



## Zinc oxide nanoparticles enhance metabolic and antioxidant properties in *Urtica dioica* L. callus

Farzaneh Abbasi Sardari<sup>1</sup>, Mohsen Mahmoodnia Meimand<sup>2\*</sup> and Mohammad Reza Dehghani<sup>3</sup>

1. M.Sc. graduate, Department of Genetics and Plant Production, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

2\*. Corresponding author, Department of Genetics and Plant Production, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran, E-mail: [m.mahmoodnia@vru.ac.ir](mailto:m.mahmoodnia@vru.ac.ir)

3. Department of Genetics and Plant Production, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Received: November 2024

Revised: May 2025

Accepted: May 2025

### Abstract

**Background and objectives:** *Urtica dioica* L. is a highly valued medicinal plant traditionally used to treat various diseases. Its extracts contain bioactive compounds such as flavonoids, leucoanthocyanidins, and carotene, contributing to its well-documented anticancer, antidiabetic, and antioxidant properties. Given the crucial role of elicitors in enhancing the production of plant secondary metabolites and improving medicinal quality, this study investigates the stimulatory effects of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on the biochemical and metabolic properties of *Urtica dioica* callus cultures.

**Methodology:** Nettle (*Urtica dioica*) seeds were cultured on half-strength Murashige and Skoog (½ MS) medium to obtain sterile seedlings. Internode explants from these seedlings were then excised and transferred to full-strength MS medium supplemented with 1 mg.l<sup>-1</sup> benzylaminopurine (BA) and 2.5 mg.l<sup>-1</sup> naphthaleneacetic acid (NAA) to induce callus formation. Cultures were maintained under a 16/8 h light/dark photoperiod at 24 °C. Homogeneous calli were obtained through successive subcultures. These calli were then transferred to liquid MS medium and treated with zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) at 0, 25, and 50 mg.l<sup>-1</sup> concentrations. Samples were collected at 12, 24, 48, and 96 hours post-treatment. Biochemical and metabolic parameters, including the activities of catalase (CAT), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), and phenylalanine ammonia lyase (PAL), as well as total protein, total phenolics, quercetin, and kaempferol contents, were measured. The experiment was arranged in a completely randomized design (CRD) using a factorial layout with two factors: ZnO-NP concentration and sampling time, each with three replications.

**Results:** The results showed that polyphenol oxidase (PPO) activity significantly increased 48 hours after ZnO-NP treatment, particularly at a concentration of 25 mg.l<sup>-1</sup>. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity peaked at 12 hours post-treatment at the same concentration (25 mg.l<sup>-1</sup>). Peroxidase (POD) activity increased only at 12 hours following treatment with 50 mg.l<sup>-1</sup> ZnO-NPs, while it declined under all other conditions. Catalase (CAT) activity was highest at 12 hours after ZnO-NP application at 25 mg.l<sup>-1</sup>. Total protein content increased at two distinct points: 24 hours after treatment with 25 mg.l<sup>-1</sup> and 96 hours after treatment with 50 mg.l<sup>-1</sup> ZnO-NPs.



Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (<http://ijmapr.areeo.ac.ir/>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed no detectable kaempferol at its expected retention time, while quercetin was detected. The highest quercetin accumulation occurred at 25 mg.l<sup>-1</sup> ZnO-NPs after 96 hours, and at 50 mg.l<sup>-1</sup> after 48 hours of treatment.

**Conclusion:** This study demonstrated that ZnO-NP elicitation enhanced the activities of key antioxidant and metabolic enzymes, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, and phenylalanine ammonia lyase, as well as increased total protein, total phenolic content, and quercetin accumulation in *Urtica dioica* callus cultures, depending on concentration and exposure time. These findings suggest that ZnO-NPs can serve as effective elicitors to boost the medicinal and metabolic potential of nettle in vitro. To translate these results into practical applications, further research is needed to optimize large-scale culture systems, such as bioreactors, for cost-effective production.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, flavonoid, quercetin, *Urtica dioica*, elicitor

## بهبود ویژگی‌های متابولیکی و آنتی‌اکسیدانی در کالوس گیاه گزنه (*Urtica dioica* L.) تحت تأثیر نانوذرات اکسید روی

فرزانه عباسی سرداری<sup>۱</sup>، محسن محمودنیا میمند<sup>۲\*</sup> و محمدرضا دهقانی<sup>۳</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران  
 ۲- \*استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران، پست الکترونیک: m.mahmoodnia@vru.ac.ir  
 ۳- استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۴

### چکیده

سابقه و هدف: گیاه گزنه از ارزشمندترین گیاهان دارویی است که برای مداوای بیماری‌های متعدد استفاده می‌شود. عصاره این گیاه شامل ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، لوکواتوسیانیدین، کاروتن و ... می‌باشد، از این رو خواص ضد سرطانی، ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه بر کسی پوشیده نیست. با توجه به نقش مهم محرک‌ها (الیستورها) در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی و کیفیت خصوصیات دارویی گیاهان، این پژوهش با هدف بررسی اثر نانوذرات اکسید روی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و متابولیکی در کشت کالوس گیاه گزنه انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا بذره‌های گزنه در محیط کشت MS ½ برای تولید گیاهچه استریل کشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های استریل جداسازی شد و برای تولید کالوس به محیط کشت MS حاوی هورمون (BA و NAA به ترتیب ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) منتقل و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت کالوس‌های همگن در پی واکشت‌های متوالی حاصل گردید. سپس کالوس‌ها به محیط کشت مایع منتقل شدند و اعمال تیمار با اضافه کردن نانوذرات اکسید روی با غلظت صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر انجام شد. نمونه‌برداری از کالوس‌ها در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از اعمال تیمار نانوذرات اکسید روی انجام شد. در نهایت ویژگی‌های بیوشیمیایی و متابولیکی (فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز و پروتئین و فنل کل و میزان کوئرستین و کامفرول) اندازه‌گیری و بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و براساس آزمایش فاکتوریل با سه تکرار انجام گردید.

نتایج: نتایج حکایت از این داشت که میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال نانوذره اکسید روی و در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی افزایش یافت و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال اکسید روی و در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش بود. پراکسیداز جزو آنزیم‌هایی بود که فقط در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی و در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال آن افزایشی و در بقیه تیمارها کاهش داشت. در آنزیم کاتالاز بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی و در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال اکسید روی ثبت شد. میزان پروتئین کل در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال نانوذره و غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی و در زمان ۹۶ ساعت و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی افزایش یافت. در محدوده زمانی خاص عبور کوئرستین و کامفرول در دستگاه HPLC برای کامفرول، جذب نمونه‌ای ثبت نشد اما در محدوده زمانی متعلق به کوئرستین جذب نمونه‌ها ثبت گردید و طبق آنالیز داده‌ها، بالاترین میزان تولید متابولیت کوئرستین در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی و در زمان نمونه‌برداری ۹۶ ساعت پس از اعمال نانوذره و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی و در زمان نمونه‌برداری ۴۸ ساعت بود.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش استفاده از محرک نانوذرات اکسید روی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز و میزان پروتئین کل در غلظت و زمان‌های مشخص شد. همچنین تولید فلاونوئید کوئرستین در

زمان‌ها و غلظت‌های معین تحت تأثیر مثبت نانوذرات اکسید روی قرار گرفت. بنابراین، براساس نتایج این پژوهش می‌توان استفاده از محرک نانوذرات اکسید روی را برای افزایش خصوصیات دارویی و متابولیکی در کشت‌های درون شیشه گزنه پیشنهاد داد. بدیهی است برای تولید اقتصادی، باید شرایط کشت در مقیاس بالا در بیوراکتورها بررسی و بهینه‌سازی شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فلاونوئید، کوئرستین، گزنه، محرک

## مقدمه

داروهای گیاهی سازگاری بسیار زیادی با بدن انسان دارند و نسبت به درمان‌های شیمیایی آسیب کمتری به ساختار بدن انسان وارد می‌کنند، از همین رو توجه بسیاری از درمانگرها را به خود جلب کرده‌اند. استفاده بی‌رویه از گیاهان برای مصارف دارویی، آنها را با خطر نابودی روبه‌رو کرده است. طبق تحقیقات ۱۵۰۰۰ نوع از این گیاهان در سرتاسر کره زمین در حال انقراض هستند و هر دو سال یک نوع از گیاهان دارویی به‌طور کامل از بین می‌روند. برای جلوگیری از نابودی پوشش گیاهی و منابع طبیعی خدادادی و جبران گونه‌های از دست رفته، باید تدبیری اندیشید (Khoshnazar, 2011).

