

Effect of ZnO NPs on germination, seedling growth and secondary metabolites of *Mellisa officinalis* L. in *in vitro* cultureMaryam Dahajipour Heidarabadi*¹, Fatemeh Mortzaei¹, Mohsen Mahmoodnia Meimand¹

1. Department of Genetics and Plant Production, Agriculture College, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

*Corresponding Author Email: m.dahaji@vru.ac.ir

Abstract

Introduction: The use of nanotechnology has an important role in improving plant growth, photosynthesis, and yield in agriculture. The human has been interested in therapeutic effects of secondary metabolites of medicinal plants such as flavonoids, phenolic acids, alkaloids, and carotenoids. The use of abiotic elicitors is one of the strategies used to increase the production of secondary metabolites in medicinal plants. In recent years, the use of nanoparticles as a new elicitor to increase secondary metabolites has been proposed. Nanoparticles cause changes in primary and secondary metabolism in medicinal plants based on application, concentration, and size. Therefore, in this study the effects of different concentrations of zinc oxide nanoparticles in *in vitro* culture on germination, seedling growth, and production phenolic compounds and rosmarinic acid of lemon balm were investigated.

Materials and Methods: In order to investigate the effect of replacing the zinc source in the culture medium with zinc oxide nanoparticles, an experiment was conducted *in vitro* in a completely randomized design with three repetitions. After preparation of zinc oxide nanoparticles using an ultrasonic bath, they were added to MS culture medium. The sterilized seeds were transferred to culture media containing different concentrations of zinc oxide nanoparticles (at concentrations of 0 as the control, 0.016, 0.08 and 0.4 mg/L) and then placed in growth chambers with a photoperiod of 16 light/8 darkness at 25°C. At the end of the experiment, the germination percentage, growth parameters, photosynthetic pigments, phenylalanine ammonia-lyase enzyme activity, phenol and rosmarinic acid contents were measured under the influence of different concentrations of zinc oxide nanoparticles treatments. Statistical analysis of the data was performed, and upon observing a significant difference in analysis of variance, comparison of means was performed using Duncan's test at a probability level of 5%.

Results: Based on the results of this research, the presence of zinc oxide nanoparticles in the medium reduced the germination percentage compared with the control. The highest reduction (50%) was observed in the treatment with a concentration of 0.016 mg/L of zinc oxide nanoparticles. The radicle length in plants grown in the medium containing zinc oxide nanoparticles increased by 3 to 5 times compared with the control. The dry weight of the radicle, plumule and seedling also increased by 1.5 to 2 times in the presence of zinc oxide nanoparticles compared with the control. The amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids increased by 1.5 to 2 times in the treatments with zinc oxide nanoparticles of concentrations of 0.08 and 0.4 mg/L compared with the control. The increase in the activity of phenylalanine ammonia-lyase enzyme, the amount of phenolic compounds and rosmarinic acid in the treatments with zinc oxide nanoparticles compared with the control was significant. The greatest increase in phenylalanine ammonia-lyase enzyme activity, phenolic compounds, and rosmarinic acid was observed in the treatment with zinc oxide nanoparticles at a concentration of 0.08 mg/L.

Conclusion: In recent years, nanoparticles have been used as a new elicitor to increase growth and secondary metabolites in medicinal plants. According to the results of this study, an increase in growth and the amount of photosynthetic pigments and, secondary metabolites was observed in the presence of zinc oxide nanoparticles at concentrations much lower than the concentration of zinc element in MS culture medium. The increase in the amounts of phenolic compounds and rosmarinic acid was consistent with an increase in the activity of the phenylalanine ammonia-lyase enzyme under the influence of zinc oxide nanoparticles in *in vitro* culture of lemon balm. Finally, the use of zinc oxide nanoparticles as an effective strategy to improve primary and secondary metabolism in lemon balm can be recommended.

Keywords: Growth, *In vitro* culture, Lamiaceae, Rosmarinic acid, Zn oxide nanoparticles**Received:** 25-02-2026**Accepted:** 16-03-2026

Citation: Dahajipour Heidarabadi, M., Mortzaei, F., & Mahmoodnia Meimand, M. (2026). Effect of ZnO NPs on germination, seedling growth and secondary metabolites of *Mellisa officinalis* L. in *in vitro* culture. *Plant Production and Genetics*, 7(1),93-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.22034/PLANT.2001.145333.1195>

Copyrights:

Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article 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 work is properly cited.



تولید و ژنتیک گیاهی

<https://doi.org/10.22034/PLANT.2001.145333.1195>

تأثیر نانوذرات اکسید روی بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ای و متابولیت‌های ثانویه بادرنجبویه

(*Mellisa officinalis* L.) در کشت درون شیشه‌ای

مریم دهجی‌پور حیدرآبادی^{*}، فاطمه مرتضائی^۱، محسن محمودنیا میمند^۱

۱. گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: m.dahaji@vru.ac.ir

چکیده

مقدمه: استفاده از فن‌آوری نانو در کشاورزی نقش مهمی در بهبود رشد، فتوسنتز و عملکرد گیاهان ایفا کرده است. اثرات درمانی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند آلکالوئیدها، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها مورد توجه بشر بوده است. استفاده از محرک‌های غیرزیستی، یکی از روش‌های به‌کار گرفته شده برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی است. در سال‌های اخیر کاربرد نانوذرات به‌عنوان یک محرک مؤثر، جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه، مطرح شده است. نانوذرات براساس نحوه کاربرد، غلظت و اندازه، متابولیسم اولیه و ثانویه را در گیاهان دارویی تحت تأثیر قرار می‌دهند. لذا، در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ای، تولید ترکیبات فنلی و اسید زمارینیک در کشت درون شیشه‌ای بادرنجبویه بررسی شد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی تأثیر جایگزینی منبع روی در محیط کشت با نانوذرات اکسید روی آزمایشی به‌صورت کشت درون شیشه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. اضافه نمودن نانوذرات اکسید روی به محیط کشت MS بعد از آماده‌سازی آن‌ها با استفاده از حمام فراصوت انجام شد. بذره‌های بادرنجبویه پس از ضدعفونی سطحی به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (صفر به‌عنوان شاهد، ۰/۱۶، ۰/۰۸، ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر) انتقال و سپس محیط‌های کشت در اتاقک‌های رشد با شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۲۵°C قرار داده شدند. پس از پایان دوره آزمایش درصد جوانه‌زنی، پارامترهای رشد، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، میزان فنل و میزان اسیدزمارینیک تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی اندازه‌گیری شد. پس از انجام تجزیه آماری داده‌ها و مشاهده تفاوت معنی‌دار در تجزیه واریانس، با استفاده از آزمون دانکن مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ صورت گرفت.

نتایج: براساس نتایج این پژوهش، درصد جوانه‌زنی با حضور نانوذرات اکسید روی در محیط، نسبت به شاهد کاهش یافت. بیشترین کاهش (۵۰٪) در تیمار با غلظت ۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی مشاهده شد. طول ریشه‌چه در گیاهان رشدیافته در محیط دارای نانوذرات اکسید روی نسبت به گیاهان شاهد به‌میزان ۳ تا ۵ برابر افزایش نشان داد. افزایش وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه نیز در حضور نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد ۱/۵ تا ۲ برابر بود. میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های ۰/۰۸ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به شاهد به‌میزان ۱/۵ تا ۲ برابر افزایش یافت. افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، میزان ترکیبات فنلی و اسید زمارینیک در تیمار نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد مشاهده شد. بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، ترکیبات فنلی و اسید زمارینیک در تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در سال‌های اخیر، از نانوذرات به‌عنوان یک محرک جدید، جهت افزایش رشد و متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی استفاده شده است. براساس نتایج این پژوهش در حضور نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های بسیار پایین‌تر از غلظت عنصر روی در محیط کشت MS، افزایش رشد، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه عملکرد گیاه مشاهده شد. افزایش میزان ترکیبات فنلی و میزان اسید زمارینیک تحت تأثیر نانوذرات اکسید روی در کشت درون شیشه‌ای بادرنجبویه با افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز هماهنگ بود. درنهایت، استفاده از نانوذرات اکسید روی به‌عنوان یک راهکار مؤثر جهت بهبود متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاه بادرنجبویه قابل توصیه است.

