

The Effect of Nano-Titanium Oxide and Methyl Jasmonate on the Total Phenolic and Flavonoid Contents in Cell Suspension Culture of Caper (*Capparis spinosa*)

Somayeh Taheri¹, Nasim Zarinpanjeh^{2*} , Hamideh Khalaj³, Ghorban Shahriari³, Hadi Kalantari Khalilabad⁴

1. M.Sc., Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

4. Ph.D., Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

Correspondence:

Nasim Zarinpanjeh

Email: zarinpanjeh@imp.ac.ir

Received: 25, May 2025

Accepted: 18, Jan. 2025

How to cite:

Taheri, S., Zarinpanjeh, N., Khalaj, H., Shahriari, Gh., & Kalantari Khalilabad, H. (2025). The Effect of Nano-Titanium Oxide and Methyl Jasmonate on the Total Phenolic and Flavonoid Contents in Cell Suspension Culture of Caper (*Capparis spinosa*). *Crop Biotechnology*, 15 (2), 13-25.

(DOI: [10.30473/cb.2026.74696.2009](https://doi.org/10.30473/cb.2026.74696.2009))

ABSTRACT

This study was conducted to investigate callus production, cell suspension culture and the effect of induction on total phenolic content in *Capparis spinosa*. For this purpose, different explants (leaves and stems) were collected from adult plants and after disinfection, they were cultured under sterile conditions. The effect of different hormonal treatments including NAA and BAP compounds on callus induction was evaluated. The explants were cultured in MS medium containing different concentrations of these growth regulators. The results showed that the highest callus induction percentage (100%) was obtained in medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP. The results of the variance analysis of data related to the amount of total phenol and flavonoids obtained from the cell suspension culture of the caper plant showed that the interaction effect of titanium dioxide nanoparticles and methyl jasmonate was significant at the 99% probability level. The highest level of total phenols (60.80 mg/g DW) and total flavonoids (49.36 mg/g DW) were related to the use of nano-titanium oxide 25 µg/L and methyl jasmonate 100 µmol as elicitor in the suspension culture medium. These findings can be used to optimize the production of bioactive compounds from *C. spinosa* under controlled *in vitro* conditions.

KEYWORDS

Cell suspension, phenol and flavonoid, Caper plant, methyl jasmonate, nano-titanium oxide.



«مقاله پژوهشی»

تأثیر نانواکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان محتویات فنلی و فلاونوئیدی کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر (*Capparis spinosa*)

سمیه طاهری^۱، نسیم زرین پنجه^{۲*} , حمیده خلیج^۳، قربان شهریار^۴، هادی کلانتری خلیل آباد^۴

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تولید کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی و تأثیر القا کننده بر میزان محتویات فنل و فلاونوئیدی کل در گیاه کبر (*Capparis spinosa*) انجام شد. بدین منظور، ریزنمونه‌های مختلف (برگ و ساقه) از گیاهان بالغ جمع‌آوری و پس از ضدعفونی، در شرایط استریل کشت داده شدند. اثر تیمارهای مختلف هورمونی شامل ترکیبات NAA و BAP بر القای کالوس مورد ارزیابی قرار گرفت. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف این تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شدند. بر اساس نتایج بیشترین درصد کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP حاصل شد. در مرحله بعدی اترنانو ذرات دی اکسید تیتانیوم /و متیل جاسمونات به عنوان الیستور بر محتویات فنلی و فلاونوئیدی کل در کشت سوسپانسیون سلولی این گیاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فنل و فلاونوئید کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر نشان داد اثر متقابل نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است. بیشترین میزان فنل کل (۶۰/۸۰ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) و فلاونوئید کل (۴۹/۳۶ میلی‌گرم در گرم ماده خشک) از کاربرد نانو اکسید تیتانیوم به میزان ۲۵ میکروگرم در لیتر و متیل جاسمونات به میزان ۱۰۰ میکرومول در محیط کشت سوسپانسیون حاصل شد. این یافته‌ها می‌توانند در جهت بهینه‌سازی تولید ترکیبات زیست‌فعال گیاه کبر در شرایط درون شیشه و تحت کنترل مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

سوسپانسیون سلولی، فنل و فلاونوئید، گیاه کبر، متیل جاسمونات، نانواکسیدتیتانیوم.

۱. کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۲. استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، کرج، ایران.
۳. استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۴. دکتر، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

نسیم زرین پنجه

رایانامه: zarinpanjeh@imp.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۸

استناد به این مقاله:

طاهری، سیمیه؛ زرین پنجه، نسیم؛ خلیج، حمیده؛ شهریار، قربان و کلانتری خلیل آباد، هادی (۱۴۰۴). فلاونوئیدی کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر (*Capparis spinosa*)، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۲)، ۱۳-۲۵.

(DOI: [10.30473/cb.2026.74696.2009](https://doi.org/10.30473/cb.2026.74696.2009))

مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی، نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند (Riz et al., 2023). در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش جمعیت و گرایش به مصرف داروهای طبیعی و سازگار با بدن، توجه به استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی در میان محققان و صنایع دارویی افزایش یافته است (Aware et al., 2022). با این حال برداشت بی‌رویه از منابع طبیعی و محدودیت‌های زیستی، بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی را در معرض خطر انقراض قرار داده و تأمین پایدار مواد اولیه دارویی را با چالش مواجه کرده است (Chen et al., 2016). گیاه کبر (Capparis spinosa) از خانواده Capparidaceae، یکی از گونه‌های دارویی بومی مناطق گرم و خشک ایران به شمار می‌رود. این گیاه به دلیل دارا بودن ترکیباتی چون فنل‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و گلیکوزیدها، در درمان بیماری‌هایی نظیر دیابت، اختلالات گوارشی، التهابات و بیماری‌های قلبی عروقی مؤثر گزارش شده است (Moufid et al., 2011; Esmseilzadeh et al., 2015). اما میزان این ترکیبات در شرایط طبیعی، تحت تأثیر عوامل محیطی قرار دارد و اغلب در سطوح پایین مشاهده می‌شود که این مسئله بهره‌برداری صنعتی از گیاه را با محدودیت روبرو می‌سازد (Pant et al., 2021). یکی از راهکارهای نوین برای غلبه بر این محدودیت‌ها، بهره‌گیری از روش‌های زیست‌فناوری مانند کشت سوسپانسیون سلولی است. این روش، علاوه بر فراهم کردن امکان تولید انبوه و کنترل شده متابولیت‌های ثانویه، به حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان دارویی نیز کمک می‌کند (Wu et al., 2021). در این روش، سلول‌های گیاهی به صورت توده کالوس یا سلول‌های منفرد در محیط مایع رشد می‌کنند و با اعمال تیمارهای خاص، می‌توان تولید ترکیبات هدف را افزایش داد (Fazili et al., 2022). در سال‌های اخیر، استفاده از الیستورها، به ویژه نانوذرات فلزی مانند نانو اکسید تیتانیوم (TiO_2)، برای تحریک مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مورد توجه قرار گرفته است (Zare et al., 2022). این نانوذرات به دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم بالا،

و زیست‌سازگاری، قادرند به راحتی وارد سلول شده، مسیرهای متابولیکی را تحت تأثیر قرار دهند و باعث افزایش ترکیباتی مانند فنل‌ها شوند (Arya et al., 2021). Lala et al., 2021). به علاوه، نانو TiO_2 می‌تواند با القای تنش اکسیداتیو، تقسیم سلولی، و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تولید ترکیبات دارویی را در گیاهان افزایش دهد (Schrot et al., 2015; Ghorbanpour et al., 2015). مطالعات انجام شده نیز اثر نانو TiO_2 بر افزایش متابولیت‌های ثانویه را تأیید کرده‌اند. به عنوان مثال گزارش شده است که تیمار گیاهان دارویی با نانوذرات TiO_2 منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیک و افزایش معنی‌دار ترکیبات مؤثر در زمان کوتاه پس از تیمار می‌شود (Raei & Ghanati, 2016). همچنین افزایش تولید اسید والرینیک را در کشت سوسپانسیون سلولی سنبل الطیب پس از تیمار با نانو TiO_2 گزارش کرده است (Sharifi et al., 2015). افزودن متیل جاسمونات (MeJA) به کشت سوسپانسیون سلولی *Hypericum perforatum* باعث افزایش ۲٫۷ برابری در تولید فلاونوئیدها نسبت به کنترل شد. این افزایش با فعالیت بالاتر آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) مرتبط بود (Wang et al., 2015). مطالعات دیگر نشان داد که ترکیب نانوذرات کیتوزان با متیل جاسمونات به طور قابل توجهی تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در کشت‌های سوسپانسیون سلولی افزایش می‌دهد، که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی این دو محرک است (Arya et al., 2022). با این حال، بهینه‌سازی شرایط کاربرد این نانوذرات، از جمله غلظت، زمان تیمار، و سازگاری با گونه‌های مختلف، همچنان نیازمند بررسی‌های دقیق‌تر است (Gao et al., 2023). در زمینه گیاه کبر، تاکنون پژوهش‌های محدودی به تأثیر نانو TiO_2 و همچنین ترکیب آن با الیستورهای رایجی چون متیل جاسمونات (MeJA) پرداخته‌اند. گزارش شده است که MeJA می‌تواند بیان ژن‌های PAL و CHS را در گیاه کبر افزایش دهد. همچنین اثر مثبت نانو TiO_2 بر افزایش آنتراکینون‌ها در آلوئه‌ورا گزارش کرده‌اند (Kianersi et al., 2020).

بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر نانوذرات TiO_2 و متیل جاسمونات بر تولید ترکیبات فنلی کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر طراحی شده است. این مطالعه می‌تواند ضمن ارائه راهکاری نوین برای تولید پایدار متابولیت‌های دارویی، گامی مؤثر در توسعه فناوری‌های زیستی مرتبط با گیاهان دارویی بردارد.

روش‌شناسی پژوهش

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه

در این مطالعه، سرشاخه‌های جوان گیاه کبر از منطقه اسلام‌شهر تهران با مشخصات جغرافیایی $E: 51,227187$ و $N: 35,516017$ جمع‌آوری (شکل ۱) و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده گیاهان دارویی منتقل شدند. برگ‌ها و ساقه‌های جوان (ریزنمونه‌ها) به طول تقریبی یک سانتی‌متر از گیاه مادری جدا شده و مراحل گندزدایی سطحی را طی کردند: ابتدا با آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه، سپس با محلول توئین ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و بعد از آن با محلول قارچ‌کش بنومیل (به نسبت ۲ در هزار) به مدت ۱۵ دقیقه شست‌وشو شدند. در ادامه، در شرایط استریل (هود لامینار)، ریزنمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۰٫۵ درصد و اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند.



