Environmental Education and Sustainable Development
Second national conference on:
Environmental Science & Engineering and Sustainable Development
2020 , Tehran, Iran
هفدهم بهمن ماه ۱۳۹۸
انجمن علمی آموزش محیط زیست و توسعه پایدار ایران
دومین کنفرانس ملی علوم و مهندسی محیط زیست و توسعه پایدار
دانشگاه تربیت دبیر شهید رجائی

افزایش رشد سلول و تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی چریش با کاربرد نانوذره دی-اکسید تیتانیوم

قاسمعلی گروسی[1]، رضا فرجامینژاد[2]
[1] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
agaroosi90@yahoo.com

چکیده

چریش به تیره ملیاسه تعلق داشته و به دلیل داشتن متابولیتهای ثانویه به عنوان گیاه تجاری و دارویی مهم محسوب میشود. آزادیراختین متابولیت ثانویه مهم آن محسوب شده که یک آفتکش مهم زیستی طبیعی با خاصیت ضد مالاریا، ضد قارچ و ضد باکتری و دوستدار محیط زیست میباشد. کشت سلول گیاهی بطور گسترده برای تولید متابولیتهای ثانویه استفاده میشود. در این مطالعه، تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم (صفر، 20، 40، 60 و 80 میلیگرم در لیتر) و زمانهای مختلف نمونه-برداری (2، 4 و 6 روز) روی رشد کشت سوسپانسیون سلولی و تولید آزادیرختین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار وزن تر سلولها با میانگین 95/526 گرم در لیتر با کاربرد 20 میلیگرم در لیتر دیاکسید تیتانیوم بدست آمد. بیشترین مقدار وزن خشک سلولها نیز با میانگین 05/17 گرم در لیتر دو روز پس از اعمال 40 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم حاصل شد. بالاترین مقدار تجمع آزادیراختین با میانگین 93/5 میلیگرم بر گرم وزن خشک پس از اعمال 60 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم تولید شد. بالاترین مقدار تولید آزادیراختین با مقدار 21/82 میلیگرم در لیتر نیز در تیمار 20 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم در روز چهارم حاصل شد.

کلمات کلیدي

آزادیراختین، کشت سوسپانسیون سلولی، وزن تر سلول، وزن خشک سلول، نانوذره دی-اکسید تیتانیوم

1- مقدمه

اکثر ترکیبات فعال زیستی در گیاهان دارویی به متابولیتهای ثانویه تعلق دارند و نسبت به متابولیتهای اولیه گیاهان بسیار کمتر هستند (Smetanska, 2008). کشت سوسپانسیون سلولی به دلیل میزان رشد بیشتر بهترین سیستم برای تولید متابولیتهای ثانویه است. در کشت بافت پیشرفتهای بیوتکنولوژیکی نظیر بهینهسازی شرایط کشت، گزینش لاینهای با عملکرد بالا، استفاده از پیشماده، مهندسی متابولیک، کشت ریشههای تراریخت و تحریک صورت گرفته که باعث بهبود تولید متابولیتهای ثانویه شده است (Sarin, 2005). مواد محرک مواد شیمیایی یا فاکتورهای زیستی از منابع مختلف هستند که میتوانند تغییرات فیزیولوژیکی را در موجودات زنده القاء کنند. مواد محرک میتوانند پاسخهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی را مورد هدف قرار داده و منجر به تجمع فیتوآلکسینها شوند (Raei et al., 2014). محرکهای زیستی و غیر زیستی برای تحریک تولید متابولیتهای ثانویه و افزایش رشد استفاده میشوند (Rao and Ravishankar, 2002).
حوزه نانوتکنولوژی یکی از فعالترین زمینههای تحقیق در علم مواد مدرن است (Jain et al., 2009). نانوذرات موادی هستند که به اندازه کافی کوچک بوده و اندازه آنها کمتر از چند صد نانومتر است. این کاهش اندازه باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در فیزیکیهای فیزیکی آنها میشود. نانوذره دیاکسید تیتانیوم بیشترین کاربرد را در محصولات آرایشی و مراقبتهای پوست، مواد ضد باکتری، رنگ و مواد تجزیه کننده فاضلاب دارد (Clément et al., 2013). مطالعات اندکی روی نفوذ نانوذره دیاکسید تیتانیوم به گیاهان و تاثیر مثبت و منفی آنها صورت گرفته است. با توجه به خواص فتوکاتالیتیک نانوذرات تیتانویم، بیشتر مطالعات در سطح برگ انجام شده و تاثیر مثبت روی گیاه نشان داده شده است (Raliya et al., 2015). مشاهده شده که کاربرد نانوذره دیاکسید تیتانیوم در اسفناج باعث افزایش 60 درصدی وزن تر و خشک میشود (Gao et al., 2008). مطالعات نشان داده که کاربرد نانوذره دیاکسید تیتانیوم باعث افزایش فعالیت روبیسکو در فتوسنتز میشود. همچنین، تیمار گوجه فرنگی با نانوذره دیاکسید تیتانیوم باعث رشد بهتر گیاه، افزایش عملکرد و مقدار کلروفیل میشود (Raliya et al., 2015).

