Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Wood and Forest Science and Technology

Print ISSN: 2322-2077
Online ISSN: 2322-2786

The effect of magnetic field on vitality, betulinic acid and antioxidant properties in birch (*Betula pendula* Roth.)

Mansooreh Aghasizadeh Shaarbaf [*1], Vahide Payamnoor[2], Abbas Rezaei Asl[3]

1. Corresponding Author, Ph.D. Student, Dept. of Silviculture and Forest Ecology, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mansooreh.aghasi@gmail.com
2. Associate Prof., Dept. of Silviculture and Forest Ecology, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: mnoori56@gmail.com
3. Associate Prof., Dept. of Mechanical Engineering of Biosystems, Faculty of Water and Soil Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: arezaeiasl@gau.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 02.24.2022
Revised: 08.23.2022
Accepted: 08.12.2022

Keywords:
Antioxidant,
Betulinic acid,
Birch,
Cell culture,
Magnetic field

ABSTRACT

Background and Objectives: Accumulation of secondary metabolites in plants is part of the defensive responses to pathogenic attacks that induce and activate the inducers. Plant tissue or cell culture is widely used as a sustainable method for the study of plant secondary metabolites. Betulinic acid is one of the most important anti-cancer and anti-AIDS metabolites, which mainly comes from birch species (*Betula pendula* Roth). Due to the near extinction of these species in Iranian forests, there is need to develop modern cell and tissue culture techniques instead of traditional methods of skin extraction. The present study was carried out in the same direction and with the aim of increasing the amount of effective substance produced.

Materials and Methods: Birch inner skin explants were cultured in NT+ (2.5 mlg/l) 2-4, D + (0.5 mlg/l) BAP with 3% sucrose and 0.8% agar and callogenesis was conducted. Subcultures were performed once a month and the 8-month-old cells were exposed to a magnetic field. Birch cells were treated in suspension culture (approx. 1 g of soft and white callus in 30 ml of NT culture medium with the above-mentioned hormonal compounds without agar) by static magnetic field with an intensity of 30 mT and on days 8-11 after sub culture, 4 hours a day. Next, cell viability, growth rate, betulinic acid and antioxidant properties in cells treated with a magnetic field were measured and compared to untreated cells.

Results: The results of this study showed that the growth rate, betulinic acid and antioxidant properties of treated cells increased compared to control cells. However, cell viability was not affected by the magnetic field. The amount of magnetic input did not cause cell death or death. In the treated cultures, the total betulinic acid production (18.51 g/l), the ratio of antioxidant properties (40.09%) and the ratio of growth (0.12%) were 2.5, 2.8 and 1.2 times higher than the control cultures of (7.28 g/l), (40.09%) and (0.09), respectively.

Conclusion: In this study, the magnetic field, like other inducers or elicitors, induces secondary metabolism in cells by triggering the message chain through oxidative stress, and increased the production of secondary metabolites in birch cells compared to control samples. It can also be said

that the electromagnetic field as an artificial stress caused the cells to react and increase the growth and production of active substances. This elicitor can increase the medicinal properties of birch by increasing the amount of betulinic acid and antioxidant capacity.

Cite this article: Aghasizadeh Shaarbaf, Mansooreh, Payamnoor, Vahide, Rezaei Asl, Abbas. 2022. The effect of magnetic field on vitality, betulinic acid and antioxidant properties in birch (*Betula pendula* Roth.). *Journal of Wood and Forest Science and Technology*, 29 (2), 39-57.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JWFST.2022.19601.1946
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۷۷
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۸۶

اثر میدان مغناطیسی بر توان‌زیستی، بتولینیک اسید و خواص آنتی‌اکسیدان توس (*Betula pendula* Roth.)

منصوره آقاسی‌زاده شعرباف*[۱]، وحیده پیام‌نور[۲]، عباس رضایی اصل[۳]

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mansooreh.aghasi@gmail.com

۲. دانشیار گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: mnoori56@gmail.com

۳. دانشیار گروه مکانیک بیوسیستم، دانشکده مهندسی آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: arezaeiasl@gau.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۵
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۱

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدان،
بتولینیک اسید،
توس،
کشت سلولی،
میدان مغناطیسی

چکیده

سابقه و هدف: تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بخشی از پاسخ‌های دفاعی در برابر حملات پاتوژنی است که معمولاً به مقدار کم در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند و محرک‌ها می‌توانند مقدار آن‌ها را افزایش دهند. کشت بافت و سلول گیاهی به‌عنوان یک روش پایدار برای بررسی متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. بتولینیک اسید یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ضد سرطان و ضد ویروس ایدز است که اصلی‌ترین منبع اولیه تهیه آن درخت توس است. با توجه به در حال انقراض بودن این درختان در ایران، جایگزین نمودن روش‌های نوین کشت سلول و بافت به‌جای استخراج از پوست این‌گونه امری ضروری است. پژوهش حاضر در همین راستا و باهدف افزایش مقدار ماده مؤثر تولیدی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: ریزنمونه‌های پوست داخلی توس در محیط کشت NT با ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار، ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2-4,D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP کشت شد و کالزایی صورت گرفت. بازکشت‌ها به‌صورت ماهانه انجام شد و سلول‌های ۸ ماهه تحت اثر میدان مغناطیسی قرار گرفتند. سلول‌های توس در کشت تعلیقی (حدود ۱ گرم کالوس نرم و سفید در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت NT با ترکیبات هورمونی فوق‌الذکر بدون آگار) توسط میدان مغناطیسی ایستا با شدت ۳۰ میلی تسلا و در روزهای ۱۱-۸ بعد از واکشت، روزی ٤ ساعت تیمار شدند. سپس زنده‌مانی سلول‌ها، میزان رشد، بتولینیک اسید و خواص آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده با میدان مغناطیس، اندازه‌گیری و با سلول‌های تیمار نشده مقایسه گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزان رشد، بتولینیک اسید و خواص آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده توسط میدان مغناطیس نسبت به شاهد افزایش یافت؛ اما زنده‌مانی سلول‌ها تحت‌تأثیر میدان مغناطیسی قرار نگرفت، بااین‌حال میزان مغناطیس واردشده باعث از بین رفتن و مرگ سلولی نشد. در کشت‌های تیمار شده تولید بتولینیک اسید کل (۱۸/۹۸ گرم بر لیتر) نسبت به کشت‌های شاهد (۷/۲۸ گرم بر لیتر) ۲/۵ برابر و نسبت خواص آنتی‌اکسیدانی در کشت‌های تیمار شده (۴۰/۰۹ درصد) نسبت به کشت‌های شاهد (۱۴/۲ درصد) ۲/۸ و نسبت رشد در کشت‌های تیمار شده (۰/۱۲ درصد) نسبت به کشت‌های شاهد (۰/۰۹ درصد) ۱/۲ برابر شد.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش میدان مغناطیسی نیز مثل دیگر القاکننده‌ها یا محرک‌ها با راه‌اندازی زنجیره انتقال پیام از طریق استرس اکسیداتیو ایجادشده، متابولیسم ثانویه را در سلول‌ها القاء نموده و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های توس نسبت به نمونه‌های شاهد شدند. هم‌چنین می‌توان گفت میدان مغناطیس به‌عنوان یک تنش مصنوعی باعث واکنش سلول‌ها و افزایش رشد و تولید مواد مؤثره شد. این محرک می‌تواند با افزایش میزان بتولینیک اسید و ظرفیت آنتی‌اکسیدان، در کشت‌های این‌ویترو این گیاه دارویی در حال انقراض به کار رود.