گزنه (*Urtica dioica* L.) از خانواده گزنه (Urticaceae)، گیاهی علفی و چندساله بومی آمریکا، آسیا، اروپا به‌ویژه منطقه مدیترانه است. برگ‌های این گیاه حاوی کرک‌هایی است که بسیار گزنده می‌باشند (Jan et al., 2017) و یکی از گیاهانی است که از زمان‌های بسیار دور جزو درمانگرهای طبیعی بوده است، به‌طوری‌که جالینوس حکیم از آن در درمان مشکلات تنفسی برای بیماران خود استفاده می‌نموده است. عصاره این گیاه شامل ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، لوکوآنتوسیانیدین، کاروتن، گزانتوفیل، کلروفیل، استرول‌ها و تری‌ترین‌ها می‌باشد، از این رو خواص ضد سرطانی، ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه بر کسی پوشیده نیست. همچنین اطلاعاتی از نقش این گیاه در تنظیم آنزیم‌های کبدی به دست آمده است (Mouazenazadeh Khyavi et al., 2015).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی ترکیبات آلی شامل علف‌کش‌ها، عطرها، رنگ و طعم‌دهنده‌های طبیعی، سموم و

... هستند. برخی از این متابولیت‌ها به‌عنوان داروهای گیاهی استفاده می‌شوند. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی، آلکالوئیدها، تری‌نوئیدها و استروئیدها مهمترین خانواده از متابولیت‌های ثانویه هستند. دست پیدا کردن به این متابولیت‌ها از روش‌های معمول هم دشوار و هم خطر انقراض گیاهان دارویی را به همراه دارد، به همین دلیل پژوهشگران روش‌های نوینی از جمله کشت بافت گیاهی را پیشنهاد کرده‌اند. این روش بسیار کاربردی برای نجات گیاهانی است که با خطر انقراض روبه‌رو هستند (Ebrahimzadeh et al., 2021).

استفاده از روش‌های کشت بافت به همراه افزودن محرک‌ها (الیستورها) می‌تواند ظرفیت تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان را به‌طور چشمگیری افزایش دهد (Sood, 2020; Sarrafi et al., 2024). محرک‌ها با فعال کردن ژن‌های چند آنزیم، مسیر بیوسنتزی خاصی را راه‌اندازی می‌کنند که در نهایت منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. تأثیرگذارترین عامل بر افزایش این متابولیت‌ها، غلظت و زمان تیماردهی است (Angelova et al., 2006; Namdeo, 2007). یکی از محرک‌های مهم نانوذرات اکسید روی است. کوچک کردن مواد در مقیاس نانو باعث تغییر خصوصیات شیمیایی و فیزیکی و افزایش نفوذپذیری آنها در غشاء می‌شود (Mazaherinia et al., 2010). نانوذرات اکسید روی از نوع اکسیدهای فلزی بی‌خطر هستند که کمک شایانی به افزایش مقاومت گیاه در مقابل انواع تنش‌ها می‌کنند (Sing et al., 2023). این محرک نقش به‌سزایی در بالا بردن سرعت واکنش آنزیمی و افزایش تولید ترکیباتی مانند فلاونوئیدها از جمله روتین، کامفرول و کوئرستین دارد (Martens et al., 2010; Liu et al., 2012).

با توجه به اینکه گیاه گزنه از نظر دارویی بسیار ارزشمند

گیاهچه‌های استریل در محیط استریل (هود) جداسازی شد و پس از آن در محیط کشت MS حاوی هورمون BA و NAA (به ترتیب ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) برای القاء کالوس قرار داده شد (Sarraf et al., 2024). سپس کشت‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از القاء کالوس، ریزنمونه‌هایی که دارای کالوس بودند در محیط MS با همان ترکیب هورمونی قبلی واکشت گردیدند. برای دستیابی به کالوس‌های یکسان، عمل واکشت کالوس‌ها در محیط حاوی هورمون سه مرتبه انجام شد.

آماده‌سازی محلول مادری نانوذرات اکسید روی ابتدا ۵۰ میلی گرم نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) (ساخت شرکت US Research Nanomaterials با اندازه تقریبی هر کریستال ۳۰-۱۰ نانومتر و درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ و دانسیته  $5/606 \text{ g/cm}^3$ ) به چند قطره دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر به آرامی به آن اضافه گردید و بعد به مدت زمان ۲ ساعت در حمام اولتراسونیک ۷۵۰۰s پارسونیک (ساخت ایران) با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت تا نانوذرات به خوبی پخش شود.

#### اعمال تیمار و نمونه‌گیری

برای اعمال تیمار، ابتدا ۱/۵ گرم کالوس به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS هورمون‌دار (BA و NAA به ترتیب ۱ و ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) انتقال داده شد. سپس کشت‌ها در شیکرانکوباتور با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه نگهداری گردید. پس از گذشت هشت روز (اواخر فاز نمایی رشد سلولی گزنه در محیط کشت مایع)، اعمال تیمار با سه غلظت نانوذرات اکسید روی (صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر) و سه تکرار انجام شد. نمونه‌گیری از کشت‌های معلق کالوس در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از اعمال تیمار با ۳ تکرار انجام شد. نمونه‌ها به وسیله ازت مایع فریز و در فریزر

است و از سویی استفاده از روش کشت بافت برای حفظ گونه‌های گیاهی، روشی کارآمد می‌باشد و با توجه به اینکه تحقیقات اندکی در زمینه اثر محرک نانوذرات اکسید روی بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه کشت معلق کالوس گزنه انجام شده است؛ این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف محرک نانوذرات اکسید روی و زمان در معرض بودن با این محرک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید ترکیبات فلاونوئیدی در کشت معلق گیاه گزنه انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه محیط کشت MS و تولید گیاهچه استریل

ترکیبات معدنی و آلی برای تهیه محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، شامل نمک‌های عناصر کم مصرف و پرمصرف، ویتامین‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد، آهن، ساکارز و در نهایت آگار از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. برای آماده‌سازی یک لیتر از محیط کشت MS ۱/۲، ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر، آگار ۸ گرم در لیتر و غلظت نیمی از ترکیبات MS استفاده گردید.

برای تولید گیاهچه استریل، ابتدا بذره‌های گزنه ۲۴ ساعت در آب مقطر خیس شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفتند و بعد از آن در زیر هود لامینار ایرفلو به وسیله آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس بذرها در اتانول ۷۰ درصد برای ۳۰ ثانیه غوطه‌ور و در نهایت سه مرتبه به وسیله آب مقطر استریل و هر مرتبه به مدت ۱ دقیقه آبکشی شدند. بذره‌های استریل بر روی محیط کشت MS ۱/۲ قرار گرفتند. سپس محیط‌های کشت حاوی بذر به اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت نور ۳۰ میکرومول بر مترمربع تأمین شده از طریق لامپ‌های فلورسنت سفید) و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۴ درجه سلسیوس انتقال پیدا کردند. بعد از تولید گیاهچه‌های استریل، از آنها برای تهیه ریزنمونه و القاء کالوس استفاده شد.

#### القاء کالوس

ریزنمونه‌هایی با ابعاد یک سانتی‌متر از میانگروه

با دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا بررسی‌های بعدی نگهداری شدند (Sarraf et al., 2024).