کلیدواژه‌گان: اسید زمارینیک، رشد، کشت درون شیشه، نانوذرات اکسید روی، نعنایان

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۰۶

منبع: دهجی‌پور حیدرآبادی، م، مرتضائی، ف، و محمودنیا میمند، م. (۱۴۰۵). تأثیر نانوذرات اکسید روی بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ای و متابولیت‌های ثانویه بادرنجبویه (*Mellisa officinalis* L.) در کشت درون شیشه‌ای، مجله تولید و ژنتیک گیاهی، ۷(۱)، ۹۳-۱۰۸. <https://doi.org/10.22034/PLANT.2001.145333.1195>



مقدمه

در سال‌های اخیر بررسی ساخت و توسعه‌ی نانوذرات، یکی از موضوعات مهم در فناوری نانو است. ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات مانند شکل، اندازه، ساختار و رفتار متفاوت در مقایسه با مواد توده‌ای، توجه محققان را به نانوذرات جلب کرده است. استفاده از نانوذرات در علوم گوناگون از جمله پزشکی، بیوتکنولوژی، الکترونیک، کشاورزی و صنایع غذایی مورد بررسی قرار گرفته است (Nazir *et al.*, 2024). افزایش عملکرد محصولات کشاورزی از طریق مدیریت عناصر غذایی، کاهش آفات و همچنین کاهش استفاده از مواد شیمیایی، هدف اصلی کاربرد نانوذرات در کشاورزی است (Arora *et al.*, 2022). نانوذرات به راحتی از طریق منافذ غشای پلاسمایی وارد سلول شده و نه تنها به عنوان عامل خارجی شناسایی نمی‌شوند بلکه انتشار، جایابی و توزیع آن‌ها در سلول‌های گیاهی نیز تسهیل می‌گردد (Hu *et al.*, 2020). جذب نانوذرات توسط پروتوپلاست‌های گیاهی و کلروپلاست‌ها در شرایط آزمایشگاهی در کشت درون شیشه‌ای، نقش مهم اندازه در انتقال از غشای پلاسمایی و غشای اندامکها را تأیید می‌کند (Lew *et al.*, 2018). گیاهان دارویی گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی را به نام متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که علاوه بر اهمیت برای حیات گیاه، اثرات دارویی زیادی در درمان بیماری‌های گوناگون دارند (Hussein & El-Anssary, 2019). استفاده از نانوذرات به عنوان محرک، یک استراتژی جدید جهت بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان است. اخیراً محققان بسیاری نقش نانوذرات را به عنوان محرک در القای فعالیت آنزیم‌های مرتبط با سنتز متابولیت‌های ثانویه بررسی کرده‌اند. هدف اصلی افزایش اثرات درمانی گیاهان دارویی با افزایش تولید ترکیبات زیست فعال در آن‌ها با استفاده از نانوذرات است (Rivero-Montejo *et al.*, 2021). بررسی‌ها نشان داده است که نانوذرات گونه‌های فعال اکسیژن و پیام‌رسان‌های ثانویه که منجر به تنظیم رونویسی در متابولیسم ثانویه گیاهی می‌شوند را القا می‌کنند. گونه‌های فعال اکسیژن و یون‌های کلسیم پیام‌رسان‌های ثانویه مهمی هستند که منجر به فراتنظیم تنظیم‌کننده‌های رونویسی متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. کاربرد نانوذرات با

تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول گیاهی، تنش اکسیداتیو و سپس تغییرات مستقیم و غیرمستقیم در متابولیت‌های اولیه و ثانویه را هدف قرار می‌دهد (Berni, 2019). نانوذرات پس از ورود به سلول گیاهی از مسیر سیتوپلاسمی با القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن، پمپ کلسیم، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آبشار پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن، رونویسی ژن‌های مسیر متابولیسم ثانویه را تنظیم می‌کنند. حذف گونه‌های فعال اکسیژن با فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی القاکننده متابولیسم ثانویه، محافظت سلول از آسیب اکسیدانی را سبب می‌شود (Marslin *et al.*, 2017). استفاده از نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) در غلظت‌های مناسب، بهبود رشد، شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و تولید متابولیت‌های ثانویه را موجب شده است (Tarroum *et al.*, 2023). بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی دارویی از خانواده نعنائیان با خواص دارویی متعدد است. اسیدرزمارینیک (استر اسید کافئیک و ۳، ۴ دی‌هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید) مهم‌ترین ترکیب فنلی فعال و غالب در گیاه بادرنجبویه، حدود ۰/۵ تا ۶/۸ درصد از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهد (Kittler *et al.*, 2018). لذا، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر جایگزینی منبع روی در محیط MS (سولفات روی) با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ای و تولید ترکیبات فنلی و اسیدرزمارینیک بادرنجبویه در شرایط کنترل شده بود.

مواد و روش‌ها

انجام این آزمایش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان صورت گرفت. نانوذرات اکسید روی از شرکت آمریکایی US Research Nanomaterials (US-Nano) تهیه شد. با استفاده از حلال دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) و قراردادن در حمام فراصوت ۷۵۰۰s مدل پارسونیک ساخت ایران به مدت دو ساعت در دمای ۴°C آماده‌سازی نانوذرات انجام شد. خصوصیات نانوذرات مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های بادرنجبویه بذرها، بادرنجبویه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. چنانچه در شکل ۲ نشان داده شده است بعد از ضدعفونی نمودن سطحی آنها با هیپوکلریت سدیم ۵٪ و اتانول ۷۰٪، در محیط MS دارای دو نوع عنصر روی به صورت سولفات روی

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های بادرنجبویه بذرها، بادرنجبویه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. چنانچه در شکل ۲ نشان داده شده است بعد از ضدعفونی نمودن سطحی آنها با هیپوکلریت سدیم ۵٪ و اتانول ۷۰٪، در محیط MS دارای دو نوع عنصر روی به صورت سولفات روی

جدول ۱- ویژگی‌های نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs)

درجه خلوص	اندازه (APS)	رنگ	فاز کریستالی	شکل ظاهری	چگالی (g/cm ³)
۹۹/۹۹٪	۱۰-۳۰ نانومتر	سفید	تک کریستال	کروی	۵/۶۰۶

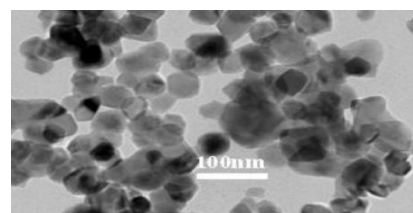
با در نظر گرفتن معیار جوانه‌زنی بذرها، خروج ریشه‌چه و قابل رویت بودن آن (حداقل به طول دو میلی‌متر)، شمارش بذرها، جوانه‌زده به‌طور روزانه انجام و درصد جوانه‌زنی براساس رابطه ۱ محاسبه شد. رابطه (۱) درصد جوانه‌زنی =

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های بادرنجبویه بذرها، بادرنجبویه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. چنانچه در شکل ۲ نشان داده شده است بعد از ضدعفونی نمودن سطحی آنها با هیپوکلریت سدیم ۵٪ و اتانول ۷۰٪، در محیط MS دارای دو نوع عنصر روی به صورت سولفات روی (۸/۶ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان شاهد یا نانوذرات اکسید روی (با غلظت‌های ۰/۱۶، ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر) با اسیدیته معادل ۵/۷ کشت و سپس در اتاقک‌های رشد با شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۵°C قرار داده شدند (Nechitailo et al., 2018).