استناد: آقاسی‌زاده شعرباف، منصوره، پیام‌نور، وحیده، رضایی اصل، عباس (۱۴۰۱). اثر میدان مغناطیسی بر توان‌زیستی، بتولینیک اسید و خواص آنتی‌اکسیدان توس (*Betula pendula* Roth.). *نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل*، ۲۹ (۲)، ۳۹-۵۷.
DOI: 10.22069/JWFST.2022.19601.1946

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

استفاده از محرک‌ها[1] می‌تواند موجب القاء یا افزایش سنتز متابولیت‌های ثانوی گردد، محرک‌ها عموماً به دلیل القاء بیان ژن‌های دفاعی و فعال کردن مسیرهای دفاعی مرتبط با متابولیت‌های ثانویه موردتوجه هستند (۱). تحریک گیاهان با استفاده از میدان مغناطیسی محرکی از نوع فیزیکی بوده، هم فعالیت یون‌ها و هم قطبی شدن مولکول‌های دوقطبی را در سلول‌های زنده تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۲). محرک‌های فیزیکی بدون دست‌کاری ژنتیکی، رشد و فرآیندهای متابولیکی را تحریک می‌نمایند. ازاین‌رو، کاربرد مقادیر بهینه روش‌های فیزیکی برای بذر و گیاه، اثر ژنتیکی روی گیاه نداشته و به نسل بعد منتقل نخواهد شد (۳). گیاهان پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مختلفی نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی نشان می‌دهند (٤). تولید متابولیت‌های ثانویه که امروزه کاربرد نسبتاً وسیعی در صنعت داروسازی یافته‌اند، ازجمله مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر این عمل‌ها است (٤). سیستم‌های کشت سلول گیاهی یکی از راه‌های قابل جایگزین برای تولید متابولیت‌های ثانویه است که اهمیت بیش‌تر و قیمت بالاتری در صنایع غذایی و دارویی دارند، به‌خصوص که بسیاری از این گیاهان، زیستگاه‌های طبیعی محدود داشته و تولیدات این گیاهان نیز به‌شدت وابسته به محیط و هم‌چنین قارچ‌های همزیست است (٤). توس (Birch) با نام علمی *Betula pendula* Roth. از خانواده Betulaceae از پهن‌برگان بومی عرض‌های زیاد نیمکره شمالی بوده و تا ارمنستان، قفقاز و ایران پیش می‌رود (۵). توس در ایران بازمانده جنگل‌های اولیه خزری با تجدید حیات بسیار محدود و درخطر نابودی و انقراض است (٦). خواص منحصربه‌فرد دارویی این گیاه باعث شده از دیرباز در طب سنتی کشورهای آسیایی، روسیه و مردم بومی امریکا مورد استفاده قرار بگیرد (۷). بتولینیک اسید[2] یک تری‌ترپن پنتاسایکلیک[3] از نوع لوپان[4] است که به مقدار قابل‌توجهی در پوست گونه‌های مختلف توس وجود دارد. این ماده و مشتقات آن خواص ضد سرطانی، آنتی HIV، ضدالتهاب، ضد آلرژی، محافظ کبد، ضد سل دارند ولی مهم‌ترین خاصیت آن‌ها اثر ضد سرطانی جامع است به‌نحوی‌که برای طیف وسیعی از سرطان‌ها به اثبات رسیده است (۷). القای آپوپتوز داخلی در سلول‌های سرطانی از طریق مسیر میتوکندریایی و بدون آسیب رساندن به سلول‌های سالم توسط این ترکیبات، اتفاق می‌افتد (۸). ترکیباتی مانند بتولینیک اسید و مشتقات آن نوید یک استراتژی درمانی جدید برای درمان تومورهای انسانی را داده و می‌توانند به‌تنهایی یا در ترکیب با رادیوتراپی یا شیمی‌درمانی باعث مرگ سلول سرطانی شوند (۷).

اطلاعات اندکی در خصوص اثر میدان‌های مغناطیسی روی کشت‌های تعلیقی سلول‌های گیاهی در دسترس است، بررسی‌های متعدد نشان داده است میدان مغناطیسی می‌تواند بر توسعه کشت بافت سلول اثر گذارد. میزان رشد شاخساره و ریشه گیاه *Paulowinia tomentosa* در شرایط کشت بافت تحت‌تأثیر میدان مغناطیسی (۲/۹ و ٤/۸ میکرو تسلا) نسبت به شاهد افزایش داشته است (۹). در بررسی اثر میدان مغناطیسی روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در کشت بافت سویا (*Glycine max* L.)، ریزنمونه‌ها در معرض میدان با شدت‌های ۲/۹ و ٤/٦ با دوره زمانی ۲/۲ و ۱۹/۸ ثانیه قرار گرفتند، نتایج نشان داد که فعالیت پراکسیداز به‌صورت معنی‌داری در مقایسه با سلول‌های شاهد افزایش‌یافته است (۱۰).

1- Elicitors

2- Betulinic acid

3- Triterpene Pentacyclic

4- Lupan

با استفاده از تیمار میدان مغناطیسی پالس شده بر روی بذر (*Glycine max* L.) تحت تنش شوری، وزن کالوس و مقدار قند، پروتئین و فنول افزایش یافت (۱۱). قرار دادن بذرهای گندم (*Triticum aestivum* L.) در معرض میدان الکترومغناطیس ۰/۰۵ میلی تسلا و ۵۰ هرتز موجب ازدیاد جوانه‌زنی و هم‌چنین افزایش وزن گیاهچه‌ها و طول آن‌ها شد (۱۲). عباس‌زاده و همکاران (۲۰۱٤) بیان نمودند میدان الکترومغناطیس بر میزان تولید فنول در کشت سلولی گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe barbadensis* L.) به‌عنوان یک تنش مصنوعی موجب واکنش گیاه که همان متابولیسم ثانویه و تولید مواد مؤثره است شده و تولید فنول گیاه را افزایش می‌دهد (۱۳). رضایی و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی عنوان داشتند میدان مغناطیسی در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) تولید ترکیبات فنلی و تاکسول (نوعی دی‌ترپن با خاصیت ضد سرطانی) را نسبت به شاهد افزایش می‌دهد (۱٤). شانگ و همکاران (۲۰۰٤) در تیمار کشت سلولی سرخدار چینی (*Taxus chinensis* var. mairei) توسط میدان مغناطیسی گزارش دادند که مقدار تاکسول در ٤ روز قرار گرفتن تحت میدان مغناطیسی افزایش پیدا کرد (۱۵). در پژوهش‌های مختلفی اثر میدان‌های مغناطیسی بر جوانه‌زنی گیاه دارویی گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) مطالعه شد، نتایج پژوهش اولگن و همکاران (۲۰۱۷) و برادران‌راد و همکاران (۲۰۱٦) دلالت بر اثر مثبت میدان مغناطیسی و زمان قرارگیری بذر در این وضعیت بر جوانه‌زنی بذر این گل دارد (۱٦ و ۱۷). در پژوهشی دیگر محمدی و روشندل (۲۰۲۰) با بررسی اثر اعمال میدان‌های مغناطیسی روی گیاه *Hyssopus officinalis* L نشان دادند اعمال میدان‌های ایستای مغناطیسی (٤۵، ۹۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌تسلا به مدت ۵ دقیقه) سبب بهبود رشد و خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه می‌شود (۱۸). صفری‌زاده ثانی و همکاران (۱٤۰۰) با بررسی اثر آبیاری با آب مغناطیسی بر عملکرد گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) در بافت‌های مختلف کشت بیان نمودند استفاده از آب مغناطیسی سبب بهبود رشد این گیاه نسبت به تیمار شاهد شد (۱۹). بوشهری و همکاران (۲۰۱٦) با بررسی اثر میدان مغناطیسی ثابت یا ایستا روی درصد ایجاد کالوس‌های حاصل از جنین‌های بذری درخت جینکو (*Ginkgo biloba* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای بیان نمودند میدان مغناطیسی روی درصد ایجاد کالوس‌ها تأثیر معنی‌دار داشته است (۲۰). رحمتی‌نیا و همکاران (۲۰۱۸) عنوان کردند وقتی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد، به مدت پنج روز به‌صورت پیوسته در معرض میدان مغناطیسی قرار بگیرند از وزن تر و خشک بیش‌تری در مقایسه با محیط کشت حاوی سه میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده‌های رشد برخوردار خواهند بود (۲۱). قرائتی و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی گزارش دادند پیش‌تیمار میدان مغناطیسی می‌تواند با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات مخرب شوری به‌ویژه در غلظت ۵۰ میلی‌مولار را در گیاه خارمریم (*Silibum marianum* L.) تعدیل نماید (۲۲). رخبین و آزادبخت (۲۰۲۰) نیز کالوس گیاه بامیه (*Abelmosochs esculentus* L.) را در معرض میدان مغناطیس قرار دادند و عنوان کردند میزان فنل در مقایسه با تیمار شاهد از ۲/۷۵۹ به ۲/۹۳۲ mgGUEg-۱ رسید (۲۳).

