط سلفون به‌طور کامل بسته شد تا رطوبت حفظ شود و به منظور جوانه‌زنی پتری‌دیش‌ها به مدت دو روز با دوره نوری ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت قرار گرفتند. تمام مراحل استریل کردن بذرها زیر هود لامینار انجام گرفت.

#### تهیه محیط‌های کشت و افزودن تیمارها: در این پژوهش

از سه محیط‌کشت مایع MS که از نظر محتوای میکروذرات آهن با یکدیگر متفاوت بودند تهیه شد (جدول ۱). غلظت EDTA طبق استاندارد محیط‌کشت MS به محیط حاوی EDTA اضافه شد و pH محیط‌کشت‌ها در محدوده ۵/۸ - ۵/۷ تنظیم شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند.

#### سنتر نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ): سنتر

نانوذرات با محلول‌های نمک آهن که شامل  $FeCl_3$  (آهن کلرید شش آبه) و  $FeCl_2$  (آهن کلرید چهار آبه) با نسبت مولی ۲:۱

(and Dung, 2021). چهار آنزیم کلیدی در بیوسنتز تری‌ترین دیوسژنین در گیاهان شناخته شده است که شامل سیکلوآرتنول سینتاز (CAS)، اسکوالن سینتاز (SQS)، فارنسیل پیروفسفات سینتاز (FPPS) و ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم آردوکتاز (HMGR) است (Thimmappa et al., 2014; Sawai and Saito, 2011).

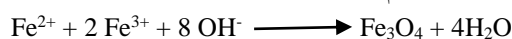
گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی، سازوکارهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی دارند. یکی از پیامدهای مهم تنش محیطی، ایجاد تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند، سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل است که برای بقای گیاه زیان‌آور است. سلول‌ها با بهره‌گیری از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز) و غیرآنزیمی (آسکوربات، گلوکاتینون، ترکیبات فنولی) از خود در برابر این ترکیبات محافظت می‌کنند (Li et al., 2013).

بر اساس تحقیقات گذشته درباره تأثیر محرک‌ها، آنچه مهم و قابل ذکر است، هر محرکی که بتواند میزان دیوسژنین تولیدی را افزایش دهد بیانگر آن است که باعث تقویت مسیر بیوسنتز دیوسژنین شده است و این تقویت از طریق تشدید و تقویت ترکیبات پیش‌ساز و فعالیت‌های متابولیسمی دخیل در ارتقاء کارایی فرآیند بیوسنتز دیوسژنین بوده است مانند افزایش تعداد و قدرت ریشه‌دهی یا از طریق افزایش سهم تولید دیوسژنین در واحد ریشه‌ای (Zhang et al., 2009). طبق تحقیقات پیشین تقویت فرآیند بیوسنتز دیوسژنین به هر دو دسته عوامل ژنوتیپی و محیطی بستگی دارد، و ترجیح مسیر بیوسنتز در گیاه شنبلیله تحت تأثیر عوامل مذکور موضوعی است که تا کنون به‌طور دقیق مشخص نشده است و دلیل آن نیز به قدرت انعطاف‌پذیری و سازگاری گیاه شنبلیله در شرایط مختلف محیطی بر می‌گردد. لذا در این پژوهش تأثیر نانوذرات اکسید آهن در محیط‌کشت MS بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی از آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز دیوسژنین که فعالیت آن‌ها تحت تأثیر آهن قرار دارد و

جدول ۱- مشخصات تیمار محیط‌کشت موراشینگ و اسکوگ (MS) مایع و غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

تیمارها	غلظت نانوذرات آهن (میکرومولار)
۱- محیط‌کشت MS استاندارد همراه با نانوذرات آهن	۰
۲- محیط‌کشت MS بدون کمپلکس Fe-EDTA همراه با نانوذرات آهن	۱۰۰
۳- محیط‌کشت MS بدون آهن همراه با EDTA و نانوذرات آهن	۲۰۰
	۳۰۰

وزن شد و سپس هر کدام در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه که توسط گاز نیتروژن اکسیژن‌زدایی شده بود حل گردید و سپس در یک بشر ریخته و توسط همزن و در دمای اتاق محلول‌های نمک با یکدیگر ترکیب شدند و جهت جلوگیری از اکسید شدن Fe<sup>2+</sup> با گاز نیتروژن پوشش‌دهی انجام شد، پس از گذشت ۱۵ دقیقه جهت رسوب نانوذرات آهن محلول آمونیاک ۲۵ درصد به صورت قطره‌ای به محلول اضافه گردید تا pH به حدود ۹-۱۱ برسد، تشکیل رسوب به رنگ سیاه به منزله تکمیل فرآیند رسوب‌دهی و تشکیل نانوذرات اکسید آهن است. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه نانوذرات تشکیل شده توسط آهن‌ریبا جدا کرده و چندین بار با آب دیونیزه اکسیژن‌زدایی شده و سپس با اتانول ۷۰ درصد شسته شدند تا pH آن خنثی شود. و رسوب حاصل در داخل محفظه خنثی قرار گرفت تا فرآیند خشک‌شدن انجام شود (Kashanian et al., 2017).



**آماده‌سازی نانوذرات جهت تست DLS:** پس از اتمام سنتز جهت بررسی اندازه، نانوذرات سنتز شده با نسبت ۱:۹ با آب دیونیزه رقیق شدند و سه بار به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدند و سپس جهت پراکنده سازی نانوذرات، محلول توسط دستگاه پروپ اولتراسونیک به مدت ۵ دقیقه با پوشش آب سرد سونیکیت شد و سپس متوسط قطر نانوذرات به کمک دستگاه DLS تعیین شد. همچنین جهت تعیین مشخصات نانوذرات سنتز شده آنالیزهای مربوط به FT-IR, XRD, TEM انجام شد (شکل ۱).

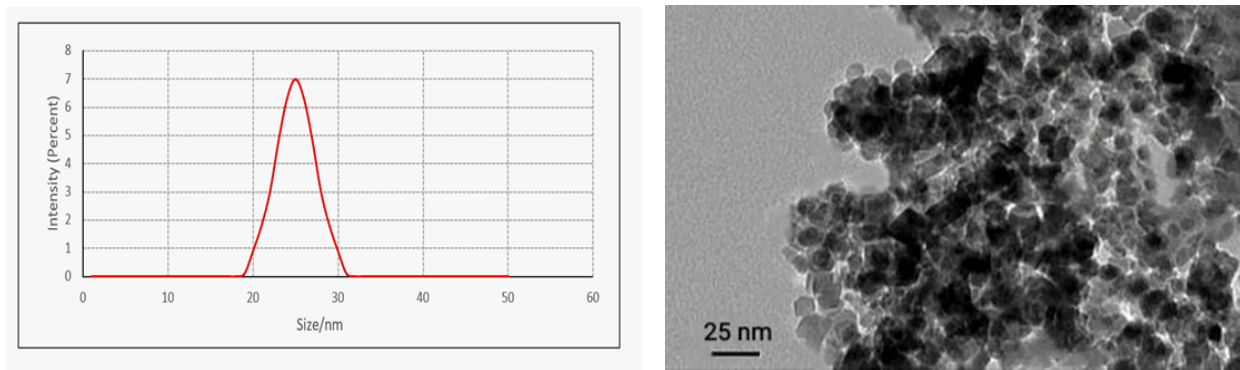
**کشت بذر و افزودن تیمار نانوذرات:** پس از اتوکلاو کردن محیط‌های کشت، در هر شیشه کشت استریل یک لایه کاغذ صافی و ۶ میلی‌لیتر محیط‌کشت و غلظت‌های مناسب

نانوذرات آهن اضافه شد (جدول ۲) و در هر شیشه کشت ۱۲ عدد بذر جوانه‌زده توسط پنس قرار داده و جهت رشد به مدت هفت روز در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به اتاق کشت منتقل شدند. **اندازه‌گیری شاخص‌های رویشی:** پس از هفت روز از زمان کشت بذرهای جوانه‌زده شنبلیله، نمونه‌برداری از ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تیمارهای مختلف انجام شد. از هر تیمار سه گیاهچه به‌طور تصادفی انتخاب شد و شاخص‌های رویشی شامل طول ریشه و اندام هوایی توسط نرم‌افزار Image J، و سطح برگ توسط نرم‌افزار Petiole Pro اندازه‌گیری شد.