تهیه عصاره از کالوس‌ها برای سنجش فعالیت آنزیمی

برای تهیه عصاره آنزیمی ۰/۲ گرم از نمونه کالوس منجمد را با کمک هاون در بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار با ۸/۸ pH= حاوی مرکاپتواتانول ۲ میلی‌مولار پودر کرده و بعد با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ نموده و بعد فاز رویی محلول برای سنجش پروتئین و فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جداسازی شد (Imam & Pirasteh Anoushe, 2014).

سنجش آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلیاز

اجزای واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلیاز شامل ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میلی‌لیتر بافر Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار با ۸/۸ pH=، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی و ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر بود. نمونه‌ها یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند، پس از آن واکنش با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ مولار متوقف گردید. فراورده آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلیاز (اسید سینامیک)، سه بار (هر بار ۲ میلی‌لیتر) به‌وسیله اتیل استات استخراج شد و بعد اجازه داده شد تا محلول رویی در جریان هوای استریل (هود) بخار شود. مقدار اسید سینامیک پس از حل کردن آن در NaOH ۰/۰۵ مولار، با طول موج ۲۹۰ نانومتر سنجش شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید سینامیک با غلظت‌های ۰ تا ۳۵ میکرومولار استفاده گردید (Dcunha et al., 1996).

سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز

اجزای واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شامل ۲ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۲ مولار با pH= ۶/۸ و ۰/۵ میلی‌لیتر پیروگالول ۰/۱۲ مولار بود. سپس محلول ذکرشده را ۱۰ دقیقه درون بن‌ماری با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده و پس از آن ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره

استخراجی اضافه و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر پس از گذشت یک دقیقه ثبت شد (Nicol et al., 2007).

سنجش آنزیم پراکسیداز

اجزای واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز شامل ۱/۹ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۶۰ میلی‌مولار با ۶/۱ pH=، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میلی‌لیتر گایاکول ۱۶۸ میلی‌مولار و در نهایت ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر و پس از گذشت یک دقیقه ثبت شد (Maehly & Chance, 1954).

سنجش آنزیم کاتالاز

اجزای واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز شامل ۲۳۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با ۶/۸ pH= و ۵۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار به همراه ۲۰۰ میکرولیتر عصاره بود. در پایان جذب نمونه‌ها به مدت ۶۰ ثانیه با طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت شد (Cakmak & Horst, 1991).

سنجش پروتئین کل

این سنجش با روش Bradford (۱۹۷۶) انجام شد. ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد را به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی اضافه نموده و پس از مخلوط شدن و نگهداری آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytic Jena) خوانده شد. از آلبومین سرم گاوی (BSA) در غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت عنوان استاندارد استفاده شد.

سنجش فنل کل

برای سنجش فنل کل، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره که شامل ۱۲۵ میکرولیتر عصاره استخراجی به همراه ۳۷۵ میکرولیتر

آشکارساز اشعه ماوراءبنفش برای اندازه‌گیری کامفرول و کوئرستین استفاده گردید. فاز متحرک شامل متانول: آب: اسید استیک: استونیتریل که با نسبت ۴۵: ۳۹: ۱: ۱۵ بود. قطر و ارتفاع فاز ثابت ستون Eurospher-100 C18 به ترتیب ۲/۵ و ۳۰ سانتی‌متر بود. طول موج مورد استفاده، ۲۵۷ نانومتر و میزان تزریق ۲۰ میکرولیتر بود (Zu et al., 2006). زمان گذر نمونه از ستون، ۱۲ دقیقه تعیین گردید و مقدار متابولیت نمونه‌ها توسط رابطه خط استاندارد محاسبه شد.

#### بررسی‌های آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت فاکتوریل (با ۳ تکرار) انجام شد. ترسیم نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام گردید. در نهایت مقایسه میانگین تیمارها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

#### نتایج

##### تولید کالوس

حدود یک هفته پس از کشت بذرها بر روی محیط کشت MS 1/2، بذرها جوانه زدند و پس از ۴ هفته گیاهچه‌های استریل به مرحله ۴ برگی رسیدند. دو هفته پس از کشت ریزنمونه‌های گیاهچه‌های استریل بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون (BA و NAA به ترتیب ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) القای کالوس انجام شد. پس از ۴ هفته کالوس‌های تولید شده در محیط کشت جدید (با همان ترکیب هورمونی ذکرشده) واکشت شدند. در نهایت بعد از ۳ مرتبه واکشت، کالوس‌های یکنواخت بدست آمد. کالوس‌ها برای اعمال تیمار به محیط کشت مایع منتقل شدند.

##### بررسی‌های بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس اثر محرک نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه‌برداری پس از افزودن محرک بر فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و

آب مقطر یا استاندارد اسید گالیک به همراه ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (Folin-ciocalteu) که با آب مقطر (با نسبت ۱ به ۱۰) رقیق شده اضافه گردید. بعد از گذشت ۵ دقیقه، میزان ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و بعد به مدت ۱/۵ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. در پایان جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر ثبت و میزان فنل کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Singleton et al., 1999). از اسید گالیک با غلظت ۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای استاندارد استفاده شد.

##### کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

ابتدا به‌وسیله آن ۱/۵ گرم کالوس به مدت زمان ۴۸ ساعت با دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شد. پس از آن، با ۲ میلی‌لیتر محلول متانول به همراه اسید استیک با نسبت ۹ به ۱ در هاون پودر گردید (Jaimand et al., 2010). عصاره‌های به دست آمده ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند، بعد از آن سانتریفوژ (۱۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰g) گردیدند. روش‌ناور به دست آمده جدا و فیلتر (فیلتر ۰/۲ میکرون) شد.

تهیه سری استاندارد متابولیت‌های کوئرستین و کامفرول و تعیین رابطه خط آن

ابتدا محلول پایه از متابولیت‌های کوئرستین و کامفرول (ساخت شرکت سیگما) با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس سری استاندارد آنها با غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با کمک متانول از محلول پایه ساخته شد. در نهایت با توجه به سطح زیر نمودار مربوط به هر غلظت که توسط دستگاه HPLC مشخص شد رابطه خط استاندارد به دست آمد و برای محاسبه متابولیت‌های نمونه‌های مجهول استفاده گردید.

اندازه‌گیری میزان کامفرول و کوئرستین به‌وسیله HPLC از دستگاه HPLC مدل Azura (شرکت Knauer) با

فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین کل معنی‌دار شد و اثر زمان نمونه‌گیری پس از اعمال محرک بر تمام صفات به غیر از فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز معنی‌دار گردید.

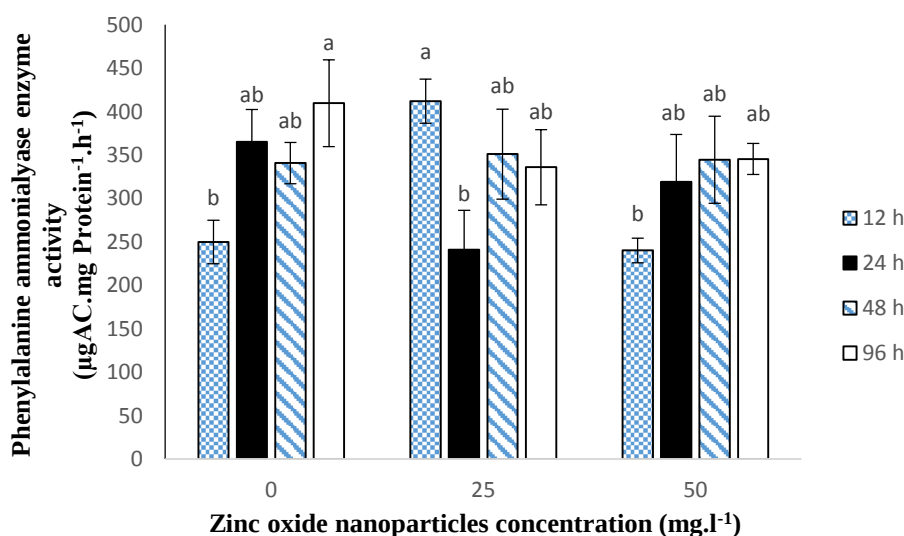
میزان پروتئین کل در (جدول ۱) نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل غلظت اکسید روی و زمان نمونه‌برداری بعد از اعمال محرک اکسید روی بر تمام صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. اثر غلظت محرک بر