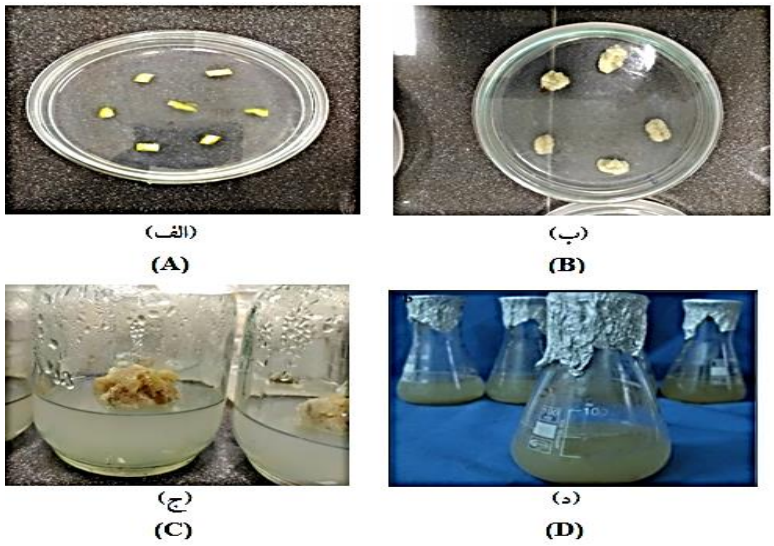
به دلیل محدود بودن رویشگاه‌های طبیعی توس و در حال انقراض بودن این درختان در ایران، جایگزین نمودن روش‌های نوین کشت سلول و بافت به‌جای استخراج از پوست امری ضروری است. پژوهش حاضر نیز در همین راستا و با هدف افزایش مقدار

ماده مؤثر تولیدی صورت گرفته است. بدین‌منظور اثر میدان مغناطیس به‌عنوان یک محرک فیزیکی موردبررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

القای تولید کالوس: شاخه‌های درخت توس در خرداد ۱۳۹۸ از درختان بالغ منطقه سیامرزکوه شهرستان فاضل‌آباد استان گلستان واقع در ۱۸ کیلومتری جنوب شرق شهر گرگان با عرض جغرافیایی ′۴۵ °۵۴ و طول جغرافیایی ′۳۹ °۳۶ از دامنه ارتفاعی ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ متر جمع‌آوری گردید. تیمارهای پیش‌سترون‌سازی به‌صورت شستشو با آب جاری، قرار دادن در مایع ظرف‌شویی به مدت سه دقیقه و بعد ضدعفونی با چهار گرم در لیتر قارچ‌کش بنومیل به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد و تیمارهای سترون‌سازی شامل سه مرتبه شستشو با آب مقطر، قرار دادن در کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه و سه مرتبه شستشوی مجدد با آب مقطر اعمال شد (۲۴). القای کالوس، با استفاده از ریزنمونه پوست شاخه که به قطعات ۵ در ۱۰ میلی‌متری برش داده‌شده بودند در محیط کشت پایه بهینه‌سازی شده NT (Nagata-Takebe)، با ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار، pH برابر ۵/۷ و ترکیب هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2-4,D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP (6-benzylaminopurine) انجام شد (شکل ۱، الف). نمونه‌ها در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (روشنایی: تاریکی) در اتاقک رشد (شرکت نورصنعت فردوس- ایران) قرار گرفتند و هر چهار هفته یک‌بار بازکشت شدند (شکل ۱، ب). تولید توده کالوس یکنواخت (شکل ۱، ج) با رشد مناسب در محیط کشت جامد پس از ۸ ماه انجام شد (۲۴).

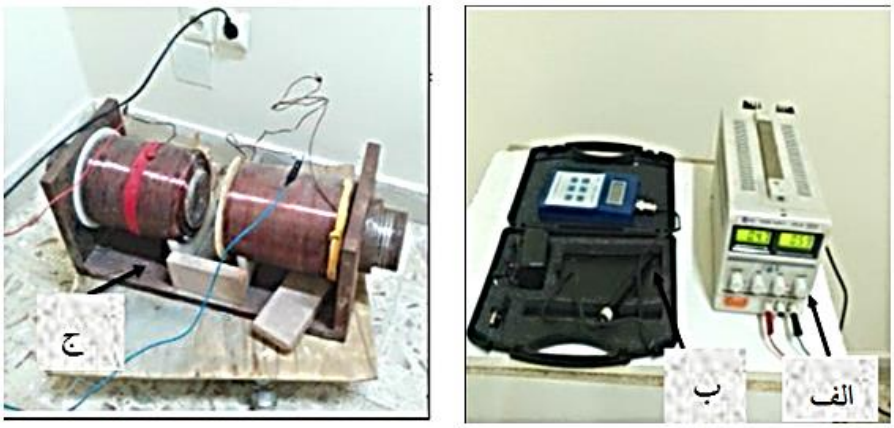
برای تهیه کشت سوسپانسیون سلولی حدود یک گرم کالوس نرم و سفید به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت NT با ترکیبات هورمونی فوق‌الذکر بدون آگار اضافه شد (شکل ۱، د) و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ روز در تاریکی روی شیکر انکوباتور نگهداری شد (۲۵).



شکل ۱- ریزنمونه پوست درخت توس (الف) کالوس دوماهه (ب) کالوس ۸ ماهه (ج) کشت سوسپانسیونی (د).

Figure 1. Examples of birch bark (A) Two-month callus (B) Eight-month callus (C) Suspension culture (D).

تیمار سلول‌ها با میدان مغناطیسی ایستا: از میدان مغناطیسی ایستا (شکل ۲) با شدت ۳۰ میلی تسلا، ۳ ولت و ۰/٤ آمپر، برای تیمار سلول‌ها (سوسپانسیون) در روز هشتم پس از واکشت به مدت ٤ روز و روزی ٤ ساعت استفاده گردید. (۲٦).



(الف و ب)
(A, B)

(ج)
(C)

شکل ۲- دستگاه الکترومغناطیس (الف: منبع، ب: دستگاه تسلامتر، ج: سیم‌پیچی میدان).
Figure 2. Electromagnetic device (A: source, B: Tesla meter device, C: Field winding).

اندازه‌گیری رشد سلولی و تعیین توان‌زیستی سلول‌ها پس از تیمار میدان مغناطیس: صفات درصد زنده‌مانی، وزن‌تر و خشک توده سلولی، میزان بتولینیک اسید و آنتی‌اکسیدان هر یک از تیمارها در دو حالت، بلافاصله پس از قرار گرفتن در معرض میدان مغناطیسی (t_1) و یک هفته پس از قرار گرفتن در معرض میدان مغناطیس (t_2) اندازه‌گیری و با نمونه‌های شاهد که در معرض میدان مغناطیس قرار نگرفته بودند (t_0) مقایسه شد.

به‌منظور بررسی زنده‌مانی سلول‌ها میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر تکرار برداشته شد و روی لام قرار گرفت (شکل ۳، الف) سپس با متیل‌بلو با غلظت یک درصد رنگ‌آمیزی شد. مشاهده سلول‌ها و شمارش آن با بزرگنمایی ٤۰X میکروسکوپ (OLYMPUS CX31) انجام شد (شکل ۳، ب). رشد سلولی با اندازه‌گیری افزایش در وزن‌تر سلول‌ها تعیین شد. جداسازی سلول‌ها از محیط کشت توسط نایلون مش ٤۲ میکرومتری با استفاده از قیف بوخنر در شرایط مکش انجام شد و برای تعیین وزن‌تر بلافاصله توزین و سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند (شکل ۳، ج) (۱٤).

(الف) (ب) (ج)

(A) (B) (C)

شکل ۳- رنگ‌آمیزی سلول (الف)، میکروسکوپ (ب)، کالوس خشک (ج).

Figure 3. Cell coloring (A), Microscope (B), Dry callus (C).