**وزن تر و خشک:** ریشه و اندام هوایی گیاه توسط پنس از یکدیگر جدا شدند و به‌طور کامل با آب مقطر شستشو داده شده و توسط گاز استریل خشک شدند و جهت اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در درون آون با دمای ۷۰ درجه خشک گردید. هر دو وزن تر و خشک گیاهچه‌ها توسط ترازوی دقیق (یک هزارم گرم) وزن شدند.

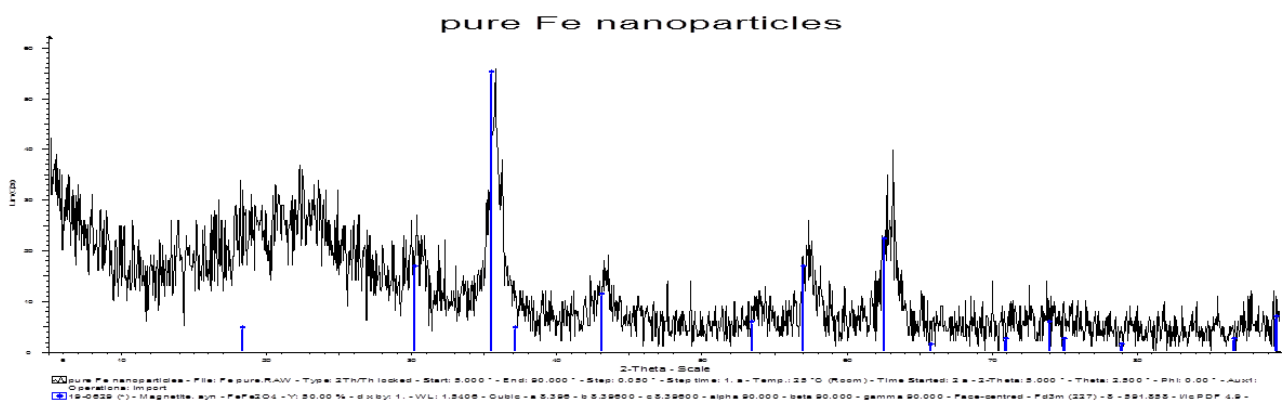
#### سنجش مقدار دیوسژنین توسط دستگاه HPLC: برای

این کار ریشه‌های گیاه جمع‌آوری شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه در آون خشک شد و سپس با هاون به‌طور کامل پودر گردید و ۱۵ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شدند و ۰/۵ میلی‌لیتر HCL ۲ نرمال به نمونه‌ها اضافه شد و به منظور هضم اسیدی به مدت ۳/۵ ساعت در بن‌ماری با دمای ۸۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از اتمام هضم اسیدی جهت خنثی‌سازی pH از NaOH ۲ نرمال استفاده شد و ۱ میلی‌لیتر n-هگزان سه مرتبه به نمونه‌ها اضافه شد و هر بار به مدت ۲ دقیقه با سرعت

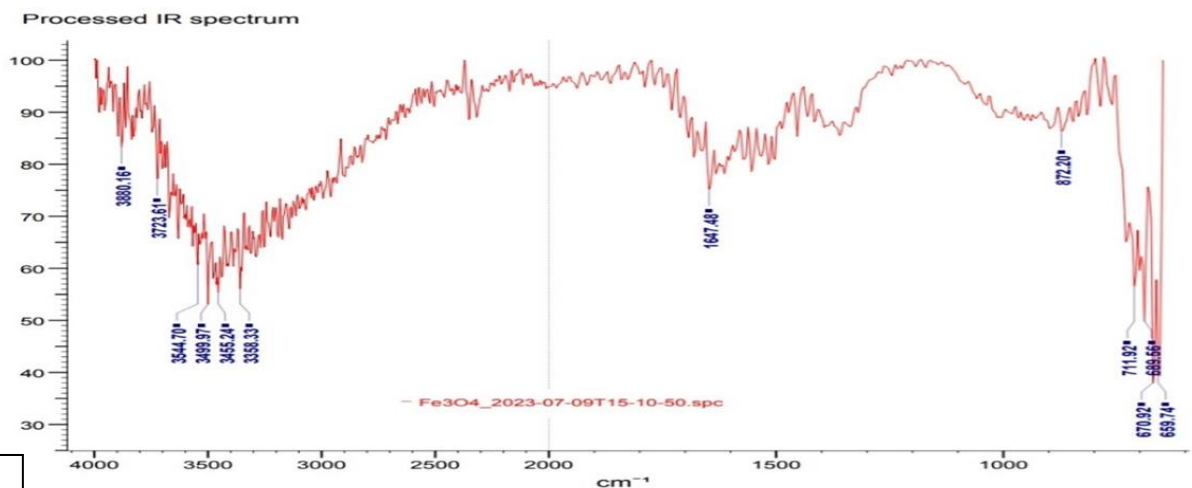


a

b



c



d

شکل ۱- (a) اندازه متوسط قطر نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) سنتز شده براساس نتایج دستگاه DLS. (b) نتایج تصویر TEM نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ). (c) نتایج XRD نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ). (d) نتایج آنالیز FT-IR نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ).

شدند و در نهایت هنگام تزریق به دستگاه ۰/۵ میلی لیتر متانول HPLC به هر نمونه اضافه شد (Motevalli et al., 2021).

۴۵۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام گرفت و ۳ میلی لیتر فاز بالایی جمع آوری و سپس در دمای اتاق و زیر هود لامینار خشک

جدول ۲- غلظت نانوذرات اکسید آهن سنتز شده در محیط‌های کشت مورد بررسی و غلظت میکروذرات آهن سولفات هفت آبه در محیط کشت موراشینگ و اسکوک (MS).

انواع محیط‌های کشت MS	نانوذرات Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /μMl <sup>-1</sup>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O /μMl <sup>-1</sup>	اسامی محیط‌های کشت MS
MS پایه	۰	۱۰۰	MS
MS پایه بدون کمپلکس Fe-EDTA	۰	۰	MSU
MS پایه بدون آهن همراه با EDTA	۰	۰	MSUE
MS پایه	۱۰۰	۱۰۰	MS100
MS پایه	۲۰۰	۱۰۰	MS200
MS پایه	۳۰۰	۱۰۰	MS300
MS پایه بدون کمپلکس Fe-EDTA	۱۰۰	۰	MSU100
MS پایه بدون کمپلکس Fe-EDTA	۲۰۰	۰	MSU200
MS پایه بدون کمپلکس Fe-EDTA	۳۰۰	۰	MSU300
MS پایه بدون آهن همراه با EDTA	۱۰۰	۰	MSUE100
MS پایه بدون آهن همراه با EDTA	۲۰۰	۰	MSUE200
MS پایه بدون آهن همراه با EDTA	۳۰۰	۰	MSUE300

کروماتوگرافی HPLC با ستون C18 و فازهای متحرک آب و استونیتریل انجام شد. دتکتور UV در طول موج ۲۰۳ نانومتر استفاده شد و غلظت‌ها با استاندارد دیوسژنین تعیین گردید. زمان اجرای هر نمونه ۱۸-۱۲ دقیقه بود.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی:** ۵ گرم از بافت ریشه تازه گیاه به کمک نیتروژن مایع آسیاب شد، سپس، در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷، حاوی ۱٪ پلی‌وینیل پیرولیدون نامحلول، همگن‌سازی شد. همگن حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و محلول رویی به دست آمده به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد.