شکل ۱. گیاه کبر در منطقه اسلام شهر استان تهران

Figure 1. Capparis in the Islam Shahr region of Tehran province

القای کالوس

پس از انجام مراحل گند زدایی، به وسیله اسکالپر استریل زخم‌هایی بر روی ریزنمونه‌ها ایجاد گردید و سپس ریزنمونه‌ها به صورت افقی در محیط کشت پایه

موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی هورمون‌های 2,4-D (در غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (در غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند. ظروف کشت در اتاق رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دمای 25 ± 2 و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۸ هفته قرار داده شدند. تیمارهای مختلف کالزایی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. تیمارهای مختلف کالزایی گیاه کبر

Table 1. Different treatments of callus induction of Capparis

تیمار	ریزنمونه	2,4-D (mgL^{-1})	BAP (mgL^{-1})
۱	ساقه	۰	۰
۲	ساقه	۰	۱
۳	ساقه	۰	۲
۴	ساقه	۰/۵	۰
۵	ساقه	۰/۵	۱
۶	ساقه	۰/۵	۲
۷	ساقه	۱	۰
۸	ساقه	۱	۱
۹	ساقه	۱	۲
۱۰	برگ	۰	۰
۱۱	برگ	۰	۱
۱۲	برگ	۰	۲
۱۳	برگ	۰/۵	۰
۱۴	برگ	۰/۵	۱
۱۵	برگ	۰/۵	۲
۱۶	برگ	۱	۰
۱۷	برگ	۱	۱
۱۸	برگ	۱	۲

صفات اندازه‌گیری شده در مرحله کالزایی

پس از ۸ هفته، کالوس‌ها به اندازه کافی رشد کردند و صفات کمی مانند درصد کالوس‌زایی، وزن‌تر و وزن خشک آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. درصد کالوس‌زایی از نسبت ریزنمونه‌هایی که در آن‌ها کالوس تشکیل شده به کل ریزنمونه‌ها، ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. میانگین وزن‌تر کالوس‌ها نیز از تقسیم مجموع وزن‌تر آن‌ها بر تعداد کالوس‌ها به‌دست آمد. از آنجا که کالوس‌ها به سرعت آب خود را از دست می‌دهند، وزن‌گیری بلافاصله پس از برداشت انجام شد؛ برای این کار،

القای الیستورها در کشت سوسپانسیون سلولی
پس از تکثیر سلول‌ها و رسیدن به فاز رشد مطلوب، تمام سوسپانسیون‌ها با متیل جاسمونات در غلظت‌های صفر و ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و نانو اکسید تیتانیوم در غلظت‌های صفر، ۲۵، و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی یک هفته به میزان ۲۵ میلی‌لیتر محیط سوسپانسیون تیمار شدند (جدول ۲).

جدول ۲. تیمارهای مختلف القا الیستور در کشت سوسپانسیون

سلولی		
Table 2. Different elicitation treatments in cell suspension culture		
تیمار	نانواکسید تیتانیوم (میلی‌گرم در لیتر)	متیل جاسمونات (میکرومولار)
۱	۰	۰
۲	۰	۵۰
۳	۰	۱۰۰
۴	۲۵	۰
۵	۲۵	۵۰
۶	۲۵	۱۰۰
۷	۵۰	۰
۸	۵۰	۵۰
۹	۵۰	۱۰۰

روش عصاره‌گیری از پودر بافت گیاه برای استخراج کامل ترکیبات فنلی
۵۰ میلی‌گرم از کالوس با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد (پیش سرد در ۲۰- درجه سانتی‌گراد) مخلوط گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس از طریق کاغذ واتمن ۴۲ فیلتر شد. حجم نهایی به وسیله اتانول خالص در ۵ میلی‌لیتر تنظیم شد و نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منجمد شدند (Santos-Zea et al. 2011).

اندازه‌گیری میزان فنل کل

در یک لوله آزمایش، ۲۰ میکرولیتر از عصاره به ۱/۵۸ میلی لیتر آب تزریق اضافه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Folin-Ciocalteu اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۸/۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس ۳۰۰ میکرولیتر

کالوس‌ها روی پتری‌دیش با وزن کسر شده قرار گرفته و با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شدند.

کشت سوسپانسیون سلولی

در این مرحله، محیط کشت سوسپانسیون با محیط پایه MS، حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳۰ گرم ساکارز تهیه شد و آگار از ترکیب حذف گردید. کالوس‌های حاصل از فاز اول در شرایط استریل با اسکالپر به قطعات کوچک تقسیم و به ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع منتقل شدند. محیط‌های سوسپانسیونی به شیکر انکوباتور با شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. همچنین نمونه‌ها هر هفته واکنش شدند، این عمل تا تولید حجم مناسب از توده سلولی تکرار گردید. در هر واکنش مقدار مشخصی محیط کشت تازه به سوسپانسیون افزوده شد.

اندازه‌گیری وزن خشک سوسپانسیون سلولی

جهت اندازه‌گیری وزن خشک کالوس‌ها از فیلترهای فلزی ۶۰ (۲۵۰ میکرون) استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط کشت‌ها به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه و استریل گردید. سپس در زیر لامینار ایرفلو مقدار ۱۵ میلی‌لیتر محیط حاوی سلول‌های از فیلتر استریل عبور داده و به محیط تازه اضافه و ارلن‌ها به شیکر انکوباتور انتقال داده شدند. به فاصله هفت روز یک‌بار و به مدت ۴ هفته وزن خشک هر یک از نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی محاسبه شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس وزن خشک سلول‌ها بررسی شد. به فاصله یک روز در میان شاخص رشد با استفاده از رابطه (۱) بررسی گردید:

$$\text{Growth index (GI)} = \frac{fw-dw}{dw} \quad \text{رابطه ۱}$$

که در آن، W_0 بیوماس اولیه و W_F بیوماس نهایی می‌باشد.