استخراج و اندازه‌گیری بتولینیک اسید: برای تعیین میزان بتولینیک اسید، یک گرم کالوس خشک در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC (High Performance Liquid Chromatography) کوبیده شد و در داخل لوله فالکن پیچیده‌شده با فویل به‌مدت شش دقیقه در دستگاه التراسوند قرار داده شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفتند و به مدت پنج دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی (سوپرناتانت) برای تزریق به دستگاه HPLC (هیتاچی سری L۲٤۵۰، ژاپن) از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد (۲٤). ستون مورداستفاده C_{18} میلی‌متر (۲۵۰ در ٤/٦ میلی‌متر) طول‌موج دستگاه روی ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد. سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد و از فاز متحرک به‌صورت ایزوکراتیک با حلال‌های استونیتریل و آب، به نسبت ۹:۹۱ استفاده شد. با استفاده از استاندارد بتولینیک اسید خریداری‌شده از شرکت سیگما برای رسم منحنی استاندارد بتولینیک اسید غلظت‌های متفاوت تهیه و به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید (۲۷).

تعیین خواص آنتی‌اکسیدان: خواص آنتی‌اکسیدانی براساس روش مشایخی و آتشی (۲۰۱٤) و با محلول DPPH بررسی شد. ۰/۵ cc از محلول عصاره موردنظر با نیم سی‌سی از محلول DPPH مخلوط سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و درنهایت جذب آن‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. فعالیت برحسب درصد نسبی DPPH طبق معادله زیر محاسبه شد (۲۸):

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(As-Ab)}{Ab} \times 100$$

که در آن، A_{blank} جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر، A_{sample} جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر.

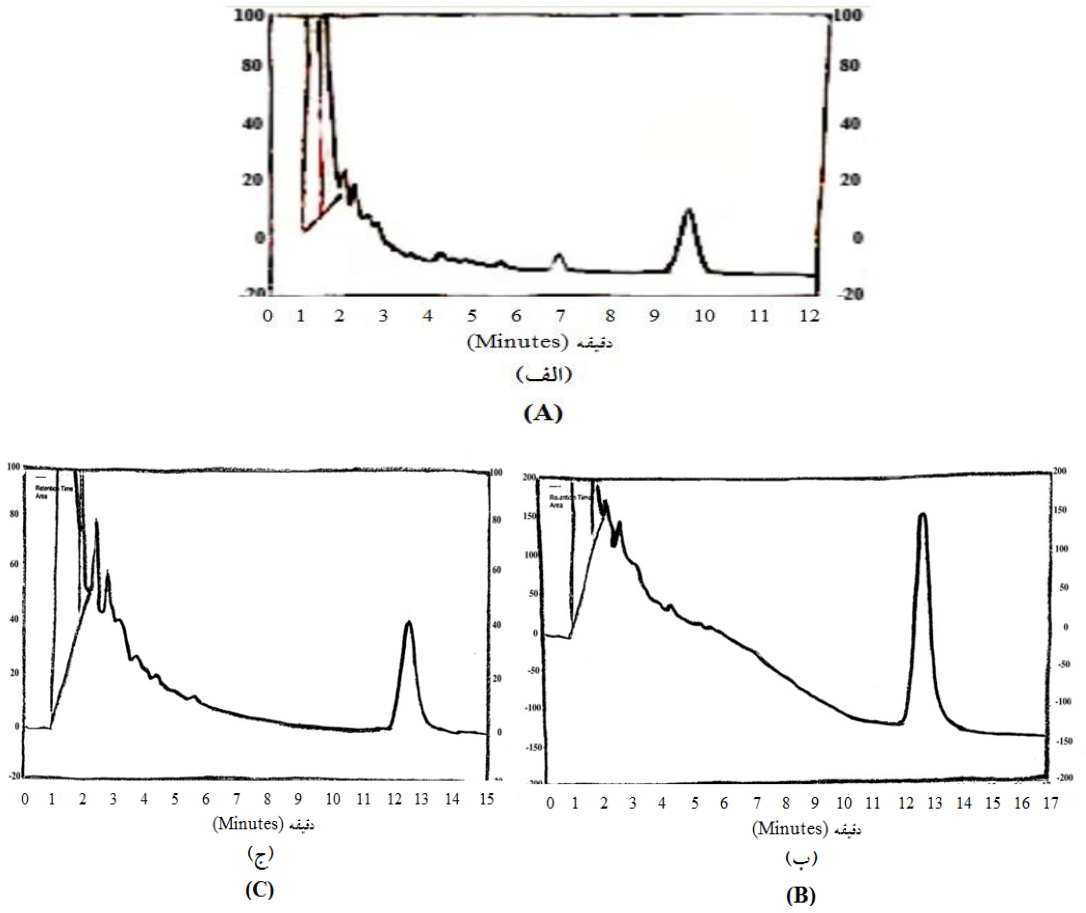
آنالیز آماری: فاکتورهای فوق به‌صورت جداگانه و توأم روی سلول‌ها با ۳ تکرار تیمار شده و تأثیر آن‌ها روی مشخصه‌های ذکرشده با آزمون ANOVA جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در سطح $P\leq$۰/۰۵ انجام شد.

نتایج و بحث

با تزریق استاندارد خالص بتولینیک اسید به دستگاه HPLC پس از گذشت حداکثر ۱۵ دقیقه منحنی[1]

1- Peak

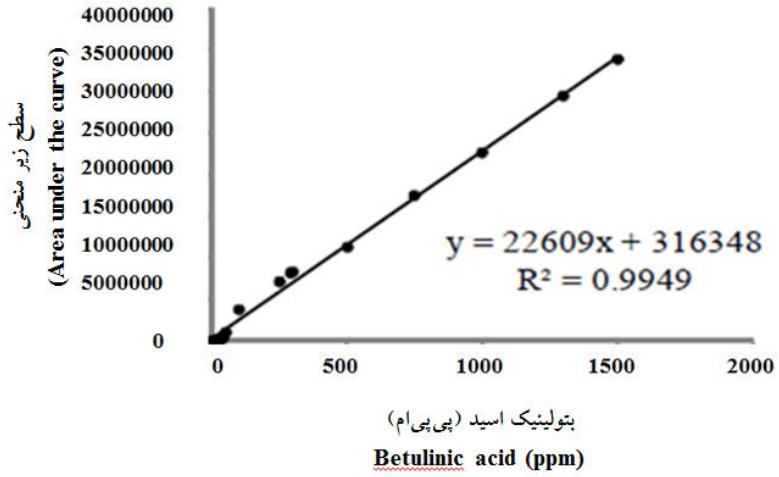
مربوط به ماده مؤثره ظاهر شد. تشخیص منحنی هر نمونه در کروماتوگرام حاصل با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن منحنی بتولینیک اسید خالص (استاندارد) تزریق‌شده و منحنی‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام گردید. میزان ماده مؤثره هر یک از نمونه‌ها با اندازه‌گیری سطح زیر منحنی نمونه‌ها در زمان موردنظر تعیین و با قرار دادن این سطح در رابطه خط حاصل از تزریق، غلظت‌های مختلف محاسبه شد (شکل ٤). به‌منظور تعیین میزان بتولینیک اسید در عصاره‌های توس از رابطه y=۲۲٦۰۹x+۳۱٦۳٤۸ با ضریب تعیین R^2=۰/۹۹٤۹[1] استفاده شد (شکل ٥).



شکل ٤- منحنی کروماتوگرام HPLC: منحنی حاصل از تزریق استاندارد بتولینیک اسید (الف) عصاره توس در تیمار مغناطیس (ب) و شاهد (ج).

Figure 4. HPLC chromatogram: Peaks obtained from injection of betulinic acid standard (A) birch extract by magnetic treatment (B) and control (C).

1- R-squared correlation



شکل ۵- منحنی کالیبراسیون بتولینیک اسید.

Figure 5. Batulinic acid calibration curve.

اثر میدان مغناطیسی بر روی رشد کالوس‌ها، بتولینیک اسید، آنتی‌اکسیدان و وزن تر کالوس‌ها نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ولی میزان زنده‌مانی سلول‌ها و وزن خشک سلول‌ها تحت‌تأثیر مغناطیس قرار نگرفت و با شاهد اختلاف معنی‌داری ایجاد نکرد (جدول ۱).

جدول ۱- آنالیز واریانس برای بررسی اختلاف میانگین میان تیمار مغناطیس و شاهد.