**کاتالاز:** کاتالاز با اندازه‌گیری میزان اولیه ناپدید شدن پراکسید هیدروژن به روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش ۳ میلی‌لیتری حاوی ۵/۲ میلی‌لیتر از محلول ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH ۷، ۰/۴۵ میلی‌لیتر از محلول ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن و ۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیم بود. کاهش پراکسید هیدروژن به صورت کاهش در ۲۴۰ A با استفاده از اسپکتروفوتومتر مرئی دنبال شد (Shangari and O'Brien, 2006).

**سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت SOD با اندازه‌گیری توانایی آن در مهار کاهش فتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم (NBT) با استفاده از روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش ۳ میلی‌لیتری حاوی ۵/۲ میلی‌لیتر از محلول ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH ۷/۸، ۰/۳ میلی‌لیتر یا ۳۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۰/۱ میلی‌لیتر یا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۷۵ میکرومولار NBT، و ۰/۰۵ میلی‌لیتر یا ۵۰ میکرولیتر از محلول ۲ میکرومولار ریوفلاوین، ۰/۰۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و عصاره آنزیمی ۵۰ - ۰ میکرولیتر بود. ریوفلاوین در آخر اضافه شد و لوله‌ها تکان داده شدند و با فاصله ۳۰ سانتی‌متر زیر یک بانک نور متشکل از دو لامپ فلورسنت ۱۵ وات قرار گرفتند. واکنش با روشن کردن چراغ شروع شد و به مدت ۱۰ دقیقه اجازه کار داده شد. واکنش با خاموش کردن چراغ متوقف شد و لوله‌ها با یک پارچه سیاه پوشانده شدند. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد (Dhindsa et al., 1981).

**پراکسیداز:** به ۱ میلی‌لیتر محلول آبی گایاکول ۲۰

میلی مولار، ۰/۲۲ میلی لیتر گایاکول در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و ۲ میلی لیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷، مقدار مناسبی از محلول آنزیم اضافه شد و در آخر ۲۰ میکرو لیتر از محلول ۱۰ میلی مولار  $H_2O_2$  اضافه شد. چگالی نوری این مخلوط را در ۷۰ نانومتر و هر ۳۰ ثانیه یک بار تا ۱۰۰ ثانیه خوانده شد (Maehly, 1954).

### نتایج و بحث

**اندازه‌گیری قطر نانوذرات:** نتایج اندازه‌گیری قطر نانوذرات با روش DLS نشان داد که سنتز نانوذرات با موفقیت انجام شده و اندازه آن‌ها بین ۲۰ تا ۳۰ نانومتر است (جدول ۳). عوامل مختلفی بر اندازه و شکل نانوذرات تأثیر می‌گذارند، از جمله می‌توان به دما، نور، اکسیژن، غلظت مواد اشاره کرد. در این مطالعه برخلاف مطالعات قبلی از دمای  $30 \pm 20$  درجه سانتی-گراد استفاده شد تا گرما از بهم پیوستن نانوذرات تشکیل شده جلوگیری کند و بتوان نانوذراتی با اندازه کوچک‌تر تولید کرد تا امکان ورود به درون بافت‌های گیاهی فراهم شود. جذب و ورود نانوذرات به بافت‌های گیاهی مانند ریشه به خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات بستگی دارد. که مهم‌ترین ویژگی در فرآیند جذب و ورود نانوذرات به بافت گیاهی، قطر آن‌هاست. نانوذرات با قطر کمتر از ۴۰-۵۰ نانومتر می‌توانند وارد بافت گیاه شوند (Kong et al., 2020; Perez-de-Luque, 2017).

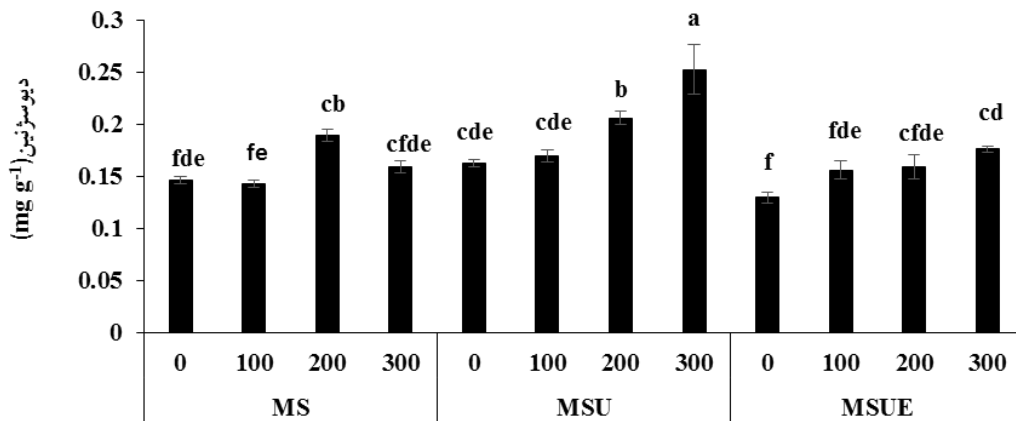
**غلظت دیوسژنین:** تحلیل واریانس نشان داد که تأثیر محیط‌کشت و غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) بر غلظت دیوسژنین به‌طور معنی‌داری اثر دارند. براساس این نتایج بیش‌ترین غلظت مربوط به محیط‌کشت فاقد میکروذرات آهن و کلات‌کننده EDTA در غلظت ۳۰۰ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن بود. در مقابل ترکیب محیط‌کشت فاقد میکروذرات آهن همراه با EDTA کمترین غلظت دیوسژنین را داشت. به‌طورکلی، ترکیب مختلف محیط‌کشت MS مایع و غلظت نانوذرات اثر متقابل قابل توجهی بر تولید دیوسژنین به عنوان یک متابولیت ثانویه مهم در گیاه سنبله را داشتند (شکل