درخت چریش یکی از گیاهان تیره ملیاسه میباشد که در طب سنتی کشورهای مختلف جهان استفاده میشود. اسانس این گیاه دارای فعالیتهای بیولوژیکی و دارویی مختلف، نظیر فعالیت ضد سرطانی، ضد پلاسمودیا، ضد باکتریایی، لارو کش، قارچ کش، اسپرم کش، ضد درد، ضد انعقاد، ضد آفت و غیره است (Deng et al., 2013). آزادیراختین مهمترین متابولیت ثانویه این گیاه بوده و معمولا از هسته استخراج میشود (Srivastava and Srivastava, 2012). در این مطالعه برای اولین بار تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم و زمانهای مختلف نمونهبرداری بر رشد سلولها، تولید بیوماس سلولی و تجمع و تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش مورد بررسی قرار گرفته است.

2- مواد و روشها

2-1- مواد گیاهی

برگهای درخت چریش از بندرعباس جمعآوری شده و به عنوان ریزنمونه برای تولید کالوس استفاده گردید. برگها به مدت 3 ساعت در آب جاری شسته شده و سپس توسط اتانول 70 درصد به مدت 45 ثانیه و هیپوکلریت سدیم 5/2 درصد به مدت 13 دقیقه ضد عفونی شده و 3 بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند.

2-2. القاء کالوس

برگهای استریل شده به اندازه 1 سانتیمتر مربع برش داده شده و در محیط کشت MS حاوی 1 میلیگرم در لیتر پیکلرام و 2 میلیگرم در لیتر کینتین قرار داده شدند. برای القاء کالوس کشتها در اتاقک رشد با دمای 2 ± 25 در تاریکی به مدت 3 هفته نگهداری شدند.

2-3. استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

کالوسهای نرم و شکننده با وزن 180-175 میلیگرم به ارلن مایر 250 میلیلیتری دارای محیط کشت MS مایع حاوی 1 میلیگرم در لیتر پیکلرام و 2 میلیگرم در لیتر کینتین منتقل شدند. کشتهای مایع روی شیکر دوار با دور 110 rpm و دمای 2 ± 26 در تاریکی نگهداری شدند. پس از استقرار کشت سوسپانسیون سلولی، کشتها هر 12 روز یکبار زیرکشت شدند.