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر محرک نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال محرک بر برخی صفات در کشت مایع کالوس گزنه

**Table 1. ANOVA of ZnO-NPs elicitor and sampling time after elicitor application effects on some traits in *Urtica dioica* callus liquid culture**

| S.O.V.                     | d.f | M.S.                        |                         |                       |                         |                         |                         |
|----------------------------|-----|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                            |     | Phenylalanine ammonia-lyase | Peroxidase              | Polyphenol oxidase    | Catalase                | Total protein           | Total phenol            |
| Elicitor concentration (E) | 2   | 2778.504 <sup>n.s</sup>     | 1.244×10 <sup>7**</sup> | 66.083 <sup>n.s</sup> | 483111.72 <sup>**</sup> | 1069.283 <sup>n.s</sup> | 344271.81 <sup>**</sup> |
| Exposure time (T)          | 3   | 8070.746 <sup>n.s</sup>     | 6.720×10 <sup>6**</sup> | 476.283 <sup>*</sup>  | 304198.03 <sup>**</sup> | 37990.73 <sup>**</sup>  | 62233.15 <sup>n.s</sup> |
| E × T                      | 6   | 13948.718 <sup>*</sup>      | 6.732×10 <sup>6**</sup> | 294.953 <sup>*</sup>  | 575985.61 <sup>**</sup> | 41235.86 <sup>**</sup>  | 460791.55 <sup>**</sup> |
| Experimental error         | 24  | 4570.654                    | 364704.036              | 100.254               | 23936.18                | 6305.311                | 47004.77                |
| C.V. (%)                   |     | 20.5                        | 26.38                   | 16.83                 | 30.46                   | 14.54                   | 26.52                   |

<sup>n.s</sup>, <sup>\*</sup>, and <sup>\*\*</sup>: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه‌برداری پس از اعمال آن بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز در کشت مایع کالوس گزنه

**Figure 1. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on phenylalanine ammonia-lyase activity in *Urtica dioica* callus liquid culture**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

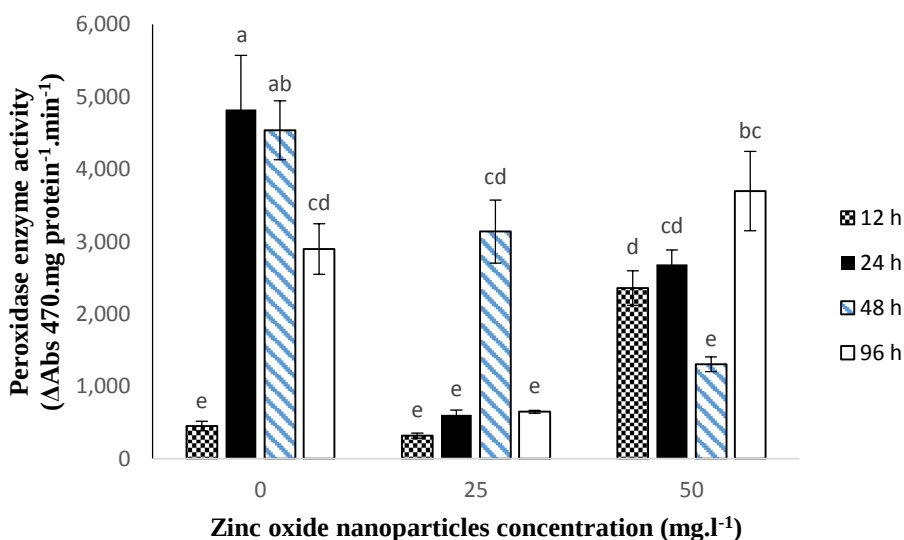


## فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

طبق جدول ۱ اثر نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه برداری، تأثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز نداشت اما اثر متقابل زمان نمونه برداری و غلظت نانوذره اکسید روی بر فعالیت این آنزیم در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بود. با مقایسه میانگین بین غلظت‌های مختلف در زمان نمونه برداری ۱۲ ساعت، مشخص شد که فعالیت این آنزیم در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره با غلظت صفر و ۵۰ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی دار داشت، به گونه‌ای که در تیمار ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی نسبت به دو غلظت دیگر فعالیت آنزیم افزایش یافت. البته در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت بین غلظت‌ها تفاوت معنی داری دیده نشد. در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر بیشترین فعالیت آنزیم در زمان نمونه برداری ۱۲ ساعت و کمترین فعالیت آنزیم در زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت اتفاق افتاد و در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی، کمترین فعالیت آنزیم در زمان ۱۲ ساعت بود و با گذشت زمان فعالیت آنزیم افزایش یافت (شکل ۱).

## فعالیت آنزیم پراکسیداز

طبق جدول ۱ اثر غلظت نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه برداری و اثر متقابل این دو بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۰/۰۱ معنی دار بوده است. با مقایسه میانگین اثر غلظت نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه برداری بعد از اعمال نانوذره بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، این نتیجه گیری حاصل شد که در زمان نمونه گیری ۱۲ ساعت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر اکسید روی افزایش یافت. در زمان نمونه گیری ۲۴ ساعت بین غلظت‌ها تفاوت معنی دار شد، به گونه‌ای که کمترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد و در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر میزان فعالیت آنزیم نسبت به غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت. در زمان نمونه برداری ۴۸ ساعت نیز تفاوت معنی دار شد و با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی فعالیت آنزیم کاهش یافت.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه برداری پس از اعمال آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در کشت مایع کالوس گزنه

Figure 2. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on peroxidase activity in *Urtica dioica* callus liquid culture

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

۲۵ میلی گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز افزایش یافت (شکل ۳).

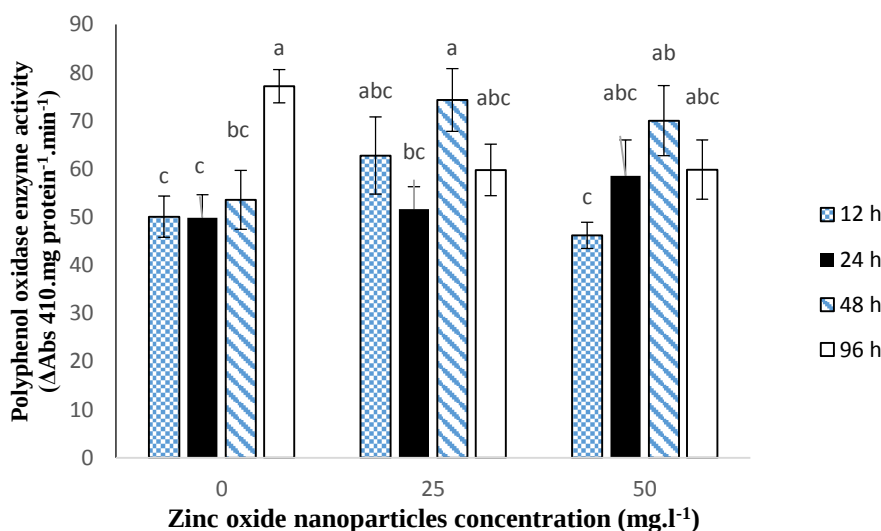
#### فعالیت آنزیم کاتالاز

طبق جدول ۱ اثر غلظت نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه برداری و اثر متقابل این دو بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۰/۰۱ معنی دار بوده است. با بررسی اثر غلظت نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه برداری بعد از اعمال نانوذره بر فعالیت آنزیم کاتالاز، چنین نتیجه گیری شد که در زمان ۱۲ ساعت بین غلظت صفر و ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی تفاوت معنی دار شد و افزایش چشمگیر فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر حاصل گردید. در زمان ۲۴ ساعت بین غلظت ۵۰ با صفر و ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره تفاوت معنی دار شد و فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره افزایش یافت.