۲). در مطالعه‌ای مشابه استفاده از نانوذرات کبات در محیط کشت درون شیشه‌ای فاقد میکروکبات در غلظت ۳۰۰ میکرومولار نانوذرات باعث افزایش میزان دیوسژنین در گیاه سنبله شد (Motevalli et al., 2021). در پژوهشی میزان دیوسژنین موجود در گیاه سنبله در طی پاسخ به نانوذرات نقره افزایش یافت (Jasim et al., 2017). در پژوهشی نشان داده شد که استفاده از نانوذرات اکسید آهن مگنتیت می‌تواند به عنوان یک الیستور قوی موجب فعالسازی مسیره‌های بیوستیزی در گیاه *Melissa officinalis* شود و همچنین بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوستز اسید روزمارینیک (RA) یعنی HPPR، TAT و RAS را افزایش دهد (Golkari et al., 2023). استفاده از تیمار پنکونازول (PEN) و کلسیم کلرید ( $CaCl_2$ ) موجب افزایش ساپونین‌های استروئیدی در کشت ریشه‌های مویی در گیاه *Trigonella graecum foenum* شد (Rezazadehfar et al., 2024). متیل جاسمونات (MeJA)، یکی از الیستورهای مهم سازوکارهای دفاعی گیاه است که استفاده از آن در گیاه سنبله موجب افزایش بیان دو ژن مهم در مسیر متابولیسم منتهی به تولید دیوسژنین که شامل ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآ ردوکتاز (HMG) و استرول-۳-β-گلیکوزیل ترانسفراز (STRL) شد (Chaudhary et al., 2015). در پژوهشی تأثیر اتیلن بر بیوستز دیوسژنین در کشت درون شیشه‌ای در گونه *D. zingiberensis* بررسی شد، نتایج نشان داد استفاده از غلظت مناسب (۱۰۴ از محلول ۴۰ درصد اتفون) موجب افزایش بیان ژن‌های سیکلوآرتنول سیتاز و ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآ ردوکتاز و در نتیجه دیوسژنین شد (Diarra et al., 2013). CYP51 (*Obtusifoliol*)  $14\alpha$ -demethylase یک آنزیم P450 وابسته به heme-Fe است، و آهن به‌عنوان کوفاکتور ضروری در مرکز فعال آن قرار دارد و فعالیت آن برای هیدروکسیلاسیون/دمتیلاسیون استرول‌ها به آهن وابسته است (Minerdi et al., 2023; Bak et al., 2011). تماس گیاه با نانوذرات سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROSها می‌شوند و این ROS همراه با سیگنال‌های ثانویه (مانند افزایش  $Ca^{2+}$ ) و فعال‌شدن آبشارهای MAPK

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر انواع محیط کشت و غلظت نانوذرات اکسید آهن (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) بر صفات مورد بررسی در گیاه شنبلیله

میانگین مربعات								درجه آزادی	منابع تغییرات
دیوسژنین	سطح برگ	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	طول اندام هوایی	طول ریشه		
۰/۰۰۶**	۰/۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۲/۲۰*	۶/۳۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۲۵۲/۰۸*	۲۰۲۷/۰۸*	۲	محیط کشت MS
۰/۰۰۵**	۰/۰۰۵**	۷/۶۹ <sup>ns</sup>	۲/۷۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۶*	۰/۰۰۰۳*	۲۳/۱۴ <sup>ns</sup>	۱۰۹/۹۵ <sup>ns</sup>	۳	غلظت نانوذرات
۰/۰۰۱**	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۳/۴۱ <sup>ns</sup>	۳/۲۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۶**	۰/۰۰۰۰۴ <sup>ns</sup>	۲۵/۲۳ <sup>ns</sup>	۲۵/۲۳ <sup>ns</sup>	۶	محیط کشت × نانوذرات
۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱	۳۸ × ۱۰ <sup>-۶</sup>	۱/۹۴	۰/۰۰۰۱ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۰۴	۲۷/۰۸	۶۳/۸۸	۲۴	خطا
۹/۲۷	۶/۳۳	۹/۶۸	۱۵/۰۲	۱۷/۴۵	۱۷/۶۸	۱۷/۸۴	۱۶/۳۹	-	ضریب تغییرات

ns, \*\* و \* به ترتیب عدم معنی داری و معنی دار در سطح احتمال یک و پنج درصد



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و محیط کشت MS در گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی داری براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ندارند.

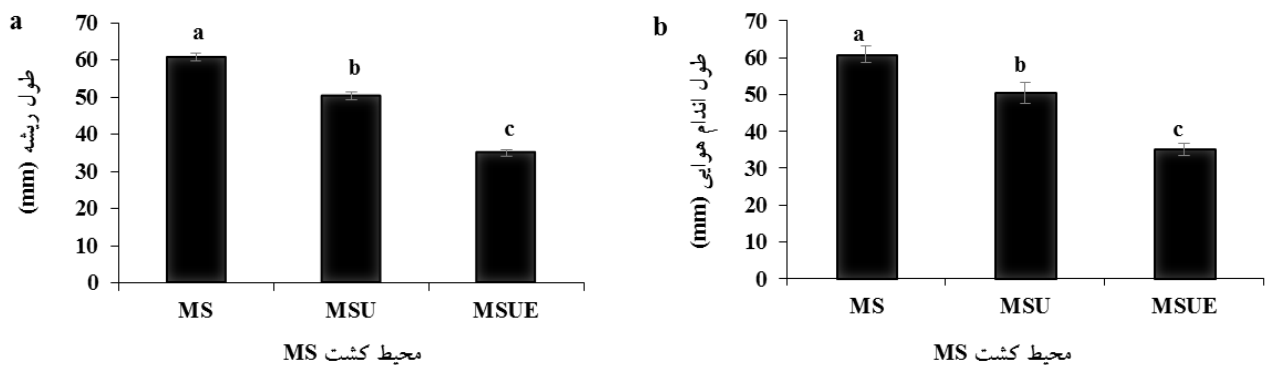
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و انواع محیط کشت MS بر مقدار دیوسژنین در گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی داری براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ندارند.

می‌تواند منجر به تغییرات در بیان ژن مسیره‌های متابولیت ثانویه شود (Marslin et al., 2017). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که در گیاه شنبلیله، فاکتور رونویسی TfWRKY40 به طور مثبت بیوسنتز دیوسژنین را تنظیم می‌کند، به طوری که دستکاری بیان آن باعث تغییر بیان چند ژن کلیدی مسیر از جمله HMGR و در نتیجه تغییر میزان دیوسژنین می‌شود (XU et al., 2025).

بر اساس این مطالعات می‌توان گفت نانوذرات به دلیل انرژی سطحی بالاتر و اندازه کوچکتر، سریع‌تر یون‌های خود را آزاد کنند و با فراهم نمودن آهن کافی به عنوان یک کوفاکتور لازم برای آنزیم‌های P450 و دیگر آنزیم‌های مسیر، تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد. از طرفی احتمال می‌رود به دلیل وجود EDTA در محیط کشت سوم دسترسی به آهن و سایر یون‌های فلزی کاهش یافته و از این طریق بر عملکرد روی آنزیم‌ها تأثیر گذاشته و موجب کاهش دیوسژنین نسبت به شاهد شده است.

طول ریشه و اندام هوایی: براساس نتایج تجزیه واریانس، نوع محیط کشت اثر معنی داری بر طول ریشه و طول اندام هوایی در گیاه شنبلیله داشت. مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن بود

بر اساس این مطالعات می‌توان گفت نانوذرات به دلیل انرژی سطحی بالاتر و اندازه کوچکتر، سریع‌تر یون‌های خود را آزاد کنند و با فراهم نمودن آهن کافی به عنوان یک کوفاکتور

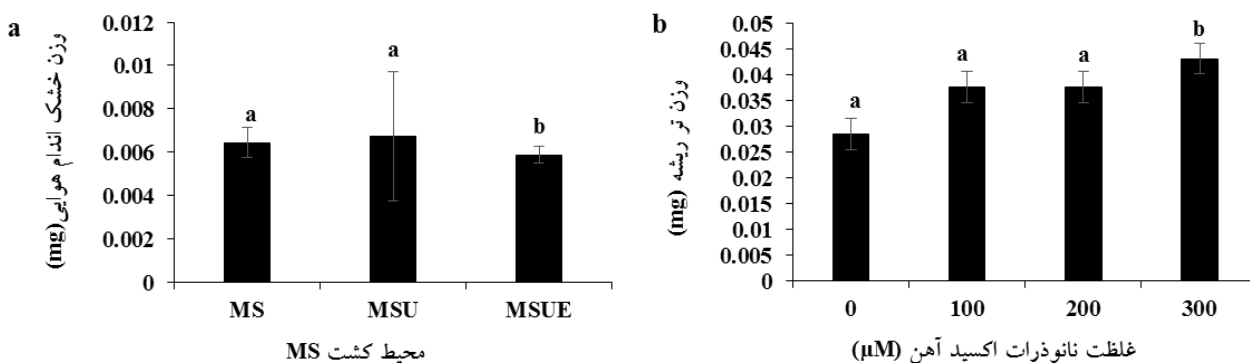


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر انواع محیط کشت MS بر تغییرات طول ریشه (a) و اندام هوایی (b) در گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد ندارند.