2-4. اعمال غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم در کشت سوسپانسیون سلولی

کشت سوسپانسیون سلولی با تراکم اولیه 105 × 6/2 سلول در میلیلیتر به ارلن مایرهای 100 میلیلیتری دارای 25 میلیلیتر محیط کشت MS مایع حاوی 1 میلیگرم در لیتر پیکلرام و 2 میلیگرم در لیتر کینتین منتقل شده و منحنی رشد بر اساس حجم سلولهای ساکن جهت اعمال تیمار تهیه گردید (Farjaminezhad and Garoosi, 2019). بر اساس منحنی رشد، 15 روز پس از کشت غلظتهای صفر، 20، 40، 60 و 80 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم به محیط اضافه شده و 2، 4 و 6 روز پس از اعمال تیمار نمونهبرداری صورت گرفت. پس از نمونهبرداری وزن تر و خشک سلولها، مقدار تجمع آزادیراختین و مقدار تولید آزادیراختین اندازهگیری شد.

2-5. استخراج آزادیراختین و آنالیز توسط HPLC

برای استخراج آزادیراختین یک میلیلیتر دیکلرومتان به 100 میلیگرم سلول خشک و پودر شده اضافه و به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق در معرض امواج فراصوت قرار گرفتند. سپس، عصاره حاصل با دور 7000 rpm سانتریفوژ شده و محلول رویی جمعآوری گردید. در دمای 50 درجه سانتیگراد بنماری دیکلرومتان حذف شده و نمونه خشک شد. نمونههای خشک شده مجددا در 5/1 میلیلیتر آب مقطر حل شده و در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. مقدار آزادیراختین هر نمونه با استفاده از سیستم HPLC Knauer برآورد گردید. ستون C-18 (TSKgel-ODS C-18, 5µm, 4.6 × 250 mm, Japan) به عنوان فاز ثابت استفاده شد. فاز متحرک نیز 10 درصد استونیتریل و 90 درصد آب با سرعت جریان 9/0 میلیلیتر در دقیقه بود. جذب آزادیراختین در طول موج 214 نانومتر اندازهگیری شده و مقدار تجمع آزادیراختین توسط منحنی استاندارد بدست آمد. با توجه به اینکه میزان تولید آزادیراختین به مقدار بیوماس و تجمع آزادیراختین بستگی دارد، از فرمول زیر برای محاسبه آن استفاده شد (Farjaminezhad and Garoosi, 2019):

تولید آزادیراختین (میلیگرم در لیتر) = بیوماس (گرم در لیتر) × تجمع آزادیراختین (میلیگرم در گرم وزن خشک)