در زمان نمونه برداری ۹۶ ساعت نیز بین غلظت صفر و ۲۵ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی دار بود و فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر کاهش یافت. در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر بیشترین فعالیت آنزیم، در زمان نمونه برداری ۴۸ ساعت اتفاق افتاد و بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر مربوط به زمان نمونه برداری ۹۶ ساعت بود (شکل ۲).

#### فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

طبق جدول ۱ اثر نانوذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بی معنی بوده است اما اثر زمان نمونه برداری و اثر متقابل زمان نمونه برداری و غلظت نانوذره در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در زمان نمونه برداری ۴۸ ساعت در بین غلظت صفر و ۲۵ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی دار داشت و با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی از صفر به غلظت

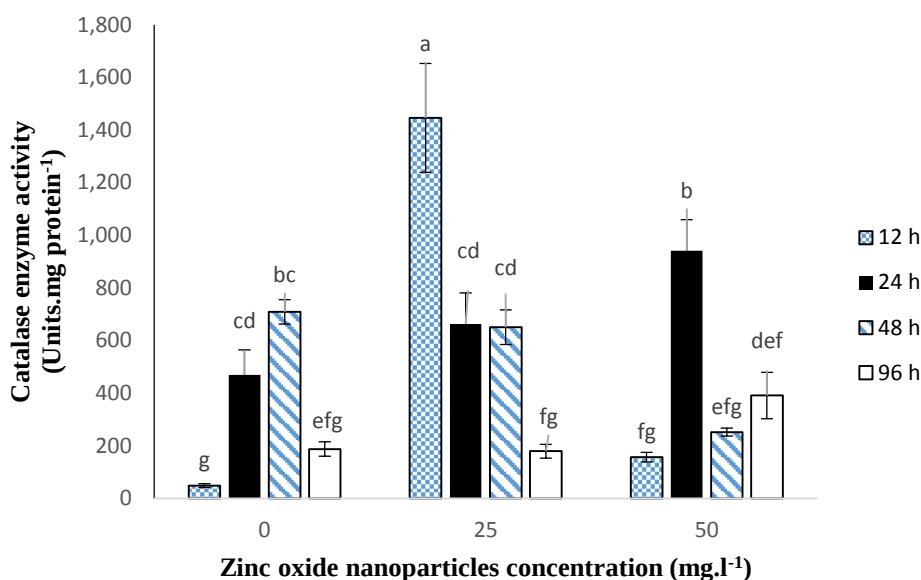


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه برداری پس از اعمال آن بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در کشت مایع کالوس گزنه

**Figure 3. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on polyphenol oxidase activity in *Urtica dioica* callus liquid culture**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی، بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به زمان نمونه برداری ۱۲ ساعت و در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت بود (شکل ۴).

در زمان ۴۸ ساعت بین غلظت ۵۰ با صفر و ۲۵ میلی گرم بر لیتر تفاوت معنی دار شد، به گونه ای که کاهش آنزیم در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر حاصل گردید و در زمان ۹۶ ساعت تفاوت بین غلظت ها بی معنی بود.

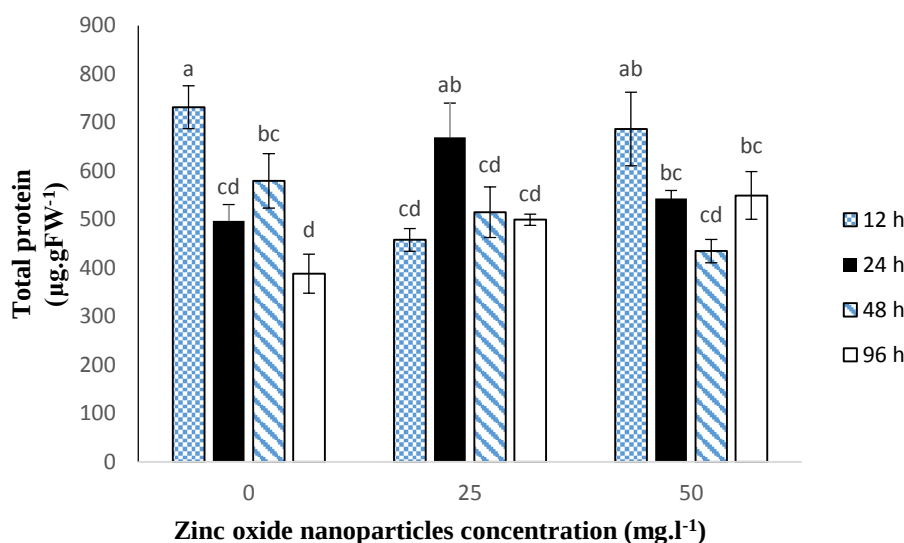


شکل ۴- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه برداری پس از اعمال آن بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کشت مایع کالوس گزنه

**Figure 4. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on catalase activity in *Urtica dioica* callus liquid culture**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

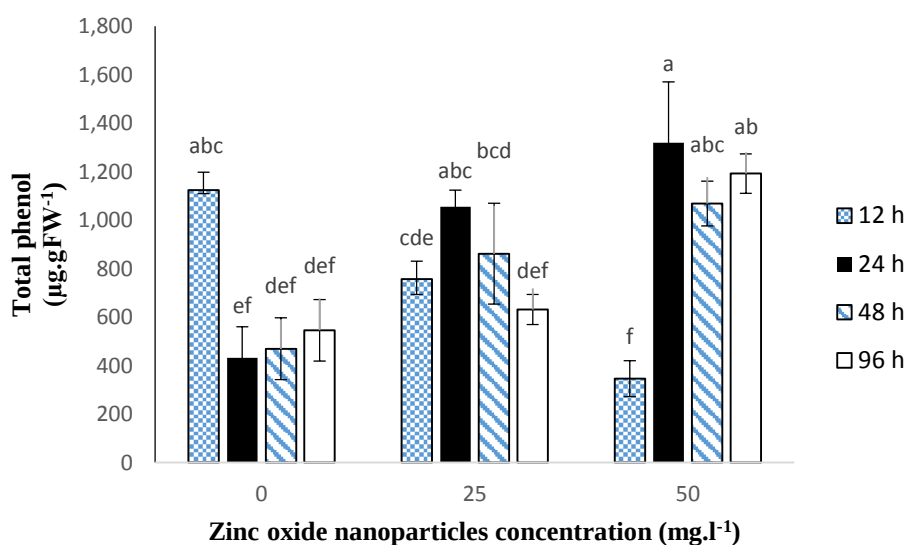
نسبت به دو غلظت دیگر کاهش یافت اما در زمان نمونه برداری ۲۴ ساعت بیشترین میزان پروتئین کل در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی اتفاق افتاد. در ۴۸ ساعت تفاوت بین غلظت های اکسید روی بی معنی بود و در ۹۶ ساعت بین غلظت صفر و ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره تفاوت معنی دار شد، به گونه ای که افزایش میزان پروتئین در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی حاصل شد.