۱۰۰ × تعداد کل بذرها کشت شده/تعداد بذرها جوانه زده شده

ترکیب و غلظت عناصر در محیط کشت MS

غلظت mg.L ⁻¹	عناصر ماکرو (بر مصرف)
۱۶۵۰	(NH ₄) NO ₃
۱۹۰۰	KNO ₃
۴۴۰	CaCl ₂ .2H ₂ O
۳۷۰	MgSO ₄ .7H ₂ O
۱۷۰	KH ₂ PO ₄
غلظت mg.L ⁻¹	عناصر میکرو (کم مصرف)
۳۷۸	FeSO ₄ .7H ₂ O
۳۷۲۶	NaEDTA
۲۲۳	MnSO ₄ .4H ₂ O
۸۶	ZnSO ₄ .7H ₂ O
۶۲	H ₃ BO ₃
۰.۸۳	KI
۰.۳۵	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O
۰.۳۵	CuSO ₄ .5H ₂ O
۰.۳۵	CoCl ₂ .6H ₂ O
غلظت mg.L ⁻¹	ویتامین‌ها
۰.۱	Thiamine. HCl
۰.۵	Nicotinic acid
۰.۵	Pyridoxine. HCl
غلظت g.L ⁻¹	سایر مواد
۰.۱	Myo-inositol
۰.۰۰۲	Glycine
۳۰	Sucrose



ZnO NPs

شکل ۱- ظاهری نانوذرات اکسید روی و روش جایگزینی سولفات روی در محیط کشت MS با نانوذرات اکسید روی (Nechitailo et al., 2018)

با جریان هوای تصفیه شده خشک شد. مقدار اسید سینامیک در طول موج ۲۹۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیم PAL بر حسب میزان اسید سینامیک به ازای میلی گرم پروتئین به مدت زمان یک ساعت محاسبه و جهت رسم منحنی استاندارد از محلول اسید سینامیک با غلظت ۰ تا ۳۵ میکرولیتر استفاده شد (Wang et al., 2006). ترکیبات فنلی با استفاده از شناساگر فولین سیوکالتیو و براساس روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. ابتدا نمونه گیاهی با اتانول ۸۰٪ همگن و پس از قراردادن در حمام آب با دمای ۷۰°C، با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و روشناور حاصل جهت سنجش میزان ترکیبات فنلی استفاده شد. جهت سنجش فنل به عصاره الکلی، معرف فولین سیوکالتیو رقیق شده با آب مقطر (۱:۱۰) افزوده و پس از پنج دقیقه با اضافه کردن محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۷۶۵ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر مدل Analytic Jena قرائت و مقدار فنل کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Singleton & Rossi, 1965). به منظور استخراج و سنجش اسید رزمارینیک، به نمونه گیاهی اتانول ۴۰٪ اضافه و به مدت ۳۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب مخلوط واکنش شامل عصاره استخراجی، محلول سوبسترای زیرکونیوم $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ و اتانول ۹۶٪ پس از نگهداری به مدت پنج دقیقه در تاریکی، در طول موج ۳۶۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. اسید رزمارینیک با غلظت های ۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (Öztürk et al., 2010). آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و جهت محاسبه میانگین و رسم نمودارها، از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد. تجزیه واریانس (ANOVA) داده ها، انحراف معیار و مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد.

با استفاده از خط کش میلی متری، طول ساقه چه و ریشه چه اندازه گیری شد. بعد از اندازه گیری وزن تر ساقه چه و ریشه چه، نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰°C خشک و سپس اندازه گیری وزن خشک ساقه چه و ریشه چه با ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ انجام شد. برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید، استخراج رنگیزه ها با استفاده از استون ۸۰٪ تا سفیدرنگ شدن نمونه صورت گرفت. حجم نهایی نمونه با استون ۸۰٪ به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سانتریفیوژ محتویات به دست آمده با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه انجام و جذب روشناور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Analytik Jena برای کلروفیل های a و b در طول موج های ۶۴۶/۶ و ۶۶۳/۶ نانومتر و برای کاروتنوئید در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد (Arnon, 1949). میزان کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از روابط ذیل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

$$\text{رابطه ۲} \quad a \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = [12/7 (A_{663/6}) - 2/69 (A_{646/6})] \times V / (1000W)$$

$$\text{رابطه ۳} \quad b \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = [9/22 (A_{6/646}) - 68/4 (A_{6/663})] \times V / (1000W)$$

$$\text{رابطه ۳} \quad a+b \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = [20/2 (A_{663/6}) - 8/02 (A_{646/6})] \times V / (1000W)$$

$$\text{رابطه ۵} \quad \text{کلروفیل (mg g}^{-1}\text{)} = [1000(A_{470}) - 1/82(a \text{ کلروفیل}) - 85/02(b \text{ کلروفیل})] / 198 \times V / (1000W)$$

V : حجم نمونه استخراج شده (میلی لیتر) و W : وزن تر نمونه (گرم)

به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز، استخراج با حجم معینی از بافر Tris-HCl با اسیدیته ۸/۸ حاوی مرکاپتواتانول ۲ میلی مولار انجام و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C، روشناور جهت سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش شامل عصاره، فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار و بافر Tris-HCl با اسیدیته ۸/۸ تهیه و پس از نگهداری در دمای ۳۷°C به مدت یک ساعت، فعالیت آنزیمی با استفاده از اسید کلریدریک ۶ مولار متوقف شد. استخراج اسید سینامیک حاصل توسط اتیل استات انجام و

نتایج و بحث

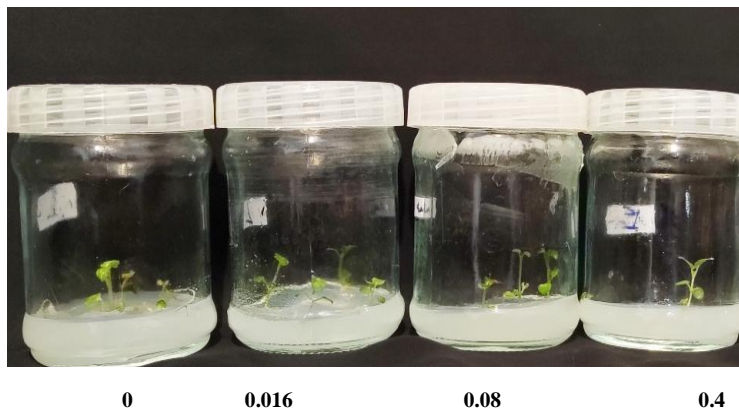
بررسی جوانه‌زنی و رشد: چنانچه در جدول ۲ نشان داده شده است تیمار نانوذرات اکسید روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول گیاهچه را در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر قرار داده است (جدول ۲). گیاهچه‌های رشدیافته در محیط‌های دارای غلظت‌های ۰، ۰/۰۱۶، ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی با گذشت زمان رشد