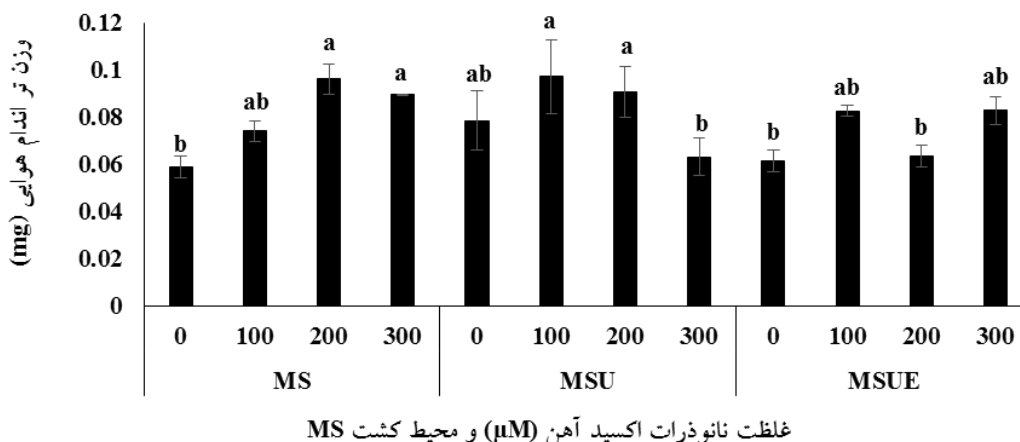
شود تا EDTA با سایر ترکیبات موجود کمپلکس ایجاد کند که سبب کاهش یا افزایش برخی عناصر معدنی شود که می‌تواند با ایجاد تنش یونی یا اختلال در تعادل غذایی، رشد رویشی را محدود سازد. تأثیر منبع آهن و pH محیط کشت بر رشد و توسعه *Sorbus commixta* در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که MS پایه توازن عناصر میکرو و ماکرو در pH مناسب و آهن کلاته شده (Fe-EDTA) فراهم می‌کند. آهن (Fe) نقش حیاتی در رشد و توسعه گیاهان، سنتز کلروفیل، زنجیره انتقال الکترون و فعالیت آنزیم‌های اکسیدوردکتاز را دارد و فرم Fe-EDTA در pH ۵/۷ بیشترین دسترس‌پذیری را دارد که در شرایط درون شیشه‌ای این شرایط رشد رویشی را بهینه می‌کند (Xiao et al., 2020). EDTA یک نمک دی‌سدیم هگزا کربوکسیلیک اسید است که به دلیل داشتن خاصیت اسیدی باعث کاهش pH می‌شود (Li et al., 2020; Abbas and Abdelhafez, 2013). در واقع کاهش رشد در شاخساره بعد از به کار بردن عوامل کلات‌کننده در نتیجه افزایش غلظت فلزات سمی است که بیشتر از ظرفیت گیاه برای فعالسازی سیستم دفاعی گیاه است. به‌طور کلی افزایش غلظت کلات‌کننده‌ها، فعالیت آنزیمی گیاه، عملکرد غشاء، سنتز پروتئین و جذب برخی مواد غذایی مهار می‌شود (Han et al., 2018; Guo et al., 2019; Maheshwari and Dubey, 2007). کلات‌کننده‌های فلزی قوی مانند EDTA تأثیر قابل‌توجهی بر گونه‌زایی شیمیایی عناصر دارند که

که در محیط کشت MS پایه، طول اندام هوایی و طول ریشه بیش‌ترین مقدار را دارا بوده و نسبت به سایر محیط‌کشت‌ها افزایش نشان دادند و در مقابل طول ریشه و اندام هوایی گیاه شنبلیله در محیط کشت حاوی EDTA (MSUE) کاهش یافت (شکل ۳).

**وزن خشک و وزن تر:** بیشترین مقداری وزن خشک اندام هوایی نیز در محیط کشت فاقد آهن و EDTA (MSU) مشاهده شد (شکل ۵). درحالی‌که در وزن خشک ریشه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده نشد. براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس، وزن تر اندام هوایی تأثیر دو فاکتور محیط کشت و غلظت نانوذرات، معنی‌دار بود و بیش‌ترین میانگین مربوط به محیط کشت فاقد آهن و EDTA در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن همچنین، محیط کشت MS پایه در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار بود. در مقابل وزن تر ریشه تحت تأثیر عامل غلظت نانوذرات معنی‌دار شد و کمترین میزان مربوط به غلظت ۳۰۰ میکرومولار نانوذرات بود (شکل ۴ و ۵). در این مطالعه، افزایش طول ریشه و اندام هوایی در محیط کشت MS پایه می‌تواند ناشی از فراهمی مناسب عناصر غذایی ضروری و تعادل یون‌ها در این محیط باشد که در این صورت شرایط مساعدی برای تقسیم سلولی فراهم می‌کند. در مقابل به دلیل وجود EDTA بدون حضور آهن در محیط کشت MS موجب



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) بر وزن خشک اندام هوایی در انواع محیط‌کشت MS (a) و وزن تر ریشه در انواع محیط‌کشت MS (b) در گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد ندارند.

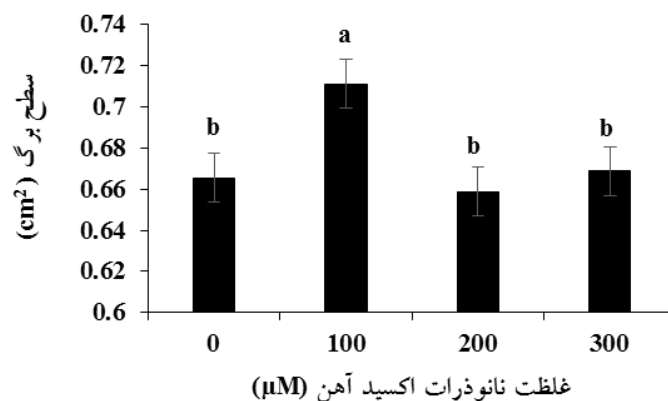


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و انواع محیط‌کشت MS بر وزن تر ساقه در گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ندارند.

( Hangarter and Stasinopoulos, 1991; Oviedo and Rodriguez, 2003).