محتوای پروتئین کل  
طبق جدول ۱ اثر غلظت نانوذرات اکسید روی بر محتوای پروتئین کل معنی دار نبود اما اثر زمان نمونه برداری و اثر متقابل زمان نمونه برداری با غلظت نانوذره اکسید روی در سطح ۰/۰۱ معنی دار شد. مطابق شکل ۵ مقایسه میانگین تیمارها در زمان نمونه برداری ۱۲ ساعت تفاوت معنی داری بین غلظت های مختلف نانوذره اکسید روی نشان داد و میزان پروتئین کل در غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه‌برداری پس از اعمال آن بر پروتئین کل در کشت مایع کالوس گزنه

**Figure 5. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on total protein in *Urtica dioica* callus liquid culture**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه‌برداری پس از اعمال آن بر محتوای فنل کل در کشت مایع کالوس گزنه

**Figure 6. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on total phenols in *Urtica dioica* callus liquid culture**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

## محتوای فنل کل

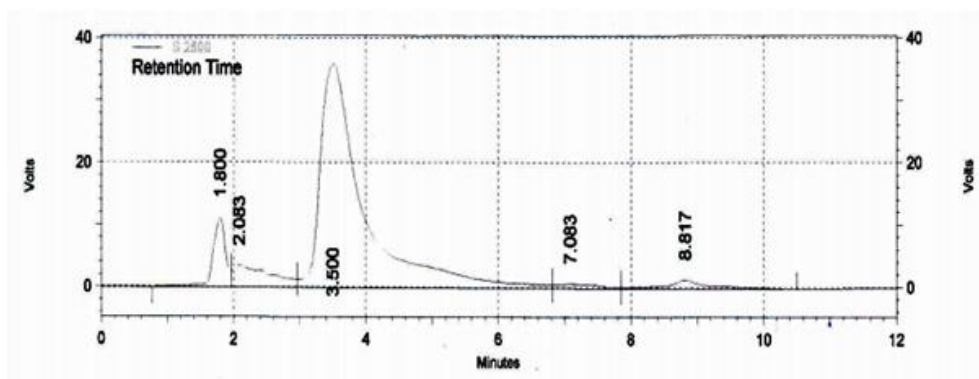
براساس نتایج تجزیه واریانس، اثر غلظت نانوذره اکسید روی و اثر متقابل غلظت و زمان نمونه برداری با احتمال یک درصد معنی دار شد. با مقایسه میانگین اثر غلظت نانوذرات اکسید روی بر محتوای فنل کل، در زمان ۱۲ ساعت بین غلظت ۵۰ با ۲۵ و صفر تفاوت معنی دار شد و با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی، میزان فنل کل کاهش یافت. در زمان ۲۴ ساعت تفاوت بین غلظت صفر با دو غلظت دیگر معنی دار بود و افزایش فنل کل در غلظت های ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره حاصل شد و در زمان ۴۸ ساعت میزان فنل کل در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت و در زمان ۹۶ ساعت تفاوت معنی دار بین غلظت صفر و ۲۵ (افزایش میزان فنل در غلظت ۲۵) حاصل گردید. به طور کلی می توان نتیجه گرفت به غیر از زمان

نمونه برداری ۱۲ ساعت، در بقیه زمان های نمونه برداری با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی میزان فنل کل نیز افزایش یافت (شکل ۶).

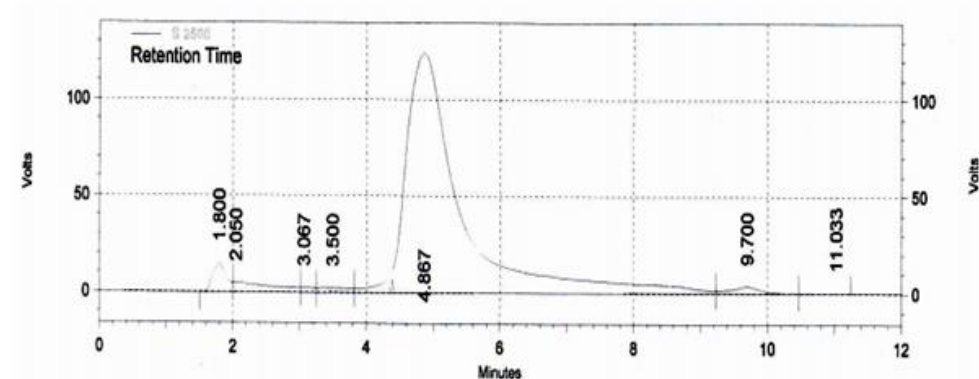
## محتوی کوئرستین و کامفرول

محتوی فلاونوئید کوئرستین و کامفرول موجود در کالوس گزنه تیمار شده با نانوذرات اکسید روی بوسیله HPLC اندازه گیری شد. ابتدا براساس نمودارهای مجموعه استاندارد، زمان عبور (Retention time) کوئرستین و کامفرول به ترتیب ۳/۵۰ و ۴/۸۶۷ دقیقه تعیین شد (شکل ۷)، سپس منحنی استاندارد فلاونوئیدهای مذکور ترسیم و رابطه خط آن تعیین گردید.

A)



B)



شکل ۷- کروماتوگرام زمان عبور متابولیت های (A) کوئرستین و (B) کامفرول

Figure 7. A) Quercetin and B) kaempferol retention time chromatograms

متقابل زمان نمونه‌برداری با غلظت نانوذره اکسید روی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شد. به‌طوری‌که اثر زمان نمونه‌برداری بعد از اعمال اکسید روی بر تولید متابولیت کوئرستین نیز در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار شد.

در محدوده زمانی مشخص شده (زمان عبور) برای فلاونوئید کامفرول، در عصاره کالوس جذبی ثبت نشد اما در محدوده زمانی متعلق به فلاونوئید کوئرستین جذب نمونه‌ها ثبت گردید. طبق جدول ۲ اثر نانوذرات اکسید روی و اثر

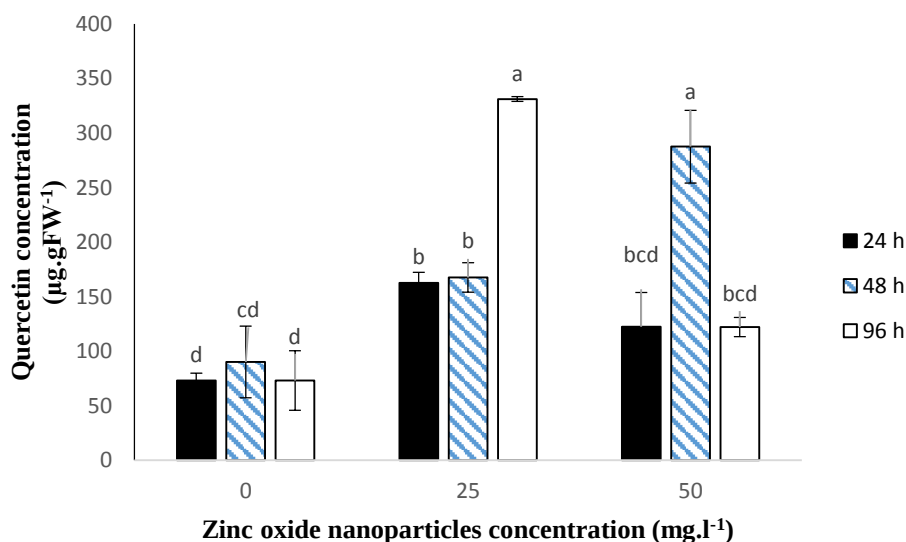
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر محرک نانوذرات اکسید روی و زمان نمونه‌برداری پس از اعمال محرک بر تولید متابولیت کوئرستین در

کشت مایع کالوس گزنه

**Table 2. ANOVA of ZnO-NPs elicitor and sampling time after elicitor application effects on quercetin production in *Urtica dioica* callus liquid culture**

| S.O.V.                     | d.f. | M.S.        |
|----------------------------|------|-------------|
|                            |      | Quercetin   |
| Elicitor concentration (E) | 2    | 31692.416** |
| Exposure time (T)          | 2    | 7083.385*   |
| E × T                      | 4    | 14859.76**  |
| Experimental error         | 9    | 961.986     |
| C.V. (%)                   |      | 19.52       |

\* and \*\*: significant at 5 and 1% probability levels, respectively.



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر محرک نانوذرات اکسید روی × زمان نمونه‌برداری پس از اعمال آن بر غلظت کوئرستین در کشت مایع کالوس گزنه

**Figure 8. Means comparison of ZnO-NPs elicitor × sampling time after elicitor application interaction on quercetin concentration in *Urtica dioica* callus liquid culture**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).

۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی میزان کوئرستین افزایش یافت (افزایش ۲/۲۲ برابری). در زمان نمونه‌برداری

طبق شکل ۸ در زمان ۲۴ ساعت بین غلظت صفر و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر اکسید روی تفاوت معنی‌دار شد و در غلظت

گیاهان دارد و برای فعالیت‌های آنزیمی ضروریست. گزارش‌ها درباره اثرهای نانوذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیمی متغیر است. این تنوع می‌تواند وابسته به نوع گونه گیاهی، نحوه اعمال نانوذرات و از همه مهمتر زمان در معرض قرار گرفتن با نانوذره باشد (Salehi et al., 2019).

نتایج پژوهشی که به بررسی تأثیر غلظت‌های صفر، ۱۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محرک ZnO-NPs بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز بر روی عصاره کالوس انار پرداخت، حکایت از افزایش فعالیت این آنزیم در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی داشت؛ به‌طوری‌که فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز در غلظت ۱۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی در مقایسه با شاهد به ترتیب به میزان ۴۹/۸۲ و ۵۶/۹۵ درصد افزایش یافت (Farghaly et al., 2020). در این پژوهش نیز با افزودن نانوذرات اکسید روی با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر و در زمان نمونه‌برداری ۱۲ ساعت میزان فعالیت آنزیم به میزان ۶۴/۸ درصد افزایش یافت. افزایش جذب روی توسط سلول که توسط نانوذرات اکسید روی اتفاق می‌افتد، می‌تواند بر ازدیاد فعالیت برخی آنزیم‌ها، ازجمله PAL مؤثر باشد. یادآوری می‌شود که واکنش گیاه به نانوذرات می‌تواند به غلظت نانوذره و شرایط محیطی بستگی داشته باشد.

در یک پژوهش تأثیر نانوذرات اکسید روی نسبت به فرم توده‌ای آن بر روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و بیان ژن پراکسیداز در گیاهچه‌های از مک انجام شد، نتایج نشان داد که آنزیم پراکسیداز بعد از تیمار با نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به شاهد افزایش یافت ولی بیان ژن پراکسیداز مانند شاهد بود (Riahi et al., 2019). دلیل افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند این باشد که نانوذرات اکسید روی باعث تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه می‌شوند، این حالت معمولاً به‌عنوان پاسخی به یک عامل استرس‌زا ایجاد می‌شود و منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی ازجمله پراکسیداز می‌گردد.

پژوهشی در مورد تأثیر نانوذرات اکسید روی بر مقدار

۴۸ ساعت میزان تولید کوئرستین در بین غلظت‌های مختلف اکسید روی تفاوت معنی‌دار داشت و با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی بر مقدار تولید کوئرستین نیز افزوده شد، به‌طوری‌که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی نسبت به غلظت صفر و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب افزایش ۳/۱۹ و ۱/۷۲ برابری در میزان تولید متابولیت کوئرستین اتفاق افتاد. در زمان نمونه‌برداری ۹۶ ساعت بین غلظت ۲۵ با صفر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره تفاوت معنی‌دار شد، به گونه‌ای که بیشترین میزان تولید کوئرستین در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی اتفاق افتاد و میزان تولید کوئرستین در این غلظت نسبت به صفر و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب ۴/۵۳ و ۲/۷۱ برابر افزایش یافت.

## بحث

عنصر روی یک ماده معدنی ضروری و مورد نیاز برای گیاهان است. آنزیم‌های مختلفی شناسایی شده‌اند که برای انجام فعالیت و عملکرد طبیعی خود نیاز به عنصر روی دارند. عنصر روی قسمتی از سیستم آنتی‌اکسیدانی است، بنابراین کمبود آن باعث اختلال در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و افزایش تنش اکسیداتیو می‌شود. تنش اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (شامل آنیون سوپراکسید، رادیکال آزاد هیدروکسیل، هیدروژن پراکسید و ...) از یکسو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌گردد. گیاهان، برای مقابله با رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، از سازوکارهای دفاعی استفاده می‌کنند تا اثرهای زیان‌بار این تنش‌ها را خنثی نموده یا به حداقل برسانند. برخی از اجزای سیستم دفاعی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (فنیل‌آلانین آمونیلایز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز، کاتالاز و ...) هستند و برخی دیگر از اجزای این سیستم، آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (ترکیبات فنلی، ویتامین‌ها، متابولیت‌های ثانویه و ...) است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با توجه به نوع نانوذرات و غلظت آنها متفاوت است. روی در شکل نانو نقش مهمی در رشد و تکوین

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در گیاه گلرنگ انجام شد و نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی سبب افزایش چشمگیر این آنزیم شد و بقیه تیمارها باعث کاهش فعالیت آنزیم شدند (Alizadeh et al., 2015). حضور نانوذرات در غلظت‌های خاص (سمی) ممکن است به افزایش تولید ROS منجر شود. این مولکول‌ها می‌توانند سیگنال‌دهی برای فعال‌سازی مسیرهای دفاعی گیاهان را تحریک کنند که یکی از پیامدهای آن افزایش فعالیت PPO برای کاهش آسیب‌های اکسیداتیو است. از این رو در آزمایش‌های ذکر شده و این آزمایش میزان این آنزیم در بعضی غلظت‌ها افزایش یافت. توجه به این نکته ضروری است که در گیاهان گوناگون براساس شرایط آزمایشی این تغییرات متغیر است. طبق تحقیقی که بر روی تأثیر نانوذرات اکسید روی بر پاسخ‌های بیوشیمیایی جو بهاره انجام گردید، نتیجه گرفته شد که غلظت‌های مشخص این تیمار سبب افزایش تنش اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (Voloshina et al., 2022). در این پژوهش نیز آنزیم کاتالاز در زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت در بعضی غلظت‌ها افزایش یافت.

در آزمایشی که اثر محرک نانوذره اکسید روی با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی تغییرات بیوشیمیایی و بعضی از پارامترهای رشد لوبیا بررسی شد، مشخص گردید که میزان پروتئین کل تیمار نانوذره اکسید روی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت اما نوار پروتئینی ۲۸ کیلو دالتونی در تیمار نانوذره اکسید روی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به شاهد پدیدار شد (Salehi et al., 2019). در یک پژوهش اثر نانوذرات اکسید روی بر رشد و نمو و فاکتورهای بیوشیمیایی کالوس گیاه *Delonix elata* بررسی شد. اضافه کردن ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر از این محرک به محیط MS سبب بالاترین وزن تر کالوس، فنل کل و فلاونوئید در مقایسه با نمونه شاهد شد. در آزمایشی که بر روی کالوس گیاه اسفند رومی *Fagonia indica* تیمار شده با نانوذرات اکسید روی و آهن Fe-ZnO-NPs انجام شد، حداکثر محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در کالوس ۴۰ روزه تیمار شده با ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر

Fe-ZnO-NPs مشاهده شد (Khan et al., 2021). پژوهشی در مورد اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای فنل و فلاونوئید *Capsicum annuum* L. انجام شد، نتایج حکایت از این داشت که نانوذره مذکور باعث افزایش و تجمع ترکیبات فنلی در این گیاه شد (Garcia-Lopez et al., 2018). طبق مقایسه پژوهش‌های انجام شده با این پژوهش، این طور استنباط شد که افزودن غلظتی از محرک نانوذره سبب افزایش فنل کل می‌شود اما در این پژوهش این افزایش تا محدوده زمانی مشخصی رخ داد و در نهایت متوقف شد. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) نشان‌دهنده افزایش قابل توجه در میزان اسید گالیک، کوئرستین، هسپریدین و روتین در کلیه تیمارهای نانوذرات اکسید روی در مقایسه با نمونه شاهد در کالوس *Delonix elata* بود (Tarroum et al., 2023) که در این پژوهش نیز با افزودن محرک نانوذرات اکسید روی متابولیت کوئرستین افزایش یافت. بیشترین تولید این متابولیت در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره و زمان نمونه‌برداری ۹۶ ساعت و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و زمان نمونه‌برداری ۴۸ ساعت بعد از اعمال محرک بود.