یافته‌های پژوهش

نتایج مربوط به درصد کالزایی

اولین توده‌های کالوس یک هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط کالزایی ایجاد و پس از گذشت ۳۰ روز، کالوس‌های بزرگ تشکیل شد. کالوس‌ها به صورت ترد، شکننده و آبی و با دامنه رنگی از کرم و قهوه‌ای روشن مشاهده شدند (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۲. نمونه‌ی بافت کالوس تشکیل شده بر روی ساقه کبر
Figure 2. Sample of callus induction on Capparis stem



شکل ۳. نمونه‌ی بافت کالوس تشکیل شده بر روی برگ کبر
Figure 3. Sample of callus induction on Capparis leaf

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد کالزایی گیاه کبر نشان داد اثر ریزنمونه معنی دار نشده است و اثر هورمون‌های BAP و 2,4-D به تنهایی و توأم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی دار شده است (جدول ۳). این بدان معنی است که نوع ریزنمونه ساقه و برگ در درصد القای کالوس نقش معنی‌داری ندارد. اگرچه در تمام تیمارها بافت کالوس تشکیل شده است. نتایج حاصل از مقایسات میانگین نشان داد بیشترین میانگین درصد القای کالوس (۱۰۰٪) در تیمار استفاده توأم هورمون‌های 2,4-D به میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر و BAP به میزان ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر و همینطور

کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد (Robles-Martínez et al., 2015). جذب در ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه نانو دراپ اسپکتروفتومتر مدل Epok قرائت شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسید گالیک (Merck-Germany) در غلظت‌های ۲۰-۱۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر به عنوان استاندارد تهیه و برای محاسبه محتوای فنلی کل استفاده شد. محتویات کل فنل به صورت معادل‌های اسید گالیک ($\mu\text{g}/\text{mg}$) با استفاده از معادله زیر بر اساس منحنی کالیبراسیون بیان گردید:

$$y = 0.0108x + 0.0062$$

که در آن، y جذب بود.

اندازه گیری میزان فلاونوئید کل

در یک لوله آزمایش، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره به ۶۰۰ میکرولیتر اتانول و ۷۵۰ میکرولیتر کلرید آلومنیوم ۲ درصد اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و جذب در ۳۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه نانو دراپ اسپکتروفتومتر مدل Epok قرائت شد (Santos-Zea et al., 2011). منحنی کالیبراسیون با استفاده از کورستین (۲۰-۱۲۰ میکروگرم میکرولیتر) به عنوان استاندارد ساخته شد. محتویات فلاونوئید کل به صورت کوئرستین ($\mu\text{g}/\text{mg}$) با استفاده از معادله زیر بر اساس منحنی کالیبراسیون بیان شد:

$$y = 0.0024x - 0.0091$$

که در آن، y جذب بود.

آنالیز داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار طراحی و انجام و برای آزمایشات محیط‌های کشت جامد برای هر تکرار، چهار ریزنمونه در نظر گرفته شد. به منظور آنالیز داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS استفاده گردید و تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد گروه بندی و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2010 رسم شدند.

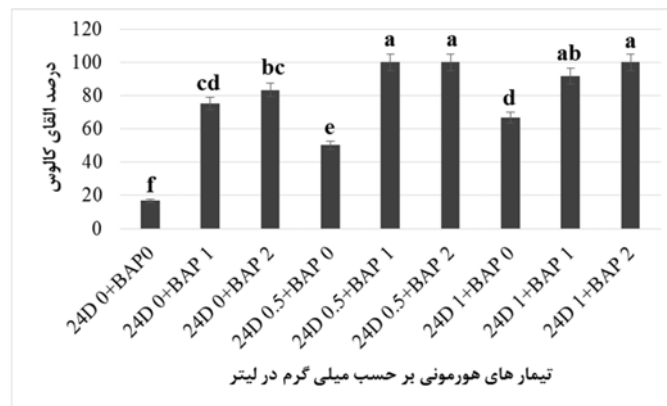
کاربرد توام 2,4-D به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده می‌شود. کمترین کشت MS بدون هورمون تعلق دارد (شکل ۴).

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر ریزنمونه، BAP، 2,4-D بر روی درصد القای کالوس کبر

Table 3. Analysis of variance of the effect of explant, BAP, 2,4-D on callus induction percentage of Capparis

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثر ریزنمونه	۱	۱۰۴/۱۶۷	۱/۲۸۶ ^{ns}
اثر BAP	۲	۱۳۲۰۶/۰۱۹	۴۹/۰۰۰**
اثر 2,4-D	۲	۳۹۶۹/۹۰۷	۵۵/۰۰۰**
اثر متقابل ریزنمونه×BAP	۲	۳۴/۷۲۲	۰/۴۲۹ ^{ns}
اثر متقابل ریزنمونه×2,4-D	۴	۱۰۴/۱۶۷	۱/۲۸۶ ^{ns}
اثر متقابل BAP×2,4-D	۳۶	۷۰۶/۰۱۹	۸/۷۱۴**
اثر متقابل ریزنمونه×BAP×2,4-D	۳۶	۳۴/۷۲۲	۰/۴۲۹**
خطای آزمایشی	۵۴	۸۱/۰۱۹	

ns: نبود اختلاف معنی‌دار، ** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۴. مقایسات میانگین درصد کالزایی گیاه کبر در تیمارهای مختلف

Figure 4. Mean comparisons of callus induction percentage of Capparis in different treatments

بیشترین شاخص رشد در روز چهاردهم (۲۳/۷) میلی‌گرم وزن خشک) مشاهده شد. منحنی رشد از روز شروع اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها تا روز هفتم مرحله خفتگی، روز هفتم تا چهاردهم مرحله تصاعدی، و از روز چهاردهم تا روز ۲۱ ام خطی و از روز ۲۱ به بعد مرحله سکون را نشان داد (شکل ۶).