3- نتایج و بحث

3-1- وزن تر سلول

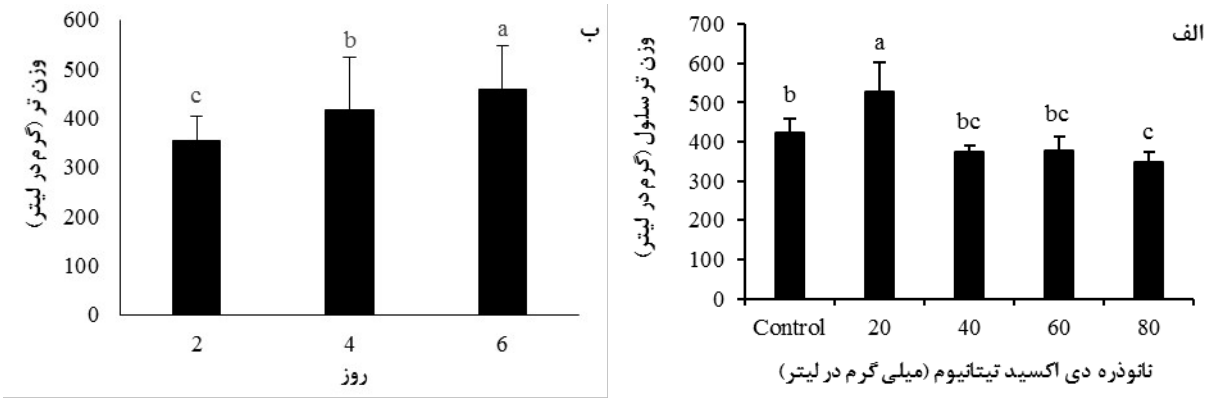
نتایج آنالیز واریانس نشان داد که وزن تر سلولها بطور معنیداری تحت تاثیر غلظتهای مختلف نانو ذره دیاکسید تیتانیوم و زمانهای مختلف نمونه برداری قرار میگیرد؛ در حالی که، اثر متقابل آنها تاثیری نداشت (جدول 1). با افزودن 20 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم مقدار وزن تر سلولها نسبت به شاهد 25/1 برابر یافت، اما با کاربرد غلظتهای 40، 60 و 80 میلیگرم در لیتر وزن تر سلول به ترتیب 13/1، 11/1 و 22/1 برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانو ذره دیاکسید تیتانیوم مقدار وزن تر سلولها کاهش یافته و بیشترین مقدار با میانگین 95/526 گرم در لیتر با کاربرد 20 میلیگرم در لیتر نانودیاکسید تیتانیوم حاصل میشود (شکل 1-الف). با بررسی زمانهای مختلف نمونهبرداری مشاهده شد که بالاترین مقدار وزن تر سلول با میانگین 46/458 گرم در لیتر در روز ششم حاصل میشود که نسبت به روزهای دوم و سوم به ترتیب 29/1 و 10/1 برابر بیشتر است (شکل 1-ب). افزایش وزن تر در تیمار 20 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم میتواند ناشی از تحریک متابولیسم نیتروژن باشد که منجر به بهبود رشد میشود (Zheng et al., 2005; Yang et al., 2006). در گونههای مختلف گیاهی اثر سمی نانوذره دیاکسید تیتانیوم مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعه انجام گرفته روی توتون نشان میدهد که قرارگیری در معرض غلظتهای بالای نانوذره اکسید تیتانیوم باعث بروز سمیت میشود (Demir et al., 2014; Pakrashi et al., 2014). علاوه بر این، آسیب به کروموزوم و ریز هسته پیاز و شکستگی DNA نیز مشاهده شده که باعث کاهش رشد میشود (Ghosh et al., 2010).

جدول (1): تجزیه واریانس تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم و زمانهای نمونهبرداری بر وزن تر و خشک و تجمع و تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر سلولها	وزن خشک سلولها	تجمع آزادیراختین	تولید آزادیراختین
نانوذره دیاکسید تیتانیوم (Ti)	4	279/44878 **	101/11 ns	694/9 **	869/2018 **
زمان نمونهبرداری (T)	2	978/41509 **	199/14 ns	090/3 **	722/152 ns
T × Ti	8	313/5484 ns	194/18 **	102/0 ns	648/385 *

خطا	30	870/2700	546/5	372/0	089/130
ضریب تغییرات (%)		67/12	29/18	18/13	22/19

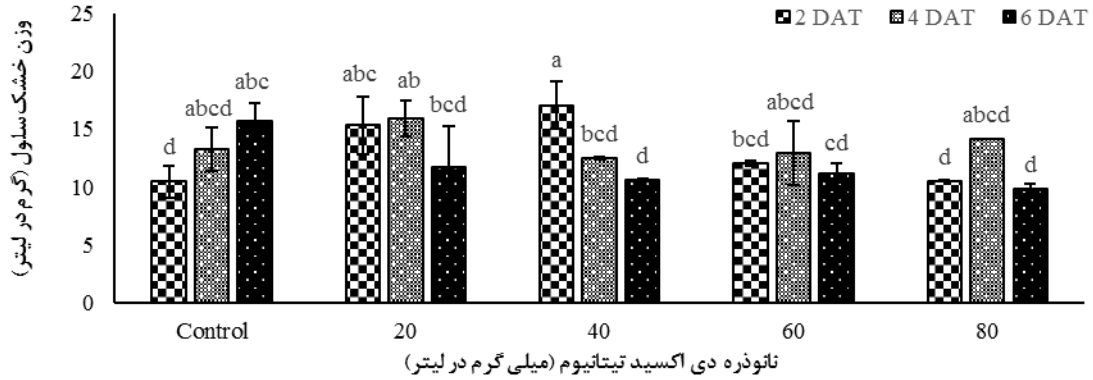
** معنیدار در سطح احتمال 1 درصد، * معنیدار در سطح احتمال 5 درصد، ns غیر معنیدار.