مناسبی را از خود نشان دادند (شکل ۲). کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) درصد جوانه‌زنی در حضور نانوذرات اکسید روی در محیط کشت نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۳). تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت ۰/۰۱۶ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین کاهش را نسبت به شاهد (۵۰٪) نشان داد. درحالی‌که میزان کاهش درصد جوانه‌زنی در تیمارهای دیگر نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد حدود ۲۸٪ بود (شکل ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نانوذرات اکسید روی بر درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و طول گیاهچه

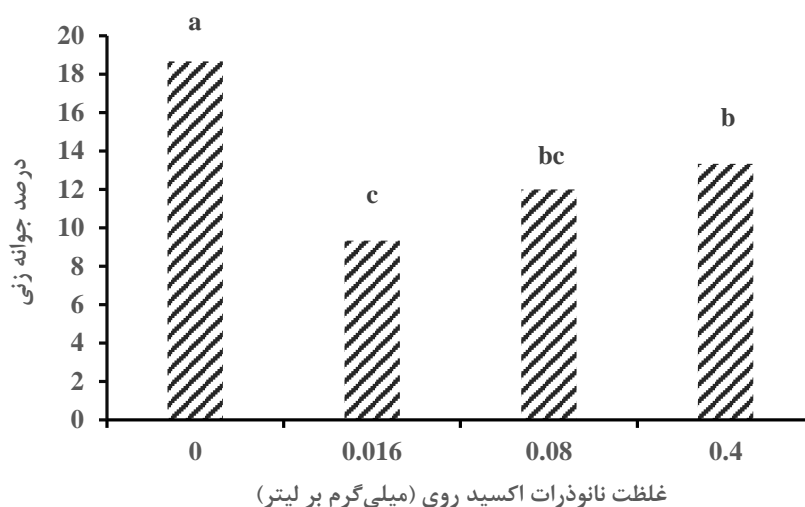
میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییر
طول گیاهچه	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	درصد جوانه‌زنی	میانگین مربعات		
۲۲/۹۶۷**	۲۲/۵۰۸**	۰/۱۳۴ ^{ns}	۳۳/۳۳۳**	۳	تیمار	
۰/۹۴۸	۰/۵۰۳	۰/۲۶۰	۴/۰۰۰	۸	خطا	
۱۳/۹۲۶	۱۴/۹۳۱	۲۲/۸۲۲	۱۵/۳۸۵		ضریب تغییرات (%)	

** و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار



شکل ۲- گیاهچه‌های بادرنجبویه رشدیافته در محیط MS با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (میلی‌گرم بر لیتر)

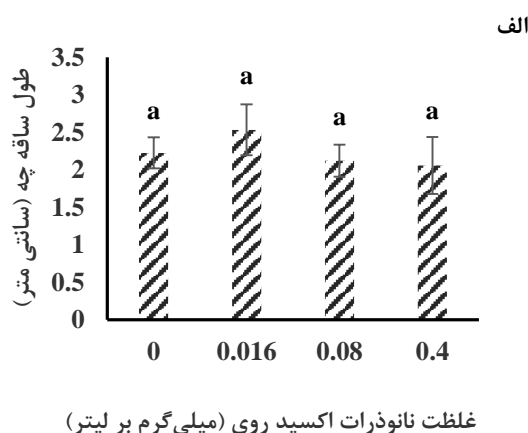
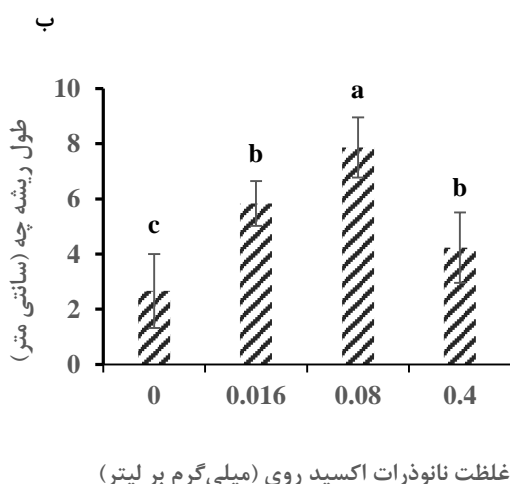
شکل ۲- گیاهچه‌های بادرنجبویه رشدیافته در محیط MS با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی

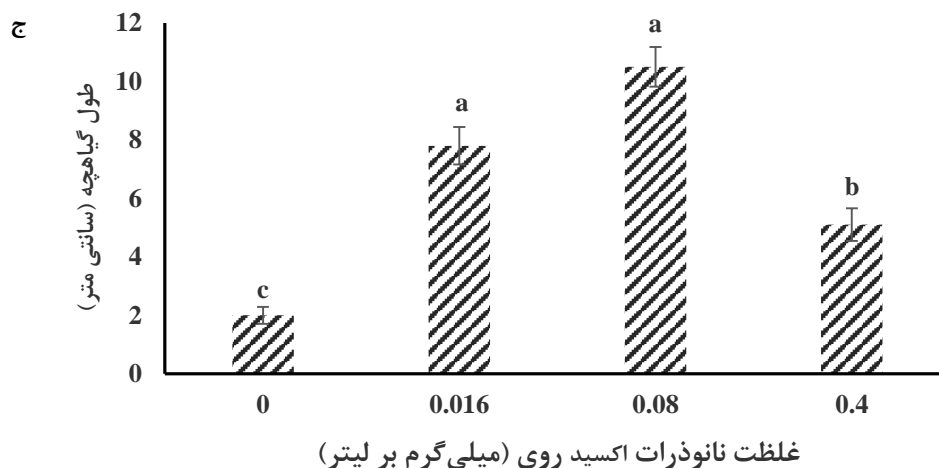


شکل ۳- اثر نانوذرات اکسید روی بر درصد جوانه زنی بذر گیاه بادرنجبویه. میانگین‌هایی که دارای حداقل

در باقلا هم‌راستا بود (Doğaroğlu *et al.*, 2019؛ Rahman *et al.*, 2023؛ Abdelmagid *et al.*, 2025). یکی از مشکلات رایج در استفاده از نانوذرات، تمایل نانوذرات به تجمع (agglomeration) است که افزایش غلظت تسهیل این فرایند را موجب می‌شود (Kurczyńska *et al.*, 2021). بنابراین اثر بازدارندگی بیشتر نانوذرات در غلظت کم می‌تواند با جذب بیشتر نانوذرات مرتبط باشد؛ به گونه‌ای که با افزایش غلظت نانوذرات در محیط کشت و تجمع بیشتر نانوذرات، با کاهش جذب آن‌ها، اثر بازدارندگی بر جوانه زنی نیز کاهش یافته است.

از آنجایی که جوانه زنی اولین و حساس‌ترین مرحله در دوره زندگی گیاه است، تأثیر نانوذرات بر این فرایند اهمیت خاصی دارد. در مورد تأثیر نانوذرات اکسید روی بر جوانه زنی گیاهان مختلف گزارش‌هایی ارائه شده است (Ziari *et al.*, 2024). اثر محرک یا بازدارندگی نانوذرات مختلف بر جوانه زنی با توجه به غلظت‌های مورد استفاده و گونه‌های گیاهی در مطالعات زیادی نشان داده شده است (Acharya *et al.*, 2020). نتایج این پژوهش با کاهش درصد جوانه زنی نسبت به گیاهان شاهد در استفاده از نانوذرات روی در گیاه چاودار و گندم، نانوذرات نقره در نخود و نانوذرات تیتانیوم





شکل ۴- اثر نانوذرات اکسید روی بر طول ساقه‌چه (الف)، طول ریشه‌چه (ب) و طول گیاهچه (ج) در گیاه بادرنجبویه
حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

گیاهچه نیز در حضور نانوذرات اکسید روی نسبت به گیاه-
چه‌های شاهد مشاهده شد (شکل ۴-ج). با افزایش غلظت
نانوذرات اکسید روی به میزان ۰/۴ میلی گرم بر لیتر، طول
گیاهچه به میزان کمتری افزایش نشان داد. تیمار نانوذرات
اکسید روی، وزن تر ریشه‌چه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک
ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و وزن خشک گیاهچه را در
سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر قرار داد (جدول ۳).