نتایج مربوط تاثیر الیستور بر میزان فنل کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فنل کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر نشان داد که اثر متقابل نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و

نتایج مربوط به وزن تر کالوس‌ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به وزن تر کالوس‌ها نشان داد اثر ریزنمونه و هورمون‌های BAP و 2,4-D در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار است (جدول ۴).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین، بیشترین میانگین وزن تر کالوس (۴۷۰/۶۶ میلی‌گرم) به تیمار کشت ریزنمونه برگ در محیط کشت MS همراه با هورمون 2,4-D (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) مربوط می‌شود. کمترین میانگین وزن تر کالوس (۲۲ میلی‌گرم) نیز به تیمار کشت ریزنمونه ساقه در محیط کشت MS بدون هورمون تعلق دارد (شکل ۵).

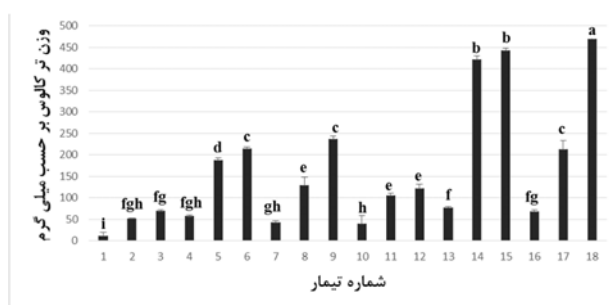
متیل جاسمونات در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی دار شده است (جدول ۵).
بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان فنل کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر نشان داد بیشترین میانگین فنل کل (۶۰/۸۰ میلی گرم در گرم ماده خشک) به تیمار شماره ۸ یعنی کاربرد نانو اکسید تیتانیوم ۲۵ میکرو گرم در لیتر و متیل جاسمونات به میزان ۱۰۰ میکرومول به عنوان الیستور مربوط بوده است. کمترین میانگین فنل کل (۴۸/۱ میلی گرم در گرم ماده خشک) نیز در تیمار شماره ۱ یعنی محیط کشت سوسپانسیون سلولی بدون کاربرد الیستور مشاهده شد (شکل ۷).

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر ریزنمونه، BAP، 2,4-D بر وزن تر کالوس کبر

Table 4. Analysis of variance of the effect of explant, BAP, 2,4-D on the fresh weight of *Capparis callus*

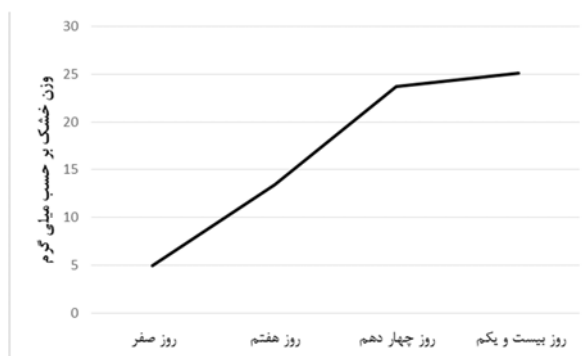
F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۷۵۴/۵۲۳۳ **	۱۵۴۲۴۰/۶۶۷	۱	اثر ریزنمونه
۹۹۱/۷۲۲ **	۲۰۲۸۰۷/۲۴۱	۲	اثر BAP
۶۶۶/۶۷۸ **	۱۳۶۳۳۵/۵۷۴	۴	اثر 2,4-D
۱۲۳/۵۳۹ **	۲۵۲۶۳/۷۲۲	۲	اثر متقابل ریزنمونه×BAP
۷۵/۳۶۵ **	۱۵۴۱۲/۱۶۷	۴	اثر متقابل ریزنمونه×2,4-D
۱۵۹/۹۲۳ **	۳۲۷۰۴/۲۹۶	۸	اثر متقابل BAP×2,4-D
۳۶/۰۱۴ **	۷۳۶۴/۸۸۹	۸	اثر متقابل ریزنمونه×BAP×2,4-D
	۲۰۴/۵۰۰	۶۰	خطای آزمایشی

***: اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۵. مقایسات میانگین وزن تر کالوس کبر در تیمارهای مختلف

Figure 6. Mean comparisons of the fresh weight of *Capparis callus* in different treatments



شکل ۶. منحنی شاخص رشد در محیط سوسپانسیون

Figure 6. Growth index curve in suspension culture

جدول ۵. تجزیه واریانس اثر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان محتویات فنل کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر
Table 5. Analysis of variance of the effect of titanium dioxide nanoparticles and methyl jasmonate on the total phenolic content of Capparis cell suspension culture

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۲۶۰۳۷/۷۲۱**	۱۷۲/۶۲۰	۲	اثر متیل جاسمونات
۳۳۴۶/۶۴۶**	۲۲/۱۷۸	۲	اثر $\text{TiO}_2\text{-NP}$
۱۶۸۵/۵۷۲**	۱۱/۱۷۵	۴	اثر متقابل $\text{TiO}_2\text{-NP}$ × متیل جاسمونات
	۰/۰۰۷	۱۸	خطای آزمایشی

** اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**Significant difference at the 1% probability level



شکل ۷. مقایسات میانگین فنل کل در تیمارهای مختلف

Figure 7. Mean comparisons of total phenol in different treatments

سوسپانسیون سلولی بدون کاربرد الیستور به دست آمده است (شکل ۸).