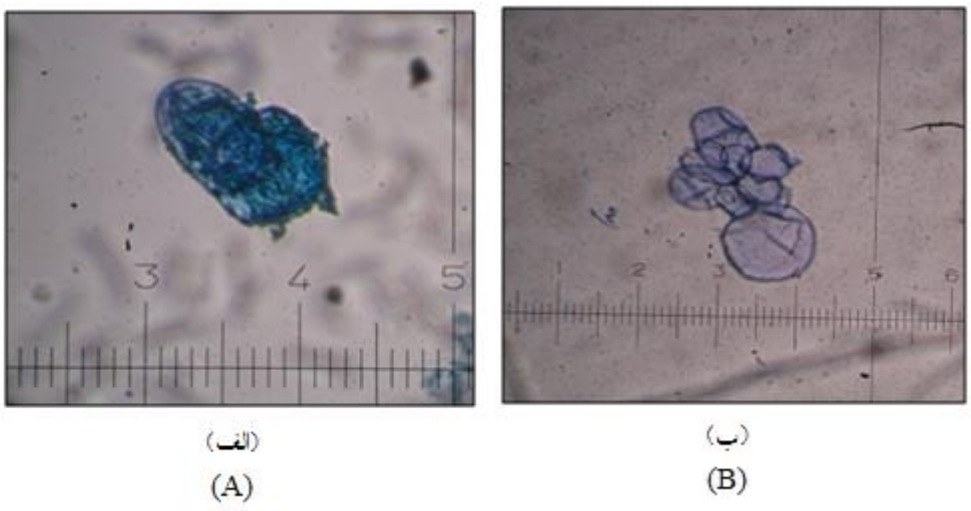
Table 1. Analysis of variance to investigate the mean difference between magnetic treatment and control.

Sig	F	میانگین مربعات Mean Square	درجه آزادی df	شاخص مورد بررسی Index under study
0.04*	10.167	0.001	2	میزان رشد Growth rate
0.10 ns	5.158	54.603	2	درصد زنده‌مانی Survival rate
0.000*	32.488	1.439	2	بتولینیک اسید Betulinic acid
0.04*	10.167	0.001	2	وزن‌تر Wet weight
0.29 ns	1.923	0.003	2	وزن خشک Dry weight
0.01*	23.282	337.44	2	آنتی‌اکسیدان Antioxidant

* معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ns عدم معنی‌داری

* Significant at the 0.05 level, ns not significant

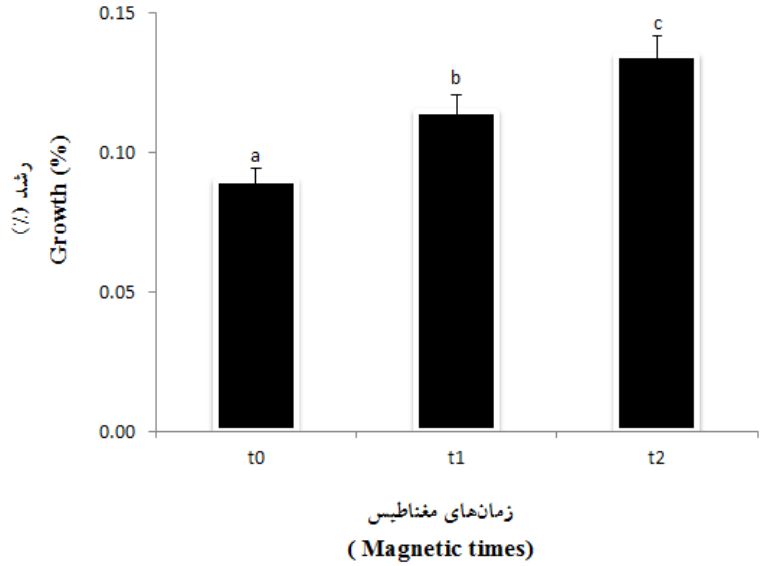
در پژوهش حاضر زنده‌مانی کشت‌های تیمار شده و شاهد تفاوت معناداری نداشتند اما در کشت‌های مغناطیس شده میزان رشد افزایش مناسبی داشته است. سلول‌های مرده آبی‌رنگ شدند (شکل ٦، الف) ولی در سلول‌های زنده فقط دیواره سلول مشخص شد (شکل ٦، ب).



شکل ٦- سلول مرده (الف)، سلول زنده (ب).

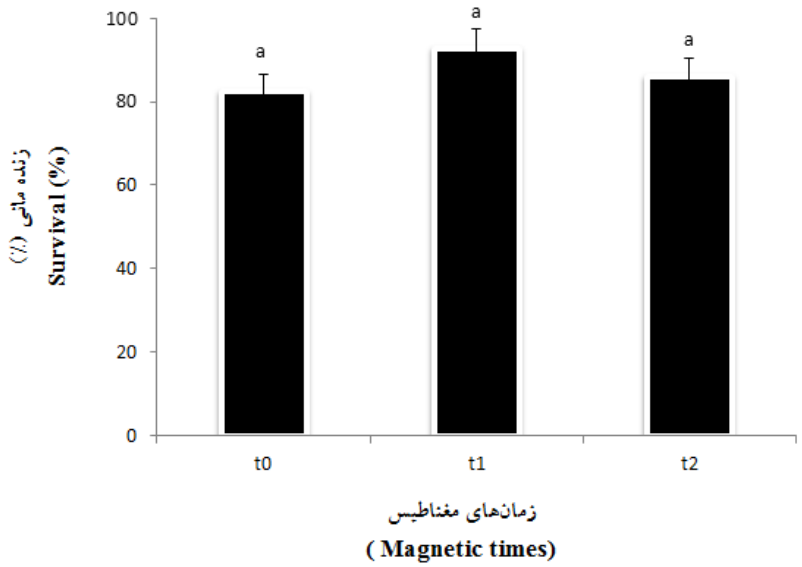
Figure 6. Dead cell (A), Live cell (B).

نتایج پژوهش نشان داد که میدان مغناطیس باعث افزایش میزان ۱/۲ برابری رشد در تیمار مغناطیس نسبت به تیمار شاهد شده است (شکل ۷). در ضمن مقایسه تیمار مغناطیس شده و شاهد نشان داد که این میزان مغناطیس واردشده باعث از بین رفتن و مرگ سلولی نشد (شکل ۸).



شکل ۷- مقایسه میزان رشد در تیمارهای مغناطیس (t_1, t_2) و شاهد (t_0).

Figure 7. Comparison of growth in magnetic treatments (t_1, t_2) and control (t_0).



شکل ۸- مقایسه درصد زنده‌مانی در تیمارهای مغناطیس (t_1, t_2) و شاهد (t_0).

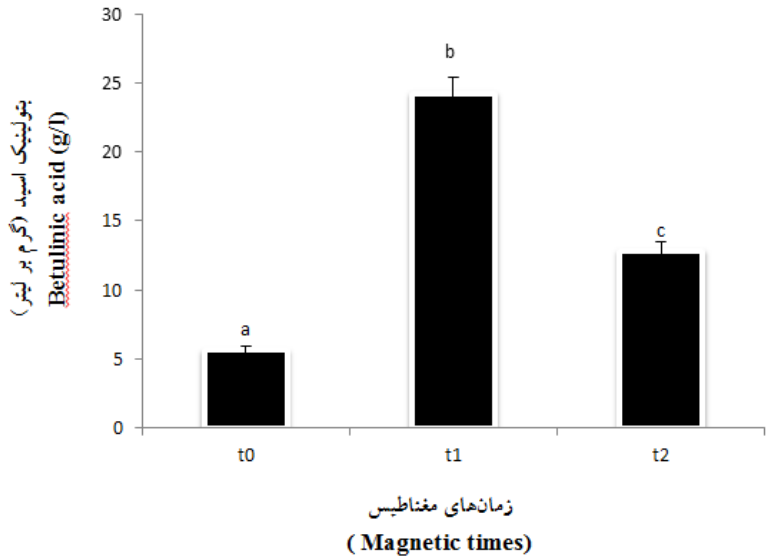
Figure 8. Comparison of survival rates in magnetic treatments (t_1, t_2) and control (t_0).