طول ساقه‌چه در تیمار نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد
تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴-الف). درحالی‌که
طول ریشه‌چه در تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید
روی نسبت به شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد.
افزایش طول ریشه‌چه در غلظت ۰/۰۸ میلی گرم بر لیتر
نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد پنج برابر و در
غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۱۶ میلی گرم بر لیتر به ترتیب سه تا
چهار برابر بود (شکل ۴-ب). در همین راستا، افزایش طول

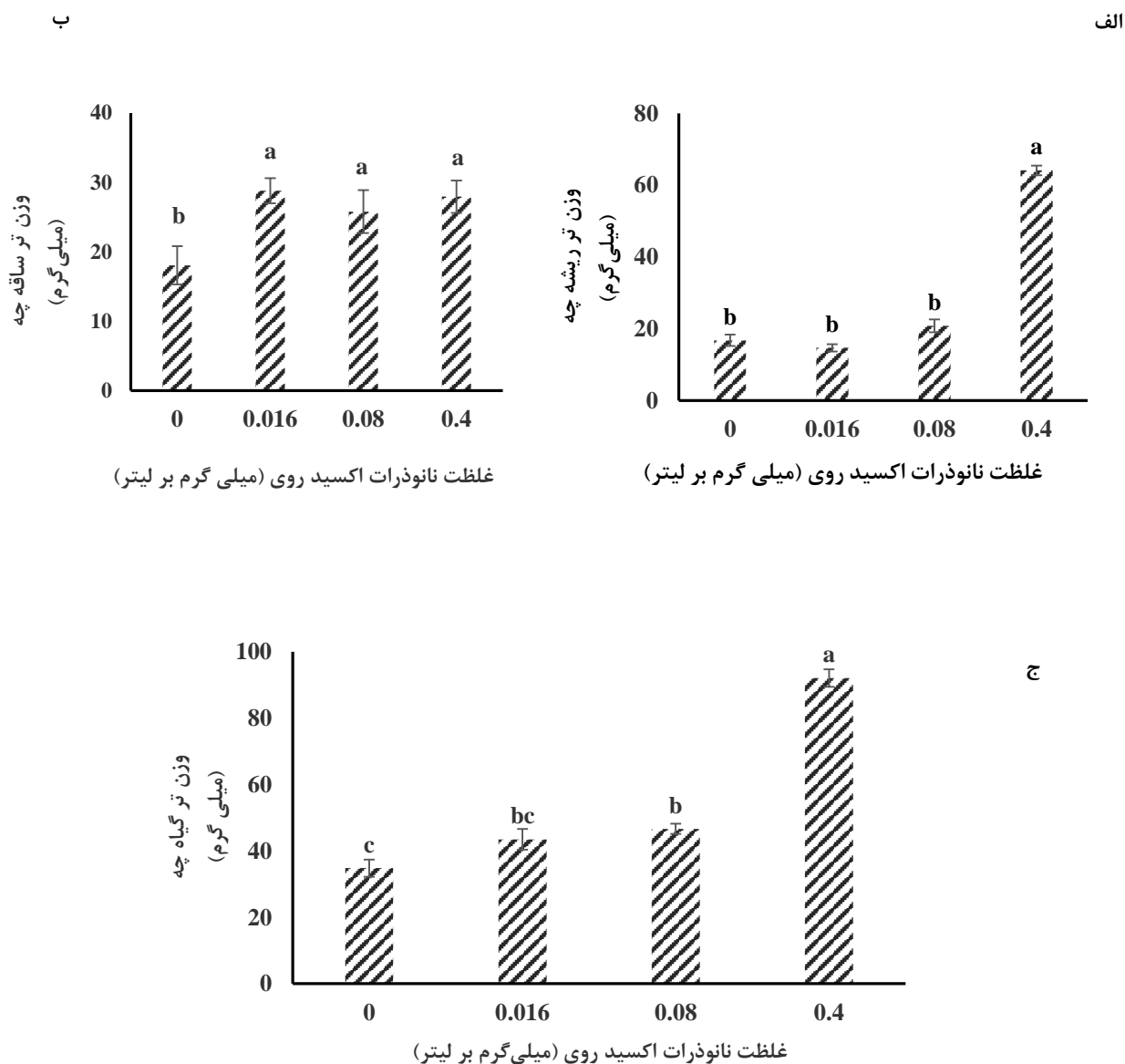
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر نانوذرات اکسید روی بر وزن تر ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک ساقه‌چه، وزن
خشک ریشه‌چه و وزن خشک گیاهچه

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
وزن خشک گیاهچه	وزن خشک ریشه‌چه	وزن خشک ساقه‌چه	وزن تر گیاهچه	وزن تر ریشه‌چه	وزن تر ساقه‌چه		
۸/۲۴۷**	۳/۹۱۱**	۳/۳۲۸**	۱۹۸۲/۸۴۳**	۱۶۵۵/۵۶۸**	۷۲/۰۰۳ ^{ns}	۳	تیمار
۰/۲۲۸	۰/۰۴۸	۰/۱۶۵	۱۹/۵۴۷	۱۳/۲۳۳	۶/۴۳۷	۸	خطا
۸/۷۶۲	۱۱/۳۹۵	۱۱/۵۱۸	۸/۱۴۷	۱۲/۴۹۱	۱۰/۰۸۹		ضریب تغییرات (%)

** و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

۵- ب). تغییرات وزن تر ریشه‌چه در غلظت‌های ۰/۱۶ و
۰/۰۸ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد
از لحاظ آماری ($p \leq 0.05$) معنی‌داری نبود. با افزایش غلظت
نانوذرات اکسید روی وزن تر گیاهچه نسبت به شاهد افزایش
یافت؛ این افزایش وزن در غلظت‌های ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی گرم
بر لیتر نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد معنی‌دار بود
(شکل ۵-ج).