شکل (2): تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم و زمان نمونهبرداری بر وزن تر سلولها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش.

3-2- وزن خشک سلول

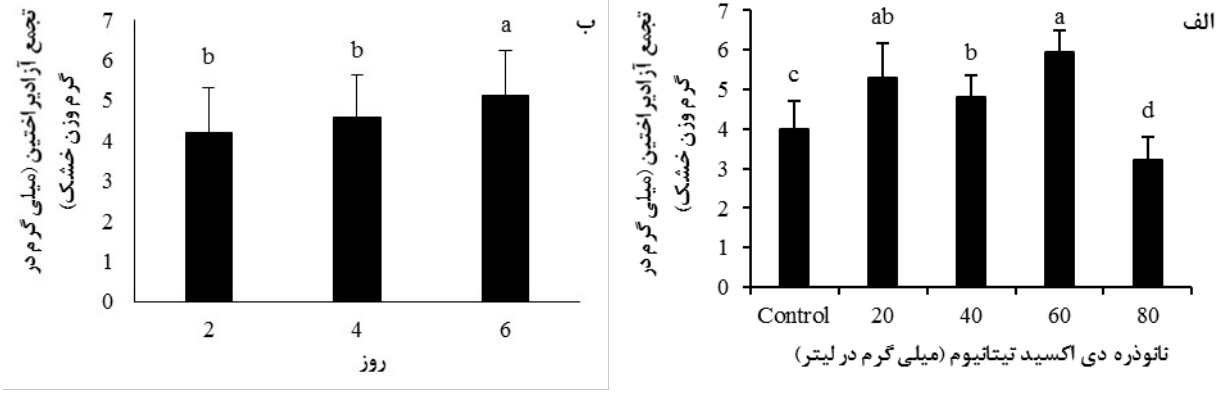
نتایج نشان داد که غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم و زمانهای مختلف نمونـهبـرداری تـاثیری روی وزن خشک سلول ندارد؛ در حالی که، اثر متقابل غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم با زمانهای مختلف نمونه-برداری تاثیر معنیداری روی وزن خشک سلولها داشت (جدول 1).ـ با اعمال غلظتهای مختلف نـانوذره دیاکسـید تیتانیوم و در نظر گرفتن زمانهای مختلف نمونهبـرداری، بـالاترین مقـدار وزن خشک سـلولها با میـانگین 05/17 گرم در لیتر دو روز پس از افزودن 40 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسـید تیتـانیوم به محیط کشت حاصل شد که نسبت به شاهد در همان روز 63/1 برابر و نسبت به غلظت¬های 20، 60 و 80 میلیگرم در همان روز به ترتیب 11/1، 41/1 و 62/1 برابر افزایش یافته بود (شکل 2).



شکل (2): تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم (الف) و زمانهای مختلف نمونهبرداری (ب) بر وزن خشک سلولها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش. DAT: روز پس از اعمال تیمار.