مغناطیس به‌عنوان یکی از تنش‌های محیطی شناخته شده است که می‌تواند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم روی گیاهان به‌خصوص گیاهان تحت تنش‌های مختلف اثر بگذارد (۲). در سال‌های اخیر میدان‌های الکترومغناطیسی به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر بر موجودات زنده منظور شده‌اند و میدان‌های دارای شدت زیاد به‌عنوان عامل تنش‌زا محسوب می‌گردند، این میدان‌ها می‌توانند بر تکثیر و تمایز سلولی اثر گذاشته و سرعت رشد را تغییر دهند (۲۹). مطالعات ثابت کرده است که میدان‌های مغناطیسی ضعیف تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در ویژگی‌های مورفولوژیکی و متابولیکی ارگانیسم‌های موردمطالعه ایجاد می‌کند (۲). میدان‌های مغناطیسی باعث ایجاد تحریکات و درنهایت تغییراتی درون سلول‌های مورد تیمار می‌شوند، از تأثیرات مهم این میدان‌ها نخست تغییر در میزان شار یون از طریق تأثیر بر غشای سلولی است (۲). رضایی و همکاران (۲۰۱۲) در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) بیان نمودند، محرک میدان مغناطیس می‌تواند میزان رشد سلول‌های این گیاه در مقایسه با تیمار شاهد را افزایش دهد (۱٤). شانگ و همکاران (۲۰۰٤) با قرار دادن سرخدار (*Taxus chinensis* var. mairei) در معرض میدان مغناطیس، میزان رشد سلولی را تا حدودی بیش‌تر نسبت به سلول‌های شاهد مشاهده نمودند (۱۵). ماسکارا دیمیسی و همکاران (۲۰۱٦) عنوان داشتند با در معرض قرار دادن *Chlorella fusca* در شدت میدان‌های مغناطیس ۳۰ و ٦۰ میلی تسلا، میزان رشد نسبت به گروه کنترل افزایش قابل‌توجهی داشته است، آن‌ها هم‌چنین میدان مغناطیسی را عامل بسیار مهمی در تسریع رشد و افزایش کربوهیدرات دانستند (۳۰). این نتایج با نتیجه پژوهش حاضر یعنی افزایش میزان ۱/۲ برابری در میزان رشد تیمار مغناطیس شده نسبت به شاهد مطابقت می‌کند. هم‌چنین داده‌هایی از قرار گرفتن گونه‌های مختلف جنس Solanum در شرایط این‌ویترو تحت‌تأثیر میدان مغناطیسی گزارش‌شده است مبنی بر این‌که این میدان می‌تواند باعث تحریک رشد گیاهان

یا مهار رشدشان شود و این به نوع گونه، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه اولیه، مدت‌زمان تیمار یا حتی محیط کشت بستگی دارد (۳۱). سلیمی و ماهوری (۲۰۲۰) با قرار دادن گیاه عدس (*Lens culinaris* Medik.) در معرض میدان مغناطیسی، هم‌چنین فلورز و همکاران (۲۰۰۷) در مورد گونه ذرت (*Zea mays* L.) افزایش نرخ رشد را نسبت به تیمار شاهد گزارش دادند و عنوان داشتند که گیاهانی که تحت پوشش میدان‌های مغناطیسی هستند، رشد سریع‌تر و باکیفیت‌تری دارند (۳۲ و ۳۳). هم‌چنین در پژوهشی با آبیاری گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) با آب مغناطیس شده بهبود رشد در گیاه مشاهده شد (۳٤).

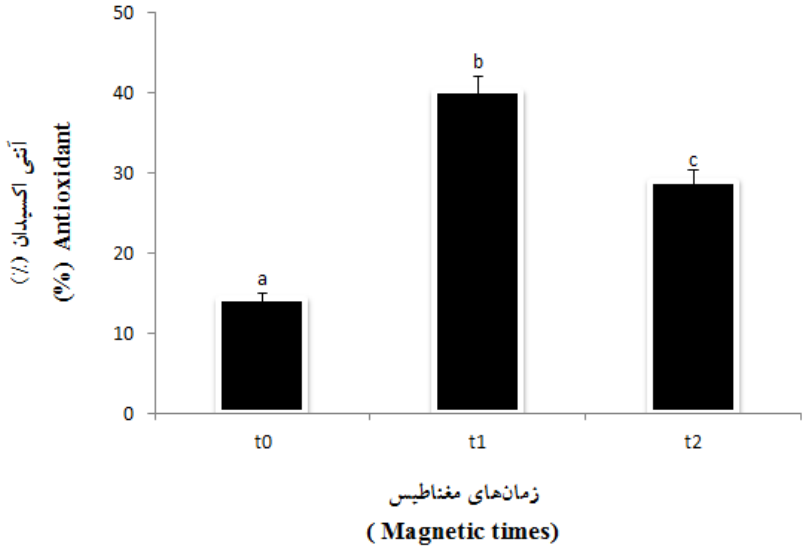
بررسی منابع نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی احتمالاً تا حدودی اثرات مثبتی بر رشد سلول دارد، این اثرات مفید میدان مغناطیسی ممکن است به علت افزایش در جذب یون‌ها به‌خصوص Ca^{2+} توسط سلول باشد (۳۵). تیمار گیاهان توسط Ca^{2+} می‌تواند با جلوگیری از سنتز اکسیدکننده‌های فعال، محافظت از ساختمان غشای پلاسمایی، حفظ فتوسنتز طبیعی و هم‌چنین تنظیم متابولیسم هورمون‌های گیاهی و سایر مواد شیمیایی مهم به رشد آن‌ها کمک نماید، سلول‌های گیاهی تحت‌تأثیر میدان مغناطیسی می‌توانند پاسخ‌های غیرقابل‌پیش‌بینی با توجه به عوامل متعددی ازجمله گونه، شدت میدان مغناطیسی و مدت قرار گرفتن در معرض آن داشته باشند (۳٦).

القای میدان مغناطیسی باعث افزایش میزان بتولینیک اسید در کشت‌های سوسپانسیونی شد به‌نحوی‌که میزان بتولینیک اسید در تیمار مغناطیس ۲/۵ برابر (شکل ۹) و خواص آنتی‌اکسیدان ۲/۸ برابر کشت‌های بدون تیمار مغناطیس گردید (شکل ۱۰).



شکل ۹- مقایسه میزان بتولینیک اسید در تیمارهای مغناطیس (t_1, t_2) و شاهد (t_0).

Figure 9. Comparison of betulinic acid levels in magnetic treatments (t_1, t_2) and control (t_0).



شکل ۱۰- مقایسه میزان آنتی‌اکسیدان در تیمارهای مغناطیس (t_1, t_2) و شاهد (t_0).

Figure 10. Comparison of antioxidant levels in magnetic treatments (t_1, t_2) and control (t_0).

بتولینیک اسید یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ضد سرطان (پوست، سینه، رحم، روده، پانکراس، مغز استخوان و غیره) و ضد ایدز می‌باشند که منبع اولیه تهیه آن درخت توس است، استخراج بتولین در کشورهای مختلف تولیدکننده از پوست درختان بالغ انجام می‌شود. قطع این درختان در ایران ممنوع است (۲۵). ازاین‌رو استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی ابزاری مناسب برای تولید متابولیت‌های ثانویه و تکثیر در شرایط کنترل‌شده و مستقل از محیط و تولید انبوه در زمان کوتاه است. کشت سلول‌های توس در شرایط این‌ویترو[1] باهدف تولید تری‌ترپنوئیدهای ویژه بتولین و بتولینیک اسید در چند سال اخیر آغازشده است (۲٤).