**سطح برگ:** طبق اطلاعات حاصل از این مطالعه تفاوت معناداری در سطح احتمال ۵ درصد در سطح برگ مشاهده شد. بیش‌ترین سطح برگ مربوط به تأثیر فاکتور نانوذرات در غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود (شکل ۶). آهن با نقش در بیوستز کلروفیل، انتقال الکترون در فتوسنتز و تنفس، و تحریک مسیرهای هورمونی مانند اکسین موجب افزایش تقسیم و کشیدگی سلولی برگ شده و در نتیجه باعث افزایش سطح

می‌تواند بر حلالیت و فراهمی زیستی فلزات و همچنین بر تحرک فاز محلول خاک و جذب ریشه و تجمع فلزات تأثیر بگذارد (Kamal et al., 2023). وقتی آهن حذف می‌شود اما EDTA آزاد حضور دارد، این کلات‌کننده قوی می‌تواند سایر عناصر ضروری مانند مس، منیزیم، کلسیم، منگنز و روی را کلاته کند و کارایی آن‌ها را تغییر دهد. در عین حال EDTA در اثر نور فلورسنت دچار فوتواکسیداسیون می‌شود و باعث تولید فرمالدهید می‌شود که هر دوی این عامل‌ها باعث کاهش توانایی محیط‌کشت در حمایت از رشد گیاه می‌شود



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) بر سطح برگ در گیاه شنبليله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در درصد ندارند.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر انواع محیط‌کشت و غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه شنبليله

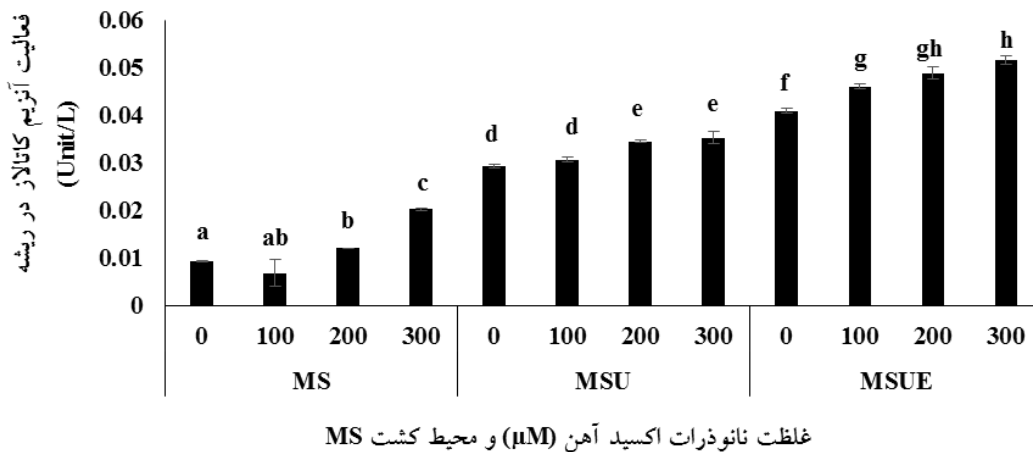
میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییرات
سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	کاتالاز		
۰/۰۳۳**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۳**	۲	محیط‌کشت MS
۰/۰۰۱**	۰/۰۰۰۲**	۰/۰۰۰۱**	۳	غلظت نانوذرات
۰/۰۰۰۰۷**	۰/۰۰۰۰۳**	۰/۰۰۰۰۱**	۶	محیط‌کشت × نانوذرات
$7/55 \times 10^{-6}$	$4/99 \times 10^{-6}$	$3/44 \times 10^{-6}$	۲۴	خطا
۴/۲۹	۱۲/۱۴	۶/۰۹	-	ضریب تغییرات

ns, \*\* و \* به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد

برگ می‌شود (Briat et al., 2015).  
 عکس‌العمل‌های آنزیمی: براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، اثر متقابل معناداری در سطح احتمال یک درصد در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز) در بافت ریشه گیاه شنبليله مشاهده شد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌ها مربوط به محیط‌کشت بدون آهن همراه با EDTA در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار نانوذرات بود (جدول ۴). EDTA که به عنوان کلاته‌کننده عمل می‌کند، با تغییر توزیع و تغییر در دسترس‌پذیری یون‌های فلزی می‌تواند استرس اکسیداتیو یا پاسخ دفاعی را تقویت کند. کاربرد EDTA در گیاهان تحت تنش فلزی، مانند

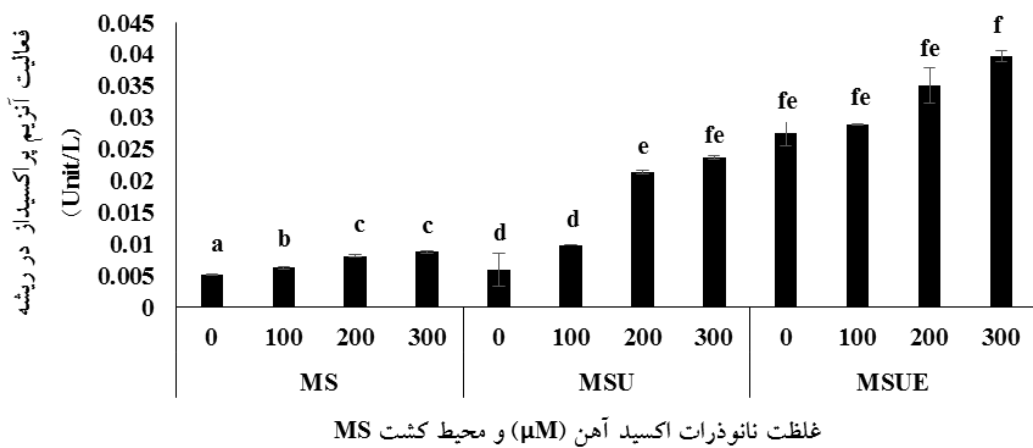
*Brassica napus* دچار سمیت مس، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدانی کلیدی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) شد (Habiba et al., 2015). آهن به عنوان یک کوفاکتور در واکنش‌های سم‌زدایی سلولی که توسط آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیدازهای وابسته به فنول، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز انجام می‌شود، مشارکت دارد. این آنزیم‌ها سوپر پراکسید و پراکسید هیدروژن را پاکسازی کرده و از سلول در برابر آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. در نتیجه کمبود آهن در گیاه آفتابگردان موجب افزایش سطح پراکسیداز شد (Ranieri et al., 2001).

برگ می‌شود (Briat et al., 2015).  
 عکس‌العمل‌های آنزیمی: براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، اثر متقابل معناداری در سطح احتمال یک درصد در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز) در بافت ریشه گیاه شنبليله مشاهده شد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم‌ها مربوط به محیط‌کشت بدون آهن همراه با EDTA در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار نانوذرات بود (جدول ۴). EDTA که به عنوان کلاته‌کننده عمل می‌کند، با تغییر توزیع و تغییر در دسترس‌پذیری یون‌های فلزی می‌تواند استرس اکسیداتیو یا پاسخ دفاعی را تقویت کند. کاربرد EDTA در گیاهان تحت تنش فلزی، مانند



غلظت نانوذرات اکسید آهن (μM) و محیط کشت MS

شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و انواع محیط کشت MS بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در ریشه گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ندارند.

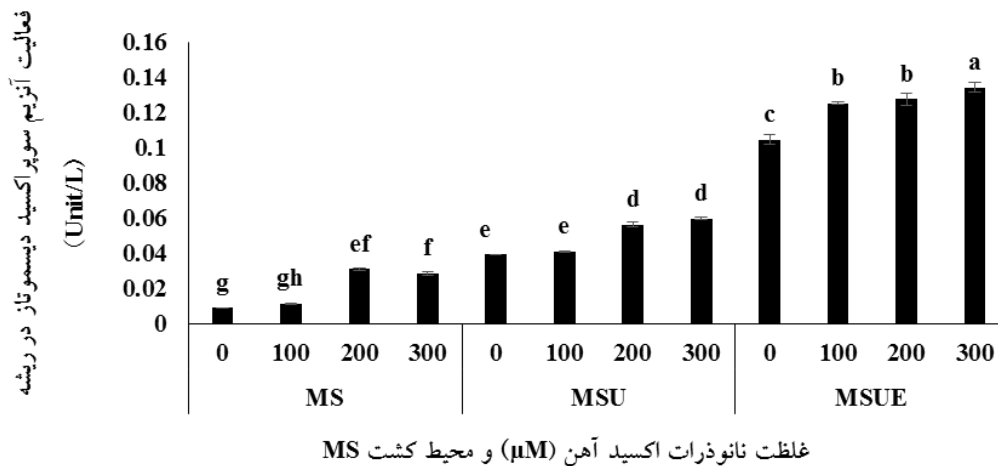


غلظت نانوذرات اکسید آهن (μM) و محیط کشت MS

شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) و انواع محیط کشت MS بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در ریشه گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ندارند.