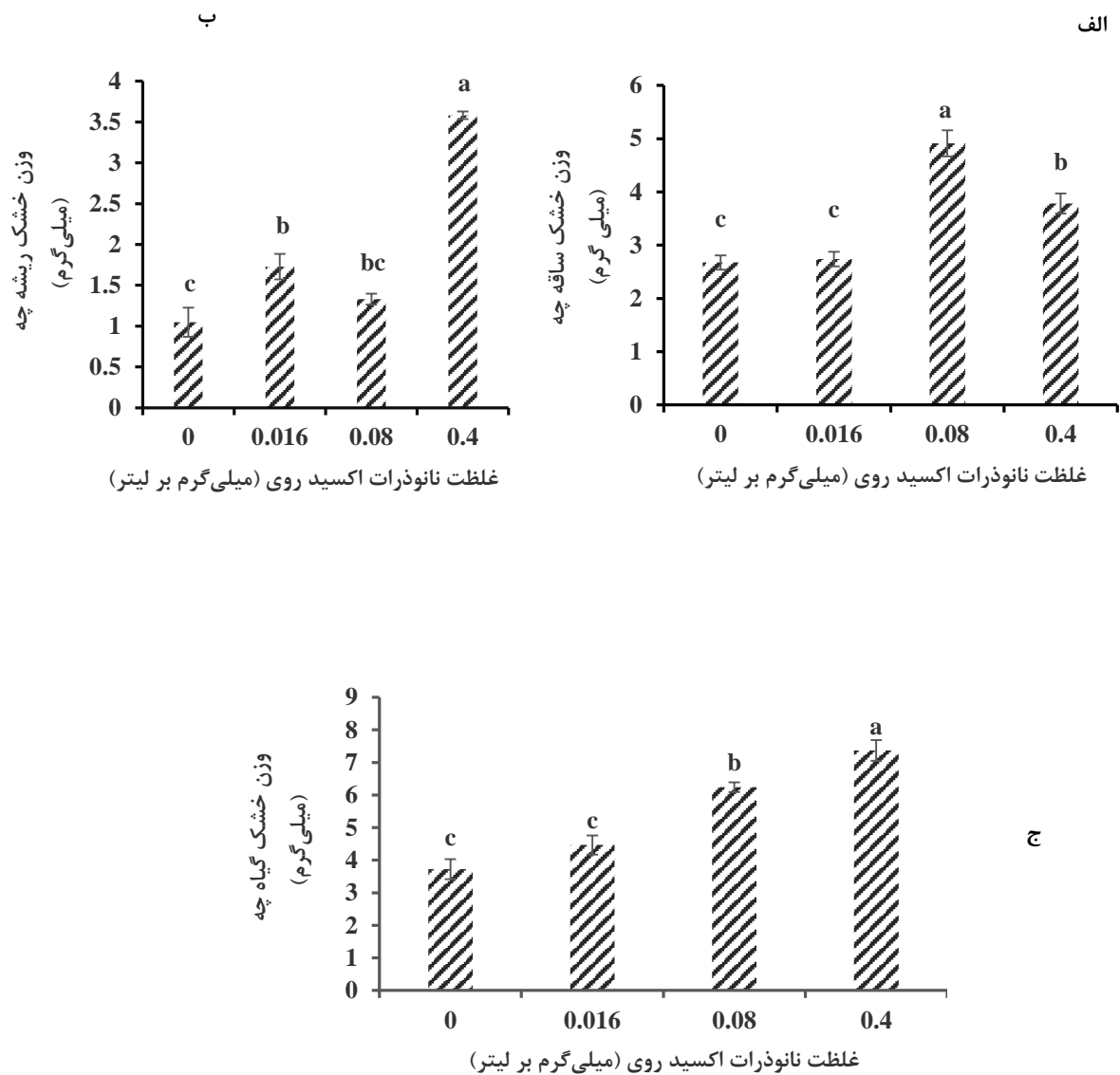
براساس نتایج نشان داده شده در شکل ۵- الف حضور
نانوذرات اکسید روی در محیط کشت بادرنجبویه افزایش
وزن تر ساقه‌چه را موجب شد. اگرچه افزایش وزن تر ساقه-
چه در تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی از
لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p \leq 0.05$). وزن
تر ریشه‌چه در غلظت ۰/۴ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید
روی نسبت به شاهد حدود چهار برابر افزایش یافت (شکل



شکل ۵- اثر نانوذرات اکسید روی بر وزن تر ساقه چه (الف)، وزن تر ریشه چه (ب) و وزن تر گیاهچه (ج) در بادرنجبویه حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می باشد.

نتایج به دست آمده تغییرات وزن خشک ریشه چه در غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی با تغییرات وزن تر ریشه چه مطابقت داشت (شکل ۶- ب). افزایش وزن خشک گیاهچه نیز در غلظت های ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد به ترتیب ۱/۷ و دو برابر بود (شکل ۶- ج).

همان طور که در شکل ۶- الف نشان داده شده است وزن خشک ساقه چه با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی به ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر نسبت به شاهد افزایش یافت. به گونه ای که میزان وزن خشک ساقه چه در غلظت های ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد به ترتیب ۱/۸ و ۱/۴ برابر افزایش نشان داد. براساس

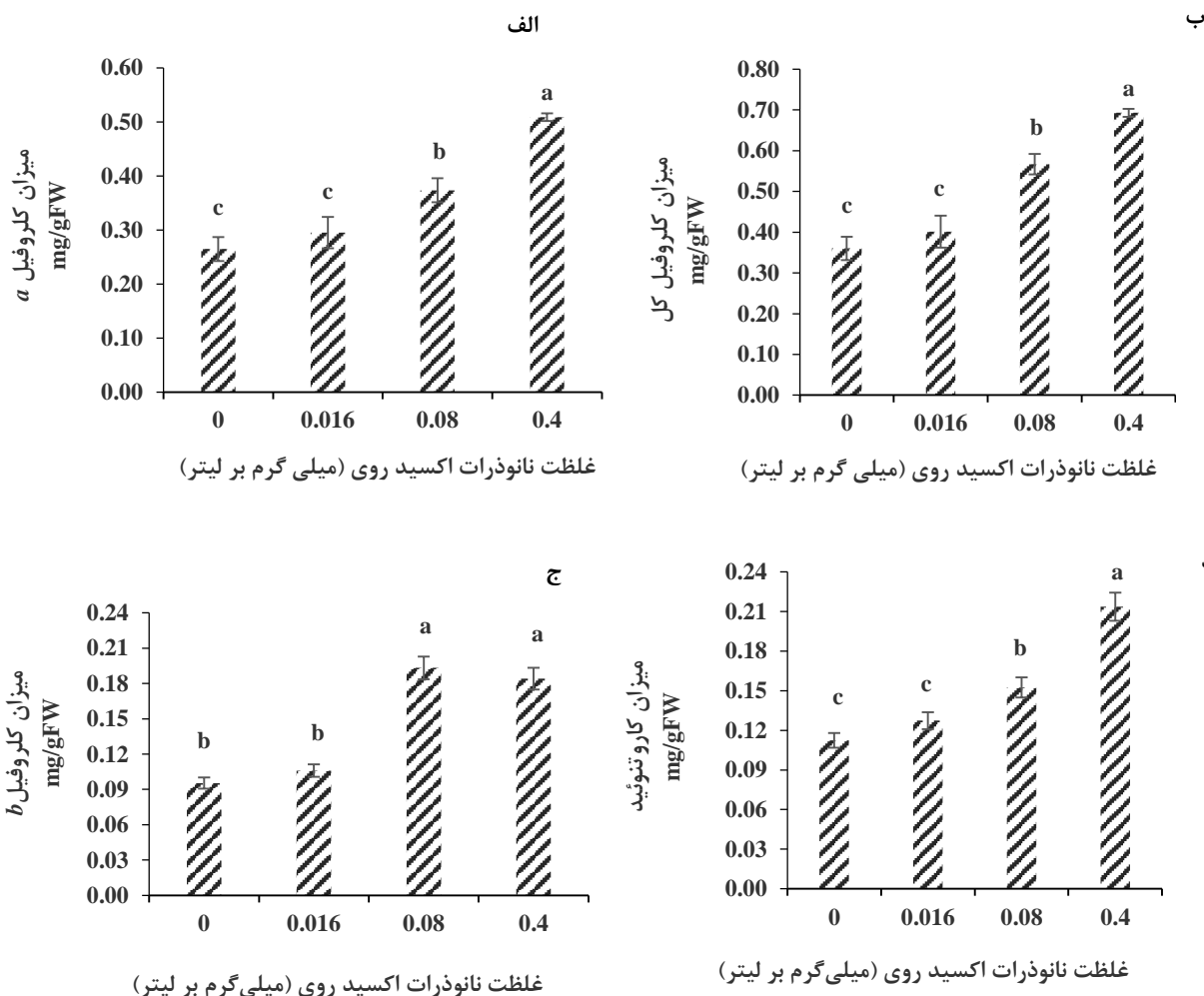


شکل ۶- اثر نانوذرات اکسید روی بر وزن خشک ساقه چه، وزن خشک ریشه چه و وزن خشک گیاهچه در بادرنجبویه حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می باشد.