در خصوص اثرات میدان مغناطیسی روی کشت‌های سلولی اطلاعات بسیار اندکی موجود است، میدان‌های مغناطیسی می‌توانند بر طیف وسیعی از اعمال سلولی تأثیر بگذارند، اما مکانیسم دقیق این تداخل‌ها با سلول‌های زنده هنوز نامشخص است (۳۷). شانگ و همکاران (۲۰۰٤) در مطالعه‌ای کشت‌های تعلیقی سرخدار چینی (*Taxus chinensis Var. mairei*) را در معرض میدان مغناطیسی ایستا (SMF) با شدت ۳/۵ میلی تسلا و میدان مغناطیسی متناوب (ACMF) با شدت ۳/۵ میلی تسلا و فرکانس ۵۰ هرتز قراردادند. آن‌ها عنوان کردند میدان مغناطیس باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه شده و در هر دو میدان مغناطیسی میزان تاکسول تولیدی نسبت به تیمار شاهد افزایش‌یافته است (۱۵). رضایی و همکاران (۲۰۱۲) در کشت سلولی فندق (*Corylus avellana* L.) عنوان داشتند میدان مغناطیسی به‌طور معنی‌داری تولید تاکسول و ترکیبات فنلی را در مقایسه با کشت‌های شاهد افزایش داد طوری که در کشت‌های تیمار شده با میدان مغناطیسی نسبت تولید تاکسول کل به کشت‌های شاهد ۲/۹ برابر بود (۱٤). این نتیجه با نسبتی که در پژوهش حاضر به‌دست آوردیم یعنی نسبت ۲/۵ برابری تولید بتولینیک اسید در کشت‌های تیمار شده نسبت به شاهد مطابقت می‌کند. در این راستا عباس‌زاده و

1- In vitro

همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که میزان فنول نمونه‌های گیاهی آلوئه‌ورا قرار داده‌شده در محیط کشت *MS* در شرایط درون‌شیشه‌ای در کشت‌های تیمار شده با میدان مغناطیس نسبت به شاهد افزایش داشته است (۱۳). آکهز و بهاری (۲۰۰۱) نیز افزایش تولید ترکیبات فنلی را در کشت‌های سلولی *Cassia fistula* L. تحت‌تأثیر میدان مغناطیسی گزارش کردند (۳۸). این میدان الکترومغناطیس بر تبادل یون‌ها در غشا سلول اثر گذاشته و با اثرگذاری بر آنزیم‌ها و وجود عناصری با خواص مغناطیسی در سلول اثربخشی میدان مغناطیسی را افزایش داده است، به‌طوری‌که بسیاری از الکترون‌های جفت نشده با قرارگیری در میدان جفت شدند (۱۳). هم‌چنین می‌توان گفت میدان مغناطیسی نیز مثل دیگر القاکننده‌ها یا محرک‌ها با راه‌اندازی زنجیره انتقال پیام از طریق استرس اکسیداتیو ایجادشده که همراه با تولید H_2O_2 است، متابولیسم ثانویه را در سلول‌ها القاء نموده و باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه (۱٤) ازجمله بتولینیک اسید به میزان ۲/۵ برابر و هم‌چنین افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی به میزان ۲/۸ برابر نسبت به نمونه‌های شاهد در توس شدند. علائی و همکاران (۲۰۲۰) عنوان داشتند تأثیر میدان مغناطیسی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل حبه‌های انار (*Punica granatum* L.) معنی‌دار بود. به‌طوری‌که میدان مغناطیسی دینامیک با شدت ۸۲٤۰ گاوس[1] در زمان مغناطیسی شدن یک ساعت، سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل دانه‌های انار به میزان ۱۳/۳۲ درصد شد. درصورتی‌که در زمان مغناطیسی شدن ۱۲ ساعت، سبب کاهش آن به میزان ۰۸/ درصد گردید (۳۹).

در ارتباط با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حسینی و همکاران (۲۰۱۹) بیان داشتند میدان مغناطیسی انواع فعالیت‌های گیاهی ازجمله رشد، توسعه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه دان سیاه (*Guizotia abyssinica* (L.F) Cass) را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (٤۰). محمدی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش دادند مگنتو پرایمینگ می‌تواند با افزایش سطح پلی‌فنل‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، خواص دارویی گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) را افزایش دهد (۳۵). مرادی‌پور و پیام‌نور (۱٤۰۰) با قرار دادن میسیلیوم قارچ *Ganoderma lucidum* Karst. در معرض میدان مغناطیسی ۲۰، ٤۰ و ٦۰ میلی‌تسلا به مدت ۳۰، ٦۰ و ۹۰ دقیقه گزارش کردند که میزان آنتی‌اکسیدان تیمارهای مغناطیس نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (٤۱). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، مطالعات قبلی نیز ثابت کرد میدان مغناطیسی می‌تواند فعالیت آنزیم‌های پاکروبی مانند کاتالاز[2]، سوپراکسیدیسموتاز[3]، گلوتاتیون ردوکتاز[4]، گلوتاتیون ترانسفراز[5]، پراکسیدازها[6] و پلی‌فنل‌اکسیدازها[7] را تغییر می‌دهد (٤۲ و ٤۳). برخی از دانشمندان بر این عقیده‌اند که تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توسط میدان مغناطیسی به‌دلیل تجمع ROS تولیدشده در اثر میدان مغناطیسی است. پیشنهاد شده است اجزاء آپوپالستی سلول ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اکسایش و کاهش[8] در دریافت و پیام‌رسانی تغییرات میدان مغناطیسی اهمیت داشته باشند. میدان مغناطیسی اثرات مشخصی روی سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه گذاشته و با درگیر شدن میدان مغناطیسی در واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی آپوپالست، باعث فائق آمدن سلول بر عدم توازن اکسایش و کاهش می‌شود (٤٤). به‌طورکلی می‌توان گفت گیاهان

1- Gauss

2- Catalase
3- Superoxide dismutase
4- Glutathione reductase
5- Glutathione transferases
6- Peroxides
7- Polyphenol oxidase
8- Redox

جهت کاهش تنش اکسیداتیو و رشد و نمو طبیعی تحت شرایط تنش، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش می‌دهند (۳۵).

نتیجه‌گیری

میدان الکترومغناطیس به‌عنوان یک محرک موجب واکنش سلول‌های تمایز نیافته گیاه توس در کشت‌های سوسپانسیونی و درنتیجه افزایش بتولینیک اسید (۲/۵ برابر) و هم‌چنین افزایش میزان رشد (۱/۲ برابر) و خواص آنتی‌اکسیدان (۲/۸ برابر) نسبت به کشت‌های بدون تیمار مغناطیس می‌شود درعین‌حال این میزان مغناطیس (۳۰ میلی تسلا) باعث مرگ سلولی نمی‌شود. پیشنهاد می‌گردد پژوهش‌های تکمیلی در مورد کاربرد الکترومغناطیس در افزایش کمی و کیفی این ماده ضد سرطانی مدنظر قرار گیرد.

منابع

1. Wang, H.Y., Zeng, X.B., Guo, S.Y., and Li, Z.T. 2008. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. J. of the Bioelectromagnetics Society. 29: 1. 39-46.
2. Dhawi, F., Al-Khayri, J.M., and Hassan, E. 2009. Static magnetic field influence on elements composition in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). Research J. Agriculture Biology Sciences. 5: 161-166.
3. Vasilevski, G. 2003. Perspectives of the application of biophysical methods in sustainable agriculture. Bulgarian J. Plant Physiology (Special Issue). pp. 179-186.
4. Omidi, M., and Farzin, N. 2012. Biotechnology solutions in increasing the efficiency of medicinal plants. Modern Genetic J. 7: 3. 220-209. (In Persian)
5. Sabeti, H. 1976. Forests, Trees and shrubs of Iran. Ministry of Agriculture and Natural Resources of Iran, Tehran. (In Persian)
6. Jalili, A., and Arzani, H. 1999. A preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran (red data book of Iran). Research institute of forests and rangelands. Tehran. (In Persian)
7. Hordyjewska, A., Ostapiuk, A., Horecka, A., and Kurzepa, J. 2019. Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. Phytochemistry Reviews. 18: 929-951.
8. Fulda, S. 2008. Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention. International J. of Molecular Sciences. 9: 1096-1107.
9. Alikamanoğlu, S., Yaycılı, O., Atak, C., and Rzakoulieva, A. 2007. Effect of magnetic field and gama radiation on *Paulowinia tomentosa* tissue culture. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 21: 1. 49-53.
10. Atak, C., Emiroglu, O., Alikamanoglu, S., and Rzakoulive, A. 2003. Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max* L. Merrill) tissue cultures. J. of Cellular and Molecular Biology. 2: 113-119.
11. Radhakrishnan, R., Leelapriya, T., and Kumari, B.D. 2012. Effects of pulsed magnetic field treatment of soybean seeds on calli growth, cell damage, and biochemical changes under salt stress. J. of Bioelectromagnetics. 33: 8. 670-81.
12. Faeghi, P., and Seyedpour, N. 2013. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on seed germination and early growth in wheat (*Triticum* spp.). Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences. 2: 5. 52-54.
13. Abbaszaddeh, R., Masoumian, M., Sarami, SH., Zenozi, A., and Norouzian, A. 2014. Study of the effect of electromagnetic field on the production of phenol production of *aloe vera*. Third Iranian Conference of Electromagnetic Engineers. (In Persian)
14. Rezaei, A., Ghanati, F., and Behmanesh, M. 2012. Stimulation of taxol production by magnetic field in cell culture of hazel (*Corylus avellana* L.). Iranian J. of Biomedical Engineering. 6: 113-122. (In Persian)