شیشه‌ای یا گلخانه‌ای در گیاه *Chrysanthemum* عمل کند به شرطی که دز و مدت مواجهه کنترل شود (Kulus et al., 2025). بنابراین می‌توان گفت اثر متقابل این دو عامل منجر به بیشینه‌شدن سیگنال‌های القایی و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌ها بوده است (شکل ۷، ۸ و ۹).

در کشت کالوس *Artemisia annua* L. استفاده از نانوذرات کبالت در غلظت مناسب باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه افزایش سطح فنل‌ها و فلاونوئیدها شد (Fatima et al., 2021). در گزارشی مشاهده شد که نانوذرات آهن، به ویژه فرم پایدارشده با سیترات می‌توانند به عنوان القاکننده مؤثر متابولیت‌های ثانویه در سیستم‌های درون



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت نانوذرات اکسید آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) و انواع محیط کشت MS بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در ریشه گیاه شنبلیله. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار است. میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون دانکن در سطح یک درصد ندارند.

#### نتیجه‌گیری

محیط کشت و غلظت نانوذرات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز) در بافت ریشه تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد داشت، نتایج نشان داد که در غیاب آهن، استفاده از EDTA فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر محیط‌کشت‌ها به حداکثر می‌رساند اما سنتر دیوسژنین کاهش می‌یابد. مکانیسم تأثیر آهن به‌طور مستقیم بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز دیوسژنین هنوز ناشناخته است و برای روشن شدن نقش آهن در بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز تری‌ترپن‌ها، تحقیقات بیش‌تری مورد نیاز است. این یافته‌ها بیانگر آن است که دسترسی به آهن و استرس اکسیداتیو نقش متمایزی در تنظیم متابولیت‌های ثانویه و پاسخ آنتی‌اکسیدانی دارد. در نتیجه می‌توان از تیمار نانوذرات اکسید آهن و محیط کشت MS بدون حضور EDTA در غلظت‌های مناسب جهت افزایش دیوسژنین به عنوان یک متابولیت ثانویه در شنبلیله استفاده کرد. می‌توان تأثیرات نانوذرات دیگر و همچنین گونه‌های مختلف این گیاه را از نظر میزان دیوسژنین نیز مورد بررسی قرار داد.

امروزه با توجه به کاربرد گیاهان برای تهیه داروهای حیاتی به دلیل عوارض کمتر نسبت به داروهای شیمیایی حائز اهمیت است. لذا در این مسیر انتخاب درست محرک‌ها و شرایط مطلوب کشت گیاهان بسیار مهم است. با توجه به پژوهش انجام‌شده وزن تر اندام هوایی و میزان دیوسژنین تحت تأثیر اثر متقابل تیمارهای محیط کشت و غلظت نانوذرات معنی‌دار بود. استفاده از غلظت ۳۰۰ میکرومولار نانوذرات اکسید آهن، در محیط کشت MS مایع که فاقد میکروذرات آهن مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) و EDTA بود سبب افزایش دو برابری دیوسژنین نسبت به حالت شاهد شد. همچنین غلظت‌های متفاوت از نانوذرات توانستند تأثیر معناداری بر مقدار وزن تر ریشه و سطح برگ داشته باشند. مطالعه انجام‌شده نشان داد که اثر متقابل انواع محیط کشت از نظر حضور و عدم حضور میکروذرات آهن و EDTA و همچنین نانوذرات اکسید آهن تفاوت معنی‌داری در وزن خشک ریشه ایجاد نکرد. ولی در مقابل تیمار محیط کشت توانست تأثیر معنی‌داری در طول ریشه و اندام هوایی داشته باشد. همچنین اثر متقابل تیمارهای

- Abbas, M. H., & Abdelhafez, A. A. (2013). Role of EDTA in arsenic mobilization and its uptake by maize grown on an As-polluted soil. *Chemosphere*, 90(2), 588-594. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.042>
- Ac, M. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal*, 1, 357-408. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Balk, J., & Schaedler, T. A. (2014). Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 125-153. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035759>
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Hofer, R., Paquette, S., & Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9, e0144. <https://doi.org/10.1199/tab.0144>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Briat, J. F., Dubos, C., & Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science*, 20(1), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.005>
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Chaudhary, S., Chikara, S. K., Sharma, M. C., Chaudhary, A., Alam Syed, B., Chaudhary, P. S., ... & Iriti, M. (2015). Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seedlings by methyl jasmonate. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29889-29899. <https://doi.org/10.3390/ijms161226208>
- Diarra, Sabake T., Ji, H., Jianbo, W., & Jiaru, L. (2013). "Ethylene treatment improves diosgenin accumulation in in vitro cultures of *Dioscorea zingiberensis* via up-regulation of CAS and HMGR gene expression." *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5), 6. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue5-fulltext-9>
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. A. M. E. L. A., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93-101. <https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93>
- Fatima, K., Abbas, S. R., Zia, M., Sabir, S. M., Khan, R. T., Khan, A. A., ... & Zaman, R. (2021). Induction of secondary metabolites on nanoparticles stress in callus culture of *Artemisia annua* L. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 474-483. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.232937>
- Golkari, S., Pourseyedi, S., Kazempour, A., & Mansouri, M. (2023). The effect of magnetic iron oxide nanoparticles and ferric chloride on the expression of some rosmarinic acid biosynthetic genes in *Melissa officinalis* L. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(1), 235-254. <https://doi.org/10.22103/jab.2023.20035.1420>
- Guo, D., Ali, A., Ren, C., Du, J., Li, R., Lahori, A. H., ... & Zhang, Z. (2019). EDTA and organic acids assisted phytoextraction of Cd and Zn from a smelter contaminated soil by potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss) and evaluation of its bioindicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 396-403. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.038>
- Habiba, U., Ali, S., Farid, M., Shakoor, M. B., Rizwan, M., Ibrahim, M., ... & Ali, B. (2015). EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1534-1544. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3431-5>
- Han, Y., Zhang, L., Gu, J., Zhao, J., & Fu, J. (2018). Citric acid and EDTA on the growth, photosynthetic properties and heavy metal accumulation of *Iris halophila* Pall. cultivated in Pb mine tailings. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 128, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.011>
- Hangarter, R. P., & Stasinopoulos, T. C. (1991). Effect of Fe-catalyzed photooxidation of EDTA on root growth in plant culture media. *Plant Physiology*, 96(3), 843-847. <https://doi.org/10.1104/pp.96.3.843>
- Heydari, H. R., Chamani, E., & Esmailpour, B. (2020). Cell line selection through gamma irradiation combined with multi-walled carbon nanotubes elicitation enhanced phenolic compounds accumulation in *Salvia nemorosa* cell culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(2), 353-367. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01867-6>
- Ioannou, A., Gohari, G., Papaphilippou, P., Panahirad, S., Akbari, A., Dadpour, M. R., ... & Fotopoulos, V. (2020). Advanced nanomaterials in agriculture under a changing climate: the way to the future?. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104048. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104048>
- Jasim, B., Thomas, R., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2017). Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 443-447. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.09.012>
- Kamal, M. A., Perveen, K., Khan, F., Sayyed, R. Z., Hock, O. G., Bhatt, S. C., ... & Qamar, M. O. (2023). Effect of different levels of EDTA on phytoextraction of heavy metal and growth of *Brassica juncea* L. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1228117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1228117>
- Kashanian, F., Habibi-Rezaei, M., Bagherpour, A. R., Seyedarabi, A., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Magnetic nanoparticles as double-edged swords: Concentration-dependent ordering or disordering effects on lysozyme. *RSC Advances*, 7(86), 54813-54822. <https://doi.org/10.1039/C7RA08903A>
- Kobayashi, T., & Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of*