3-3- تجمع آزادیراختین

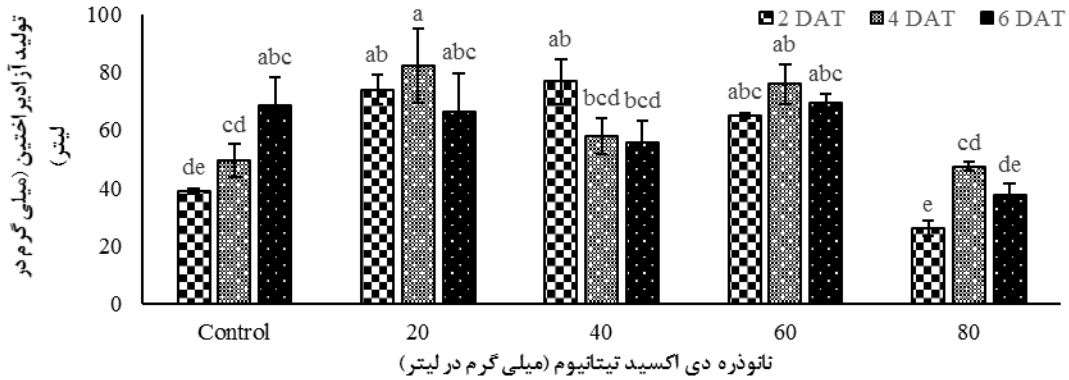
تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم و زمانهای مختلف نمونهبرداری بر تجمع آزادیراختین معنیدار، اما تاثیر متقابل آنها معنیدار نبود (جدول 1). افزودن 20، 40 و 60 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم موجب افزایش تجمع آزادیراختین در سلولها گردید، اما کاربرد غلظتهای 80 میلیگرم در لیتر اثر مهاری داشـته و بـاعث کاهش تجمع آزادیراختین شد. از بین غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم، استفاده از 60 میلیگرم در لیتر بیشترین اثر تحریکی را داشته و باعث تجمع 93/5 میلیگرم در گرم وزن خشک آزادیراختین شده بود (شـکل 3-الف). از نظر زمان نمونهبرداری نیز با گذشت زمان مقدار تجمع آزادیراخـتین افـزایش یافته و بیشـترین مقـدار آن با میانگین 11/5 میلیگرم در گرم وزن خشک در روز ششم حاصل شد (شکل 3-ب).



شکل (3): تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم (الف) و زمانهای مختلف نمونهبرداری (ب) بر تجمع آزادیراختین در سلولها در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش.

4-3- تولید آزادیراختین

نتایج نشان داد که غلظتهای مختلف نانوذره دیاکسید تیتانیوم و اثر متقابل آن با زمانهای مختلف نمونهبرداری تاثیر معنیداری روی تولید آزادیراختین دارند (جدول 1). با کاربرد 20، 40 و 60 میلیگرم در لیتر نانوذره دی-اکسید تیتانیوم میزان تولید آزادیراختین افزایش یافت، اما با کاربرد غلظتهای 80 میلیگرم در لیتر تولید آن کاهش پیدا کرد. بنابراین، غلظتهای بالای نانوذره دیاکسید تیتانیوم اثر منفی و مهاری روی تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش دارد. با کاربرد 20 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم میزان تولید آزادیراختین نسبت به شاهد 42/1 برابر افزایش یافته بود (شکل 4-الف). اثر متقابل غلظتهای مختلف نانوذره اکسید روی و زمانهای مختلف نمونهبرداری نشان داد که بیشترین میزان تولید آزادیراختین با میانگین 21/82 میلیگرم در لیتر در تیمار 20 میلیگرم در لیتر نانوذره دیاکسید تیتانیوم در روز چهارم حاصل میشود که نسبت به شاهد و غلظتهای 40، 60 و 80 میلیگرم در لیتر در همان روز به ترتیب 67/1، 42/1، 08/1 و 73/1 برابر بیشتر است (شکل 4-ب). پاسخ اولیه گیاه به نانوذرات شامل افزایش سطح گونههای فعال اکسیزن، کلسیم سیتوپلاسمی و افزایش آبشار MAPK میباشد که در سایر تنشها نیز رخ میدهد. در آرابیدوپسیس نانوذرات به گیرندههای موجود در سطح غشاء پلاسمایی متصل شده و انفجار کلسیم و القاء گونههای فعال اکسیژن را مورد هدف قرار میدهند (Sosan et al., 2016). نانوذرات از طریق آزادسازی یونها و اتصال به گیرنده-های کلسیم، کانالهای کلسیمی و ATPaseهای کلسیم/سدیم و متابولیسم سلول را تحت تاثیر قرار میدهند (Mirzajani et al., 2014). نانوذرات از طریق اتصال به پروتئینهای متصل شونده به کلسیم و سایر پروتئینها، همانند کلسیم یا مولکولهای پیامرسان موجود در سیتوزول عمل میکنند (Khan et al., 2017). بنابراین، نانوذرات میتوانند تولید متابولیتهای ثانویه را در سلولهای گیاهی تحت تاثیر قرار دهند. مطالعات نشان میدهند که نانوذرات متابولیسم ثانویه گیاهان را تحت تاثیر قرار میدهند. برای مثال، در کشت گیاه گندواش استفاده از 900 میلی-گرم در لیتر نانوذره نقره باعث افزایش 9/3 برابری مقدار آرتمیزینین شده بود (Zhang et al., 2013).