15. Shang, G.M., Chuan, W., and Yuan, Y. 2004. Improved cell growth and Taxol production of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic Fields. J. Biotechnology Letters. 26: 875-878.
16. Ulgen, C., Yıldırım, A.B., and Turker, AU. 2017. Effect of magnetic field treatments on seed germination of *Melissa officinalis* L. International J. of Secondary Metabolite. 4: 3. 43-49.
17. Baradaranrad, A., Arouiee, H., and Tehranifar, A. 2016. Effect of magnetic field on germination of two *Calendula officinalis* L. cultivars. International J. of Advanced Biotechnology and Research. 7: 662-668.
18. Mohammadi, R., and Roshandel, P. 2020. Ameliorative effects of a static magnetic field on Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) growth and phytochemical traits under water stress. Bioelectromagnetics. 41: 6. 15-31.
19. Safarizade Sani, A., Jamali, S., and Banezhad, H. 1400. Investigating the effect of irrigation with magnetic water on the function and components of the evergreen plant in different tissues. J. of Iranian Water Research. 15: 1. 75-85. (In Persian)
20. Boshehri, SH., Ghaem Maghami, SM., and Abbaszadeh, SA. 2016. Studying the effect of static magnetic square on calus creating *Ginkgo Embryo* in laboratory conditions. The ninth congress of the Horticultural Science. Ahvaz.
21. Rahmatinia, M., Moradi, M., Ghasemi Omran, V., and Hadadinejad, M. 2018. The effect of different magnetic field duration on direct organogenesis of African Violets (*Saintpaulia Ionantha*) In Tissue Culture Medium with and Without Pgrs. J. of Crop Breeding. 9: 24. (In Persian)
22. Gharaati, T., Hassanpour, H., Hekmati, M., and Mousavi, F. 2020. Effects of magnetic fields on some physiological factors and antioxidant capacity of *Silibum marianum* L. seedlings under salt stress. J. of Plant Process and Function. 9: 38. (In Persian)
23. Rokhbin, A., and Azadbakht, M. 2020. Investigation of Some Qualitative Properties of Okra under the Influence of Magnetic Field. J. of Agricultural Mechanization. 5: 1. 71-79. (In Persian)
24. Nazari, J., Payamnoor, V., and Kavosi, M.R. 2017. The evaluation absorption of some secondary metabolites (betulin, betulinic acid, phenol, flavonoids) and antioxidant activity of woodinhabiting agaric fungi on medicinal birch tree (*Betula pendula* Roth.) in Golestan province. Eco-Phytochemical J. of medicenal plant. 14: 2. 44-55. (In Persian)
25. Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K., and Ahmadian Chashmi, N. 2016. Optimization of callus induction and cell suspension culture of *Betula pendula* Roth. for improved production of betulin, betulinic acid, and antioxidant activity. In vitro cellular and developmental biology-plant. 52: 4. 400-407.
26. Sahebjamei, H., Abdolmaleki, P., and Ghanati, F. 2007. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured tobacco cells. J. of Bioelectromagnetics. 28: 42-47.
27. Payamnoor, V., Lazemi, G., Nazari, J., and Alishah, O. 2020. Evaluation the effect of elicitors on antioxidant properties and mycelial secondary metabolites of *Stereum hirsutum*, *Hyphodontia paradoxa* and *Arthrinium arundinis* from Golestan province. Eco-phytochemical J. of Medicinal Plants. 2: 30. 76-88. (In Persian)
28. Mashayekhi, K., and Atashi, S. 2014. The analyzing methods in plant physiology. Sirang press. Gorgan. 310p. (In Persian)
29. Shabrangi, A., Majd, A., and Sheidai, M. 2011. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on growth, cytogenetic, protein content and antioxidant system of *Zea mays* L. J. of Biotechnology. 10: 46. 9362-9369. (In Persian)

30. Mosquera Deamici, K., Barcelos Cardias, B., Alberto Vieira Costa, J., and Oliveira Santos, L. 2016. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. J. of Process Biochemistry. 51: 7. 912-916.
31. Rakosy-Tican, L., Aurori, C.M., and Morariu, V.V. 2005. Influence of near null magnetic fieldon in vitro growth of potatoand wild Solanum species. J. of Bioelectromagnetics. 26: 548-557.
32. Salimi, SH., and Mahouri, Z. 2020. The effect of magnetic fields on the growth of *Lens esculinaris*. J. of biology. 1: 61-58. (In Persian)
33. Florez, M., Carbonell, M.V., and Martinez, E. 2007. Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: effects on germination and early growth. J. of Environmental and Experimental Botany. 59: 68-75.
34. Mohammadi, R., and Roshandel, P. 2020. Alternation of Growth, Phenolic Content, Antioxidant Enzymes and Capacity by Magnetic Field in *Hyssopus officinalis* under Water Deficit. International J. of Horticultural Science and Technology. 7: 2. 153-163.
35. Mohammadi, R., Roshandel, P., and Tadayon, A. 2019. The effects of magnetopriming on the growth, physiology and antioxidant systems in hyssop. Nova biologica reperta. 6: 106-115. (In Persian)
36. Danilov, V., Bas, T., Eltez, M., and Rizakulyeva, A. 1994. Artificial magnetic field effects on yield and quality of tomatoes. Acta Horticulturae. 366: 279-285.
37. Yano, A., Ohashi, Y., Hirasaki, T., and Fujiwara, K. 2004. Effects of a 60 Hz magnetic field on photosynthetic CO_2 uptake and early growth of radish seedlings. J. of Bioelectromagnetics. 25: 572–581.
38. Aukhez, S.T., and Beharry, G.K. 2001. Effects of magnetic field on growth and polyphenolic production in callus cultures of *Cassia fistula* L. Sciences and Technology Research J. 8: 13-27.
39. Alaei, B., Amiri Chayjan, R., and Sarikhani, H. 2020. The effect of static and dynamic magnetic fields on some chemical properties of *Pomegranate Arils*. Iranian J. of Biosystem Engineering. 50: 4. 823-831. (In Persian)
40. Hosseini, S., Rafiee Alhoseini, M., and Roshandel, Roshandel, P. 2019. The effect of magnetic field pretreatment on the growth and activity of antioxidant enzymes in *Guizotia abyssinica* under drought stress conditions. J. of Plant Process and Function. 7: 27. 219-235. (In Persian)
41. Moradipour, L., and Payamnoor, V. 1400. Effect of magnetic field as abiotic elicitor on growth and antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* mycelium, 3rd International Congress and 4th National Conference on Biotechnology of Medicinal Plants and Mountain Fungi (Virtual). Zanjan.
42. Alemán, E.I., Mbogholi, A., Boix, Y.F., González-Olmedo, J., and Chalfun-Junior, A. 2014. Effects of EMFs on some biological parameters in coffee plants (*Coffea arabica* L.) obtained by in vitro propagation. J. of Development. 8: 14.
43. Haghighat, N., Abdolmaleki, P., Ghanati, F., Behmanesh, M., and Payez, A. 2014. Modification of catalase and MAPK in *Vicia faba* cultivated in soil with high natural radioactivity and treated with a static magnetic field. J. of Plant Physiolgy. 171: 99-103.
44. Cakmak, T., Cakmak, Z.E., Dumlupinar, R., and Tekinay, T. 2012. Analysis of apoplastic and symplastic antioxidant system in shallot leaves: Impacts of weak static electric and magnetic field. J. of Plant Physiolgy. 169: 1066-1073.