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر نانوذرات اکسید روی بر میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل <i>b</i>	کلروفیل <i>a</i>		
۰/۰۰۶**	۰/۰۷۱**	۰/۰۰۸**	۰/۳۶۰**	۳	تیمار
۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۸	خطا
۲/۵۶۹	۵/۳۷۵	۸/۳۱۰	۵/۲۶۸		ضریب تغییرات (/)

** در سطح یک درصد معنی دار



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاهچه‌های بادنرنبویه حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

سیتوپلاسم نقش مهمی ایفا می‌کند (Maani *et al.*, 2025). هم‌چنین نانوذرات روی می‌توانند میزان کلروفیل را با به تعویق انداختن تخریب و پیری سلول، به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر قرار دهند (Tariq *et al.*, 2025).

بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، محتوای فنل کل و اسید رزمارینیک

نانوذرات اکسید روی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، محتوای فنل کل و اسید رزمارینیک را در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر قرار داد (جدول ۵).

نتایج پژوهش‌های بسیاری، افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی را تحت تأثیر نانوذرات فلزی نشان داده است (Zeng *et al.*, 2024). نتایج پژوهشی در گیاه رزماری نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات تیتانیوم، مقدار کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید افزایش یافت که با نتایج این پژوهش هم‌راستا بود (Gholami *et al.*, 2020). هم‌چنین افزایش قابل توجه میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از نانوذرات روی در گیاه ریحان و بادنرنبویه گزارش شده است (Aghaee *et al.*, 2022؛ Farnoosh *et al.*, 2023). به نظر می‌رسد عنصر روی در بیوسنتز کلروفیل و کاروتنوئید از طریق تنظیم غلظت‌های آهن و منیزیم در

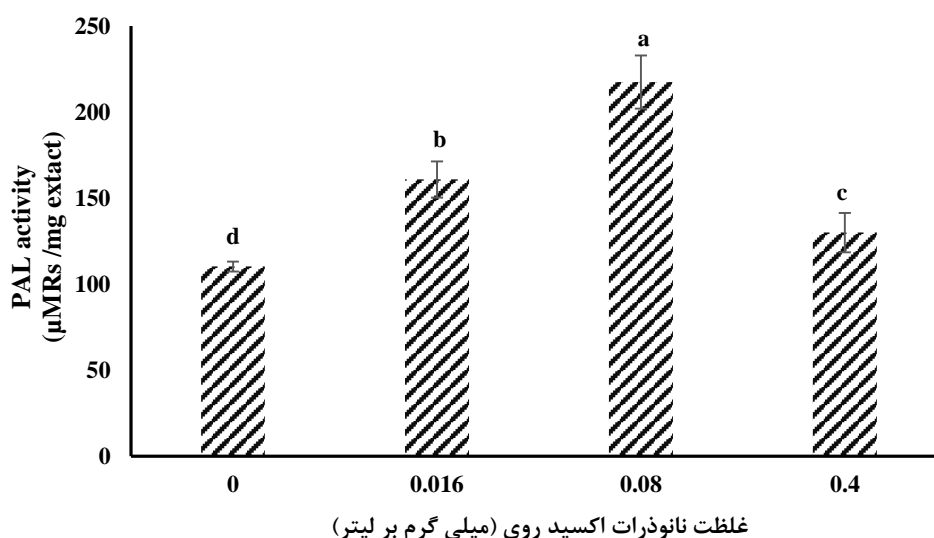
جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر نانوذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز، میزان فنل کل و اسید زمارینیک

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
اسید زمارینیک	فنل کل	فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز		
۳۷۸/۰۶۲**	۲۶/۲۲۸**	۶۵۶۷/۰۳۲**	۳	تیمار
۱/۷۰۹	۰/۲۹۰	۵/۲۳۶	۸	خطا
۲۲/۳۰۱	۲۰/۵۹۶	۱۸/۳۹۹		ضریب تغییرات (%)

** در سطح یک درصد معنی دار

با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی به ۰/۰۸ و ۰/۴ میلی- گرم بر لیتر این افزایش فعالیت نسبت به شاهد به ترتیب ۹۷٪ و ۱۸٪ بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت ۰/۰۸ میلی-گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۸).

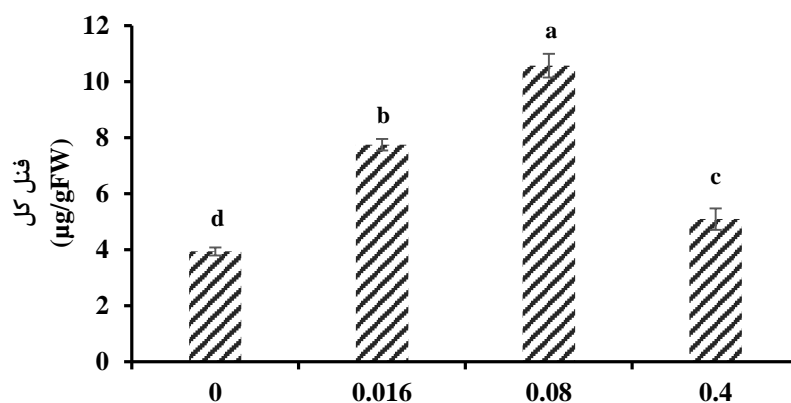
براساس نتایج میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز در حضور نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد افزایش معنی دار در سطح احتمال $p \leq 0.05$ نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز در غلظت ۰/۰۱۶ میلی-گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد ۴۶٪ بود.



شکل ۸- اثر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز در گیاه بادرنجبویه حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می باشد.

۰/۰۸ و ۰/۴ میلی-گرم بر لیتر به ترتیب ۹۷٪، ۱۶۸٪ و ۲۹٪ نسبت به شاهد بود. بیشترین میزان فنل کل نیز در تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت ۰/۰۸ میلی-گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۹).

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، میزان فنل کل در گیاهان کشت شده در حضور نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد افزایش معنی دار نشان داد. افزایش میزان فنل کل در تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت های ۰/۰۱۶،

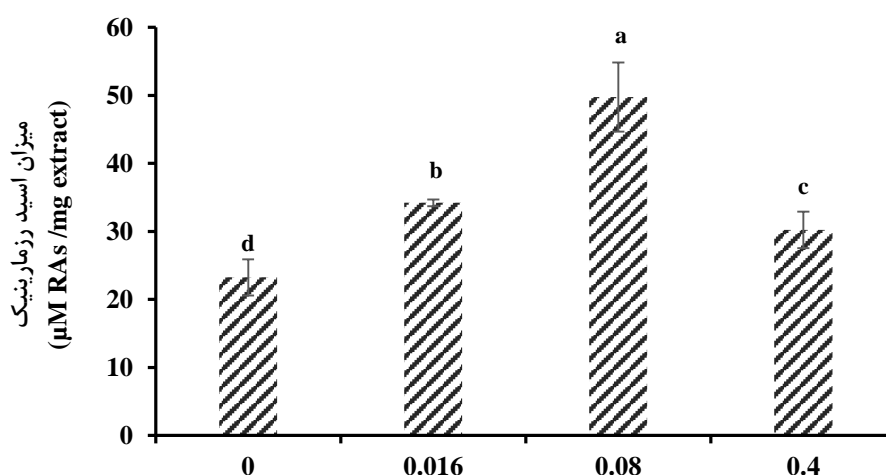


غلظت نانوذرات اکسید روی (میلی گرم بر لیتر)

شکل ۹- تاثیر نانوذرات اکسید روی بر میزان فنل در کشت درون شیشه‌ای با درنجبویه
حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

میزان تولید اسید رزمارینیک در حضور نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد. افزایش میزان اسید رزمارینیک در غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی مشاهده شد (شکل ۱۰).