ترکیبات فنلی از جمله متابولیت‌های ثانویه کلیدی در گیاهان به‌شمار می‌روند که نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کنند (Buchanan *et al.*, 2015). سنتز و تجمع این ترکیبات تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی قرار دارد و در شرایط طبیعی، تولید آن‌ها ممکن است به‌واسطه محدودیت‌های زیستی یا غیرزیستی کاهش یابد (Ncube *et al.*, 2012). یکی از راهکارهای مؤثر برای افزایش تولید این متابولیت‌ها، بهره‌گیری از سیستم‌های کشت سلولی در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی است که امکان مدیریت دقیق عوامل مؤثر و استفاده از ترکیبات محرک (الیستورها) را فراهم می‌سازد (Patil *et al.*, 2021). الیستورها که به دو دسته زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند، با فعال‌سازی مسیرهای بیوسنتزی، موجب افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه می‌گردند. در سال‌های اخیر، نانوذرات

نتایج مربوط تأثیر الیستور بر میزان فلاونوئید کل

در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فلاونوئید کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر نشان داد اثر متقابل نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی دار شده است (جدول ۶).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان فلاونوئید کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر مشاهده شد بیشترین میانگین فلاونوئید کل (۴۹/۳۶ میلی گرم در گرم ماده خشک) به تیمار شماره ۸ یعنی کاربرد نانو اکسید تیتانیوم ۲۵ میکرو گرم در لیتر و متیل جاسمونات به میزان ۱۰۰ میکرومول به عنوان الیستور مربوط بوده است. کمترین میانگین فلاونوئید کل (۴۰/۲ میلی گرم در گرم ماده خشک) هم در محیط کشت

الیستورهای زیستی، می‌تواند به شکل چشمگیری سطح فلاونوئیدها را در سیستم‌های کشت سلولی افزایش دهد (Ghasemi et al., 2015; Mahajan et al., 2022). نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد فیزیکوشیمیایی و اندازه نانومتری خود، می‌توانند مسیرهای بیوسنتزی متعددی را از طریق افزایش بیان ژن‌هایی مانند PAL و CHS و همچنین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فعال کنند (Pandurangan, 2013; Javed et al., 2027; Rivero et al., 2017).

به‌عنوان نوعی الیستور غیرزیستی نوظهور توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. این ذرات، با القای تنش‌های کنترل‌شده، به‌صورت سیگنال‌های شبه‌تنشی عمل کرده و موجب تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه، از جمله تولید ترکیبات فنلی، می‌شوند (Singh et al., 2021; Thiruvengadam et al., 2021). فلاونوئیدها نیز که زیرمجموعه‌ای از ترکیبات فنلی‌اند، به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، در حفاظت سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو نقش مؤثری دارند. تحقیقات متعددی نشان داده‌اند کاربرد نانوذرات به‌تنهایی یا در ترکیب با

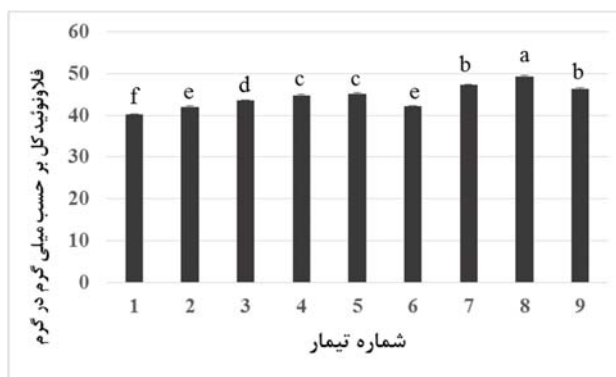
جدول ۶. تجزیه واریانس اثر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان محتویات فلاونوئید کل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر

Table 6. Analysis of variance of the effect of titanium dioxide nanoparticles and methyl jasmonate on the total flavenoid content of *Capparis* cell suspension culture

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۱۹۲/۹۰۱**	۷۶/۸۷۴	۲	اثر متیل جاسمونات
۱۶/۵۷۰**	۶/۶۰۳	۲	اثر $\text{TiO}_2\text{-NP}$
۲۰/۲۱۱**	۸/۰۵۴	۴	اثر متقابل $\text{TiO}_2\text{-NP}$ × متیل جاسمونات
	۰/۳۹۹	۱۸	خطای آزمایشی

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**Significant difference at the 1% probability level



شکل ۸. مقایسات میانگین فلاونوئید کل در تیمارهای مختلف

Figure 8. Mean comparisons of total flavenoid in different treatments

فنلی و CuO در کشت *Rubia cordifolia* باعث ارتقاء سطح آلیزارین و پورپورین شده است (Prasad et al., 2025; Coskun et al., 2025). همچنین استفاده از ZnO NPs در *Fagonia indica* و AgNPs در *Crocus sativus* افزایش قابل توجهی در ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها به همراه داشته است (Palka et al., 2025).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که نانوذراتی نظیر نقره (AgNPs)، دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2)، دی‌اکسید سیلیکون (SiO_2) و اکسید مس (CuO) می‌توانند به طور قابل توجهی تولید متابولیت‌های ثانویه را در کشت‌های سلولی افزایش دهند. برای نمونه، AgNPs در کالوس گیاه *Melissa officinalis* منجر به افزایش ترکیبات

تحریک‌کننده MeJA در افزایش بیان ژن‌هایی نظیر PAL و CHS تأکید دارند (Jeyasri et al., 2023; Gulei et al., 2018). ترکیب MeJA با نانوذرات می‌تواند اثرات هم‌افزایی قابل توجهی در افزایش سطح متابولیت‌های هدف ایجاد کند.