شکل (4): تاثیر غلظتهای مختلف نانوذره اکسید روی و زمانهای مختلف نمونهبرداری بر تولید آزادیراختین در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه چریش. DAT: روز پس از اعمال تیمار.

مراجع

Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In *Food Biotechnology* (pp. 187-228). Springer, Berlin, Heidelberg.

Sarin, R. (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology*, *4*(2), 79-93.

Raei, M., Angaji, S. A., Omidi, M., & Khodayari, M. (2014). Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. *Int J Biosci*, *5*(1), 74-81.

Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, *20*(2), 101-153.

Jain, D., Daima, H. K., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2009). Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, *4*(3), 557-563.

Clément, L., Hurel, C., & Marmier, N. (2013). Toxicity of TiO2 nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants–effects of size and crystalline structure. *Chemosphere*, *90*(3), 1083-1090.

Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W. N., & Biswas, P. (2015). Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*, *7*(12), 1584-1594.

Gao, F., Liu, C., Qu, C., Zheng, L., Yang, F., Su, M., & Hong, F. (2008). Was improvement of spinach growth by nano-TiO_2 treatment related to the changes of Rubisco activase?. *Biometals*, *21*(2), 211-217.

Deng, Y. X., Cao, M., Shi, D. X., Yin, Z. Q., Jia, R. Y., Xu, J., ... & Yang, Z. R. (2013). Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: acute and subacute toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *35*(2), 240-246.

Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2012). In vitro azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in nutrient mist bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(2), 365-378.

Farjaminezhad, R., & Garoosi, G. A. (2019). New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. *3 Biotech*, *9*(8), 309.

Zheng, L., Hong, F., Lu, S., & Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO_2 on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*, *104*(1), 83-91.

Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C., & Yang, P. (2006). Influence of nano-anatase TiO_2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, *110*(2), 179-190.

Demir, E., Kaya, N., & Kaya, B. (2014). Genotoxic effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on root meristem cells of *Allium cepa* by comet assay. *Turkish Journal of Biology*, *38*(1), 31-39.

Pakrashi, S., Jain, N., Dalai, S., Jayakumar, J., Chandrasekaran, P. T., Raichur, A. M., ... & Mukherjee, A. (2014). In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. *PloS One*, *9*(2), e87789.

Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., & Mukherjee, A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, *81*(10), 1253-1262.

Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., ... & Colbeck, I. (2016). Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, *85*(2), 245-257.

Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Schober, Y., Römpp, A., Ghassempour, A., & Spengler, B. (2014). Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *108*, 335-339.

Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A., & Siddiqui, Z. H. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, *110*, 194-209.

Zhang, B., Zheng, L. P., Yi Li, W., & Wen Wang, J. (2013). Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO_2 core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience*, *9*(3), 363-370.