- Plant Biology*, 63(1), 131-152. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>
- Kong, I. C., Ko, K. S., Koh, D. C., & Chon, C. M. (2020). Comparative effects of particle sizes of cobalt nanoparticles to nine biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6767. <https://doi.org/10.3390/ijms21186767>
- Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M., & Ashtary-Larky, D. (2016). Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), 732-745. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)30088-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)30088-7)
- Kulus, D., Tymoszuk, A., Cichorek, M., Gościnną, K., & Osial, M. (2025). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and IAA auxin affect secondary metabolism over time without altering genetic stability in chrysanthemum. *Scientific Reports*, 15(1), 27934. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-13279-7>
- Li, F. L., Qiu, Y., Xu, X., Yang, F., Wang, Z., Feng, J., & Wang, J. (2020). EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metals from sludge soil by Italian ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110185>
- Li, J., Chang, P. R., Huang, J., Wang, Y., Yuan, H., & Ren, H. (2013). Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(8), 5561-5567. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7533>
- Liu, H., Hou, P., Zhang, W., & Wu, J. (2010). Synthesis of monosized core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au multifunctional nanoparticles by PVP-assisted nanoemulsion process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 356(1-3), 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.12.023>
- Maheshwari, R., & Dubey, R. S. (2007). Nickel toxicity inhibits ribonuclease and protease activities in rice seedlings: protective effects of proline. *Plant Growth Regulation*, 51(3), 231-243. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9163-x>
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in Plant Science*, 8, 832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832>
- Mehrafarin, A., Rezazadeh, S. H., Naghdi Badi, H., Noormohammadi, G. H., Zand, E., & Qaderi, A. (2011). A review on biology, cultivation and biotechnology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a valuable medicinal plant and multipurpose. *10(37)*, 6-24. <http://jmp.ir/article-1-228-en.html>
- Minerdi, D., Savoi, S., & Sabbatini, P. (2023). Role of cytochrome P450 enzyme in plant microorganisms' communication: A focus on grapevine. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4695. <https://doi.org/10.3390/ijms24054695>
- Motevalli, S., Hassani, S. B., Ghalamboran, M. R., & Chahardeh, H. R. (2021). Increase of diosgenin in fenugreek seedlings by cobalt nanoparticles. *Rhizosphere*, 18, 100335. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100335>
- Nguyen, T. D., & Dang, T. T. T. (2021). Cytochrome P450 enzymes as key drivers of alkaloid chemical diversification in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 682181. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.682181>
- Oviedo, C., & Rodriguez, J. (2003). EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny. *Quimica Nova*, 26, 901-905. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600020>
- Perez-de-Luque, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture?. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 12. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00012>
- Ranieri, A., Castagna, A., Baldan, B., & Soldatini, G. F. (2001). Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 25-35. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.354.25>
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00154-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00154-9)
- Rezazadehfar, P., Rezayian, M., Niknam, V., & Mirmasoumi, M. (2024). Elicitor-enhanced steroidal sapogenin accumulation in hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum*. *Scientific Reports*, 14(1), 19106. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69625-8>
- Sarwar, S., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Boakye, Y. D., & Agyare, C. (2020). Fenugreek. Medicinal Plants of South Asia Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00020-3>
- Sawai, S., & Saito, K. (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2, 25. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00025>
- Shangari, N., & O'Brien, P. J. (2006). Catalase activity assays. *Current Protocols in Toxicology*, 27(1). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0707s27>
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., & Osbourn, A. (2014). Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 225-257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>
- Thomine, S., & Vert, G. (2013). Iron transport in plants: Better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.01.003>
- Xiao, J., Park, Y. G., Guo, G., & Jeong, B. R. (2020). Effect of iron source and medium pH on growth and development of *Sorbus commixta* in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 133. <https://doi.org/10.3390/ijms22010133>

- Xu, C., Tang, N., Xu, Y., Li, C., & Zhang, Y. (2025). TfWRKY40 positively regulates diosgenin biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1666107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1666107>
- Zaman, W., Ayaz, A., & Park, S. (2025). Nanomaterials in agriculture: A pathway to enhanced plant growth and abiotic stress resistance. *Plants*, *14*(5), 716. <https://doi.org/10.3390/plants14050716>
- Zhang, R., Li, P., Xu, L., Chen, Y., Sui, P., Zhou, L., & Li, J. (2009). Enhancement of diosgenin production in *Dioscorea zingiberensis* cell culture by oligosaccharide elicitor from its endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Dzf17. *Natural Product Communications*, *4*(11), 1934578X0900401103. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401103>

## Changes in diosgenin production in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under the influence of different magnetite iron oxide nanoparticle ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) concentrations in in vitro culture

Sana Haghi Gharabaghlou<sup>1</sup>, Babak Abdollahi Mandoulakani<sup>2</sup>, and  
Mohammadreza Ghalamboran<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Physiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

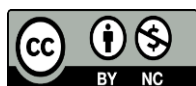
### Abstract

Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) is an annual dicotyledonous plant widely used in pharmaceutical and traditional medicinal applications. Diosgenin, a steroidal saponin with diverse biological activities, occurs naturally in several plant species, including fenugreek, and is present in the aerial parts, roots, and seeds. It serves as a key precursor for progesterone and estrogen hormones. Enhancing diosgenin production in fenugreek requires the stimulation of saponin biosynthesis, which can be influenced by both biotic and abiotic factors. In the present study, the effect of magnetite iron oxide nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) on diosgenin accumulation in fenugreek roots was evaluated using a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications under in vitro Murashige and Skoog (MS) culture conditions. Experimental treatments consisted of different concentrations of magnetite iron oxide nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (0, 100, 200, and 300  $\mu\text{M}$ ) applied across three liquid MS media under controlled laboratory conditions. The results showed that the type of culture medium significantly affected root length, shoot length, and stem dry weight, with the greatest growth observed in the basal MS medium. Nanoparticle treatments significantly influenced root fresh weight and leaf area, whereas root dry weight remained unchanged. The interaction between culture medium and nanoparticle concentration was significant for stem fresh weight and diosgenin content; notably, the highest diosgenin level occurred in liquid MS medium without Fe-EDTA at 300  $\mu\text{M}$  Magnetite Iron Oxide Nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), reaching twice that of the control. Moreover, the interaction of the two factors significantly affected antioxidant enzyme activities at the 1% probability level, with the highest activity observed in iron-free medium supplemented with EDTA.

**Keywords:** Fenugreek, Diosgenin, In vitro culture, Iron nanoparticles, Secondary metabolite

Received: Sep. 10, 2025; Revised: Dec. 14, 2025; Accepted: Jan. 27, 2026; Published Online: June. 02, 2026

\*Corresponding Author: m\_ghalamboran@sbu.ac.ir



Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.