در مجموع، استفاده از متیل جاسمونات و نانوذرات به‌عنوان الیستورهای مکمل در کشت‌های سلولی گیاهی، روشی نوین، مؤثر و قابل اتکا برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، محسوب می‌شود. این رویکرد می‌تواند در توسعه صنعتی ترکیبات دارویی و آنتی‌اکسیدانی کاربرد گسترده‌ای پیدا کند.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از متیل جاسمونات و نانوذرات به‌عنوان الیستورهای غیرزیستی در کشت‌های سلولی و بافتی گیاهان، روشی نوین و مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، محسوب می‌شود. این رویکرد با القای پاسخ‌های دفاعی و فعال‌سازی مسیرهای بیوسنتزی، می‌تواند تولید ترکیبات با ارزش دارویی و آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد. در تحقیق حاضر نیز نقش نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به همراه متیل جاسمونات در افزایش تولید فنل کل در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه کبر بار دیگر نقش نانو ذرات را به‌عنوان الیستور در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سامانه‌های تحت کنترل چون کشت سوسپانسیون سلولی کبر پر رنگ می‌کند. شایان ذکر است که این افزایش، در خصوص رشد کالوس‌ها به صورت افزایش وزن تر نیز نمایان شده است. با این حال، برای بهره‌برداری بهینه از این فناوری، نیاز به مطالعات بیشتر برای تعیین شرایط بهینه و بررسی اثرات بلندمدت نانوذرات بر سلول‌های گیاهی وجود دارد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

نانوذرات نه تنها در تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثرند، بلکه در استخراج و افزایش تولید ترکیبات خاصی نیز نقش دارند. به‌عنوان مثال، AgNPs باعث افزایش تولید آرتیمیزینین در *Artemisia annua* و اس‌تویوزید در *Stevia rebaudiana* شده‌اند (Zhang et al., 2018; Golkar et al., 2019). همچنین ترکیباتی چون $PbNO_3$ ، $CdCl_2$ و $CuSO_4$ ، As_2O_3 در افزایش کوئسین در *Holarrhena antidysenterica* و CuO NPs در تولید *Gymnemic acid II* در *Gymnema sylvestre* مؤثر بوده‌اند (Kumar et al., 2018; Chung et al., 2019). کاربرد SiO_2 و TiO_2 نیز در افزایش آلونین در *Aloe vera* و متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون *Linum usitatissimum* موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Raei et al., 2016; Karimzadeh et al., 2019). همچنین مطالعه‌ای بر روی *Nigella arvensis* نشان داد نانوذرات NiO و Al_2O_3 ، TiO_2 می‌توانند سطوح گلوکسین، کورستین و کامپفرول را در ریشه و اندام هوایی گیاه افزایش دهند (Raei & Ghanati, 2016).

هم‌افزایی نانوذرات با الیستورهای زیستی می‌تواند منجر به افزایش چشمگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه شود. برای نمونه، در کشت‌های سلولی *Salvia tebesana* استفاده همزمان از نانوذرات TiO_2 و متیل جاسمونات، موجب افزایش معنادار ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید (Shoja et al., 2022). با این حال، استفاده از نانوذرات باید با دقت و در غلظت‌های بهینه انجام شود، زیرا مصرف بیش از حد آن‌ها می‌تواند موجب سمیت سلولی گردد. یافته‌ها حاکی از آن است که استفاده کنترل‌شده از این ذرات می‌تواند به‌عنوان روشی نوین و مؤثر در بهبود بیوسنتز ترکیبات دارویی به‌کار گرفته شود (Lala, 2021). متیل جاسمونات (MeJA) نیز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین الیستورهای زیستی، شناخته شده است که می‌تواند مسیرهای بیوسنتزی ترکیباتی مانند فلاونوئیدها و فنل‌ها را فعال کرده و تولید آن‌ها را افزایش دهد. مطالعات متعددی بر اثر

منابع

- Arya, S. S., Lenka, S. K., Cahill, D. M., & Rookes, J. E. (2021). Designer nanoparticles for plant cell culture systems: Mechanisms of elicitation and harnessing of specialized metabolites. *BioEssays*, 43(11), 2100081.
- Arya, S. S., Rookes, J. E., Cahill, D. M., & Lenka, S. K. (2022). Chitosan nanoparticles and their combination with methyl jasmonate for the elicitation of phenolics and flavonoids in plant cell suspension cultures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 214, 632-641.
- Aware, C. B., Patil, D. N., Suryawanshi, S. S., Mali, P. R., Rane, M. R., Gurav, R. G., & Jadhav, J. P. (2022). Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. *South African Journal of Botany*, 151, 512-528.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & sons.
- Chen, S. L., Yu, H., Luo, H. M., Wu, Q., Li, C. F., & Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11, 1-10.
- Chung, I.M., Rajakumar, G., Subramanian, U., Venkidasamy, B. & Thiruvengadam, M. (2019). Impact of copper oxide nanoparticles on enhancement of bioactive compounds using cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. *Applied Sci.*, 9(10), 2165.
- Coskun, Y., & Kapdan, G. (2025). Silver Nanoparticles (AgNPs) Act as Nanoelicitors in *Melissa officinalis* to Enhance the Production of Some Important Phenolic Compounds and Essential Oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 40(2), 278-288.
- Esmailzadeh Bahabadi, S. (2011). Effect of elicitors on secondary metabolites in cell suspension cultures: A review. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(1), 18-29. (in Persian)
- Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. N. (2022). In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1), 35.
- Gao, M., Chang, J., Wang, Z., Zhang, H., & Wang, T. (2023). Advances in transport and toxicity of nanoparticles in plants. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 75.
- Ghasemi, S., Kumleh, H. H., & Kordrostami, M. (2019). Changes in the expression of some genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. under UV stress. *Protoplasma*, 256, 279-290.
- Ghorbanpour, M., Hatami, M., & Hatami, M. (2015). Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. *Acta Agriculturae Slovenica*, 105(1), 23-32.
- Gulei, D., Mehterov, N., Nabavi, S. M., Atanasov, A.G., & Berindan-Neagoe, I. (2018). Targeting ncRNAs by plant secondary metabolites: The ncRNAs game in the balance towards malignancy.
- Hatami, M., Kariman, K. & Ghorbanpour, M. (2016). Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Sci. Total Environ.*, 571, 275-291.
- Javed, R., Usman, M., Yucesan, B., Zia, M. & Gurel, E. (2017). Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiol. Bioch.*, 110, 94-99.
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. (2023). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 153(3), 447-458.
- Karimi, M., & Mirjalili, M. H. (2009). The effects of nano-TiO₂ on medicinal plant cell cultures. *Journal of Nanoscience*, 7(2), 110-115. (in Persian).
- Kianersi, F., Shokrpour, M., & Sharafi, A. (2020). Effects of SA and MeJA on rutin production and gene expression in *Capparis spinosa*. *Plant Cell Reports*, 39(12), 1713-1725.
- Kumar, D.; Kumar, G.; Das, R.; Kumar, R. & Agrawal, V. (2018). In vitro elicitation, isolation, and characterization of conessine biomolecule from *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. callus and its larvicidal activity against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25(7), 6783-6796.
- Lala, S. (2021). Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review. *IET nanobiotechnology*, 15(1), 28-57.
- Mahajan, R., Sagar, T., Billowria, P., & Kapoor, N. (2022). Elicitation: A Biotechnological Approach for Enhancement of Secondary Metabolites in *In Vitro* Cultures. In *Biotechnology and Crop Improvement* (pp. 25-47). CRC Press.
- Moufid, A., Eddouks, M., & Lemhadri, A. (2015). Phytochemical composition and antioxidant