با مقایسه پژوهش‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید روی به دلیل خصوصیات شیمیایی و فیزیکی منحصر به فرد خود و افزایش نفوذپذیری در غشاء می‌تواند به عنوان کاتالیزورهای مؤثر در فرایندهای آنزیمی عمل کند. این نانوذرات قادرند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند، زیرا با افزایش تعامل آنها با آنزیم‌ها، فرایندهای آنتی‌اکسیدانی بهبود می‌یابد. به علاوه، نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های بالا می‌توانند به عنوان منشأ اکسیژن فعال در فرایندهای آنتی‌اکسیدانی عمل کنند و باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و ... شوند. این ویژگی‌ها باعث می‌شود که نانوذرات اکسید روی به عنوان یک عامل سازنده و مؤثر در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شناخته شوند. در نهایت با توجه به نتایج این تحقیق و پژوهش‌های مشابه، می‌توان از محرک نانوذرات اکسید روی به عنوان محرکی برای افزایش خصوصیات دارویی (فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و



روی، نیاز به مطالعات و بررسی‌ها در مقیاس بالای کشت سلولی در بیوراکتورها و تعیین عوامل مؤثر بر آن می‌باشد.

افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های درون شیشه گیاه گزنه نام برد. بدیهی است برای تولید تجاری زیست ماده (کالوس و سلول گزنه) و استفاده از محرک نانوذره اکسید

## References

- Angelova, Z., Georgiev, S. and Roos, W., 2006. Elicitation of plants. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 20(2): 72-83. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>
- Alizadeh, N., Majd, A., Mahmoudzadeh, H. and South, P., 2015. Investigating the effect of zinc oxide nanoparticles on some biochemical characteristics of safflower plant (*Carthamus tinctorius* L.), 2nd National Conference on Medicinal Plants, Traditional Medicine and Organic Agriculture, Permanent Secretariat of the Conference, Hamedan, 27 August. (In Persian)
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cakmak, I. and Horst, J.H., 1991. Effects of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine Max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Dcunha, G.B., Satyanarayan, V. and Madhusudanan Nair, P., 1996. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 42:17-20. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00914-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00914-0)
- Ebrahimzadeh, L., Ebrahimi, J. and Darvishi, Sh., 2021. A review of secondary metabolites and their biosynthesis pathways, the 4th International Conference of Interdisciplinary Studies in Food Industry and Nutritional Sciences of Iran, Center for Development and Expansion of Interdisciplinary Studies, Tehran, 22 July: 1-11. (In Persian)
- Farghaly, F.A., Radi, A.A., Al-Kahtany, F.A. and Hamada, A.M., 2020. Impacts of zinc oxide nano and bulk particles on redox-enzymes of the *Punica granatum* callus. *Sciences Report*, 10: 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76664-4>
- Garcia-Lopez, J.I., Zavala-Garcia, F., Olivares-Saenz, E., Lira-Saldivar, R.H., Diaz Barriga-Castro, E., Ruiz-Torres, N.A., Ramos-Cortez, E., Vazquez-Alvarado, R. and Nino-Medina, G., 2018. Zinc oxide nanoparticles boosts phenolic compounds and antioxidant activity of *Capsicum annuum* L. during Germination. *Agronomy*, 8(10): 1-13. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100215>
- Imam, Y. and Pirasteh Anoushe, H., 2014. Field and laboratory methods in agricultural sciences. Mashhad University Press, Mashhad, 108 pages. (In Persian)
- Jan, K.N., zarafshan, K. and Singh, S., 2017. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Food Measure* 11: 423-433. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9410-4>
- Jaimand, K., Rezaee, M., Asareh, M., Tabaei Aghdaei, S. and Meshkizadeh, S., 2010. 'Extraction and determination of Kaempferol and Quercetin in petals of 10 genotypes of *Rosa damascena* Mill. from western Iran', *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 25(4): 547-555. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2010.7140>
- Khan, A.U., Khan, T., Khan, M.A., Nadhman, A., Aasim, M., Khan, N.Z., Ali, W., Nazir, N. and Zahoor, M., 2021. Iron-doped zinc oxide nanoparticles-triggered elicitation of important phenolic compounds in cell cultures of *Fagonia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147: 287-296. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02123-1>
- Khoshnazar Porshokohi, R., 2011. Medicinal plants, natural heritage at risk. National Conference of Medicinal Plants, Mazandaran Academic Jihad, Sari, 2 March: 1-10. (In Persian)
- Liu, X.J., Chuang, Y.N., Chiou, C.Y., Chin, D.C., Shen, F.Q. and Yeh, K.W., 2012. Methylation effect on chalcone synthase gene expression determines anthocyanin pigmentation in floral tissues of two *Oncidium orchid* cultivars. *Planta*, 236(2): 401-409. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1616-z>
- Maehly, A.C. and Chance, B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochemical Analaysis*, 1: 357-424.
- Martens, S., Preuss, A. and Matern, U., 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry*, 71(10): 1040-1049. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.016>
- Mouazenzadeh Khayawi, A., Iqbal, H., Jafari, R. and Arbabi, A., 2015. Identifying and investigating the components of the essential oil and extract of the

- medicinal plant *Urtica dioica* and its pharmacological effects. The first international conference and the fourth national conference on medicinal plants and sustainable agriculture, Permanent Conference Secretariat, Hamedan, 17 December. (In Persian)
- Namdeo, A., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 69-79.
  - Nicoli, M., Elizalde, B., Pitotti, A. and Lerici, C., 1991. Effect of sugars and Maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity. *Journal of Food Biochemistry*, 15: 169-184. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1991.tb00153.x>
  - Riahi Madvar, A., Ghazizadeh Ahsaei, M., Jadid Bonyad, F. and Nasirifar, E., 2019. Investigation of nano-and bulk ZnO particles effects on genes expression level of peroxidase and  $\Delta$  1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and peroxidase activity and proline content in *Lepidium draba* seedlings. *Journal of Cell & Tissue*, 10(2): 118-132. <https://doi.org/10.52547/JCT.10.2.118>
  - Salehi, H., Chehregani Rad, A., Majd, A. and Gholami, M., 2019. Effect of ZnO and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the element accumulation, growth and biochemical parameters in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Research*, 32(2): 390-405. <https://doi.org/10.1001.1.23832592.1398.32.2.17.2>
  - Sarrafi, M., Mahmoodnia Meimand, M., Dahajipour Heidarabadi, M. and Dehghni, M.R. 2024. Optimization of nettle (*Urtica dioica* L.) callogenesis and the effect of methyl jasmonate elicitor on biochemical properties of callus. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 40(2): 331-351. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2023.363123.3353>
  - Singh, A., Sengar, R.S., Shahi, U.P., Rajput, V.D., Minkina, T. and Ghazaryan, K.A., 2023. Prominent effects of zinc oxide nanoparticles on roots of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity stress. *Stresses*, 3(1):33-46. <https://doi.org/10.3390/stresses3010004>
  - Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
  - Sood, H., 2020. Production of medicinal compounds from endangered and commercially important medicinal plants through cell and tissue culture technology for herbal industry. In: Sharma, K., Mishra, K., Kamal Senapati, K., Danciu, C., (Eds.). *Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health*. IntechOpen, United Kingdom, 358p.
  - Tarroum, M., Alfarraj, N.S., Al-Qurainy, F., Al-Hashimi, A., Khan, S., Nadeem, M., Salih, A.M. and Shaikhaldein, H.O., 2023. Improving the production of secondary metabolites via the application of biogenic zinc oxide nanoparticles in the calli of *Delonix elata*: A potential medicinal plant. *Metabolites*, 13:1-19. <https://doi.org/10.3390/metabo13080905>
  - Voloshina, M., Rajput, V.D., Minkina, T., Vechkanov, E., Mandzhieva, S., Mazarji, M., Churyukina, E., Plotnikov, A., Krepakova, M. and Wong, M.H., 2022. Zinc Oxide Nanoparticles: Physiological and Biochemical Responses in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plants*, 11(20):1-15. <https://doi.org/10.3390/plants11202759>
  - Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C., 2006. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 714-719. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.052>