- activity of *Capparis spinosa* extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(1), 1-7.
- Ncube, B., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2012). Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* 82, 11-20.
- Pałka, P., Muszyńska, B., Szewczyk, A., & Pawłowska, B. (2023). Elicitation and Enhancement of Phenolics Synthesis with Zinc Oxide Nanoparticles and LED Light in *Lilium candidum* L. cultures in vitro. *Agronomy*, 13(6), 1437.
- Pandurangan, M. and Kim, D.H. (2013). ZnO nanoparticles augment ALT, AST, ALP and LDH expressions in C2C12 cells. *Saudi J. Biol. Sci.*, 22(6), 679-684
- Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
- Patil, M. V., & Purohit, R. (2021). Plant cell culture technology: A promising tool for production of secondary metabolites. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 147, 1-20.
- Prasad, A., Sidhic, J., Mohan, C. K., Sarbadhikary, P., George, S., Narayanankutty, A., & Abrahamse, H. (2025). Biogenic synthesis of metal oxide nanoparticles for the elicitation of secondary metabolites in the in vitro propagated plantlets of *Rubia cordifolia* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 160(3), 1-17.
- Raei, M., & Ghanati, F. (2016). Nanoelicitor-mediated improvement of secondary metabolite production in *Aloe vera*. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 6(4), 1809-1816. (in Persian)
- Riaz, M., Khalid, R., Afzal, M., Anjum, F., Fatima, H., Zia, S., & Aslam, M. A. (2023). Phytobioactive compounds as therapeutic agents for human diseases: A review. *Food science & nutrition*, 11(6), 2500-2529.
- Rivero-Montejo, S. D. J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021). Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture*, 11(2), 134.
- Robles-Martínez, M., Barba-de La Rosa, A. P., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., & Santos-Díaz, M. D. S. (2016). Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124, 181-189.
- Sabertanha, B., Fakheri, B., Mahdinezhad, N., & Alizade, Z. (2017). Effects of silver nanoparticles elicitor and drought stress on the expression of beta-carotene hydroxylase (bch) gene on the yield of saffron carotenoid (*Crocus sativus* L.). *Crop Biotechnology*, 6(3), 1-13.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2011). Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7054-7061.
- Schrot, J., Weng, A., & Melzig, M. F. (2015). Ribosome-inactivating and related proteins. *Toxins*, 7(5), 1556-1615.
- Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, S. M., Sharifi-Rad, M., & Teixeira da Silva, J. A. (2015). Antibacterial, antioxidant, antifungal and anti-inflammatory activities of crude extract from *Nitraria schoberi* fruits. *3 Biotech*, 5, 677-684.
- Shoja, A. A., Çirak, C., Ganjeali, A., & Cheniany, M. (2022). Stimulation of phenolic compounds accumulation and antioxidant activity in in vitro culture of *Salvia tebesana* Bunge in response to nano-TiO₂ and methyl jasmonate elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1), 423-440.
- Singh, A., Gautam, R. K., & Mishra, A. (2021). Recent advances in elicitor-induced production of secondary metabolites in plant cell cultures: A review. *Biotechnology Reports*, 30, e00632.
- Thiruvengadam, M., & Rajakumar, G. (2021). Nanomaterials as elicitors in plant tissue culture and secondary metabolite production: A review. *Biotechnology Letters*, 43, 1301-1310.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L., & Lu, Y. (2015). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2, 1-9.
- Wu, T., Kerbler, S. M., Fernie, A. R., & Zhang, Y. (2021). Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. *Plant Communications*, 2(5).
- Zare, M., Nazari, N., & Shekari, F. (2022). Enhancement of phenolic compounds in *Mentha piperita* by methyl jasmonate and titanium dioxide nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 177, 114464.
- Zhang, H., & Ma, Z. F. (2018). Phytochemical and pharmacological properties of *Capparis spinosa* as a medicinal plant. *Nutrients*, 10(2), 116.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.