میزان تولید اسید رزمارینیک در حضور نانوذرات اکسید روی نسبت به شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد. افزایش میزان اسید رزمارینیک در تیمار نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های ۰/۱۶، ۰/۰۸، و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب



غلظت نانوذرات اکسید روی (میلی گرم بر لیتر)

شکل ۱۰- تاثیر نانوذرات اکسید روی بر میزان اسید رزمارینیک در کشت درون شیشه‌ای با درنجبویه
حروف غیریکسان، معرف تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال $P \leq 0.05$ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

برخی ترکیبات محرک، توان دفاعی گیاهان را افزایش می‌دهد. به عبارتی ترکیبات فنلی با حذف گونه‌های فعال اکسیژن از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند (Saini *et al.*, 2024). در راستای نتایج این پژوهش کاربرد نانوذرات روی در کشت کالوس انار افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز و ترکیبات فنلی را موجب شد (Farghaly *et al.*, 2020). همچنین اثر نانوذرات اکسید روی بر افزایش ترکیبات فنلی در گیاه شیرین بیان گزارش شده است

مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئیدی تحت محرک‌های محیطی فعال شده و تجمع ترکیبات فنلی را که توانایی حذف گونه‌های فعال اکسیژن را دارند موجب می‌شود. در گیاهان محرک‌ها مسیر فنیل‌پروپانوئیدی را با تنظیم فعالیت آنزیم کلیدی فنیل‌آلانین آمونیلایز تنظیم می‌کنند (Ninkuu *et al.*, 2025). تولید ترکیبات فنلی در پاسخ به

متابولیت‌های ثانویه، توسط بسیاری از محققان مطرح شده است. لذا در این پژوهش تأثیر استفاده از نانوذرات اکسید روی در کشت درون شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه، به‌عنوان محرک رشد بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی آن‌ها بررسی شد. براساس نتایج این پژوهش افزایش رشد و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه عملکرد گیاه در حضور نانوذرات اکسید روی مشاهده شد که بسیار پایین‌تر از غلظت عنصر روی در محیط کشت MS (۲۴/۵ و ۴/۹ برابر کمتر) بود. افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیا ز تحت تأثیر نانوذرات اکسید روی در کشت درون شیشه‌ای گیاه بادرنجبویه، با افزایش میزان ترکیبات فنلی و میزان اسید رزمارینیک همراه بود. درنهایت، استفاده از نانوذرات اکسید روی به‌عنوان محرکی مؤثر در جهت بهبود رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی قابل توصیه است.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان و در اختیار قراردادن امکانات لازم جهت انجام این پایان نامه کارشناسی ارشد اعلام می‌دارند.

(Oloumi *et al.*, 2015). افزایش فنل کل با استفاده از نانوذرات اکسید روی در کشت کالوس مارتیغال، استویا و شاه‌پسند مشاهده شد (Javed *et al.*, 2018؛ Shehzad *et al.*, 2021). در گیاه خربزه تلخ نیز افزایش در فنل کل با استفاده از نانوذرات اکسید روی گزارش شده است (Sharifi-Rad *et al.*, 2020). سنتز اسیدرزمارینیک، فعال‌ترین و فراوان‌ترین ترکیب فنلی موجود در گیاه دارویی بادرنجبویه، با استفاده از پیش‌ماده فنیل‌آلانین و با فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیا ز از طریق مسیر بیوسنتزی فنیل-پروپانوئیدی شروع می‌شود (Weitzel & Petersen, 2011). میزان اسید رزمارینیک با استفاده از نانوذرات نقره و نانوذرات روی در گیاه بادرنجبویه، به‌میزان قابل توجهی افزایش نشان داد (Shavalibor & Esmaeilzadeh, 2021؛ Bahabadi, 2023؛ Farnoosh *et al.*, 2023). همچنین افزایش میزان سولفارافان در گیاهچه‌های از مک تحت تأثیر نانوذرات اکسید مس و آهن گزارش شده است (Aminizadeh *et al.*, 2016).

نتیجه‌گیری کلی

یکی از تکنیک‌های به‌کار گرفته شده برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، استفاده از محرک در شرایط کشت کنترل شده است. امروزه استفاده از نانوذرات به‌عنوان یک محرک جدید، جهت افزایش رشد و

منابع

- Abdelmagid, S. Y., Gharib, F. A. E. L., & Ahmed, E. Z. (2025). Impact of titanium nanoparticles on germination and early growth of faba bean (*Vicia faba* L.). *Scientific Reports*, 15(1), 32450. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18071-1>
- Acharya, P., Jayaprakasha, G. K., Crosby, K. M., Jifon, J. L., & Patil, B. S. (2020). Nanoparticle-mediated seed priming improves germination, growth, yield, and quality of watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. *Scientific reports*, 10(1), 5037. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61696-7>
- Aghaee, A., Shahabivand, S., Athari, M., & Nasiri, Y. (2022). The effect of foliar application of zinc oxide and zinc nanoparticles on growth, photosynthetic pigments and essential oil compounds of green basil. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 35(2), 233-245. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/JPR.2022.2116>
- Aminzadeh, M., Riahi-Madvar, A., & Mohammadi, M. (2016). Nano-Metal oxides induced sulfuraphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). *Progress in Biological Sciences*, 6(1), 75-83. <https://doi.org/10.22059/pbs.2016.59010>
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.

- Arora, S., Murmu, G., Mukherjee, K., Saha, S., & Maity, D. (2022). A comprehensive overview of nanotechnology in sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology*, 355, 21-41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.06.007>
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2019). Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.017>
- Doğaroğlu, Z. G., Eren, A., & Baran, M. F. (2019). Effects of ZnO nanoparticles and ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid on seed germination of four different plants. *Global Challenges*, 3(9), 1800111. <https://doi.org/10.1002/gch2.201800111>
- Farghaly, F. A., Radi, A. A., Al-Kahtany, F. A., & Hamada, A. M. (2020). Impacts of zinc oxide nano and bulk particles on redox-enzymes of the *Punica granatum* callus. *Scientific reports*, 10(1), 19722. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76664-4>
- Farnoosh, S., Masoudian, N., Safipour Afshar, A., SaeidNematpour, F., & Roudi, B. (2023). Effect of Zinc Oxide nanoparticle on physiological characteristics, rosmarinic acid production and expression of TAT and 4-Cl genes in Lemongrass (*Melissa officinalis* L.). *Cell and Tissue Journal*, 13(1), 56-70. (In Persian). <https://doi.org/10.22080/jct.2022.29848>
- Gholami, A., Abbaspour, H., Gerami, M., & Hashemi-Moghaddam, H. (2020). The effect of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) on photosynthetic pigments and some biochemical and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Food Science and Technology*, 17(105), 123-134. (In Persian).
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Haghaninia, M., Javanmard, A., Rasouli, F., & Hazrati-Haselghobafshar, F. (2025). Optimizing the performance and defensive traits of grapefruit mint (*Mentha suaveolens* × *piperita*) under drought stress conditions using arbuscular mycorrhizal fungi and carbon quantum dots. *Plant Production and Genetics*, 6(1), 1-18. (In Persian).
- Hu, P., An, J., Faulkner, M. M., Wu, H., Li, Z., Tian, X., & Giraldo, J. P. (2020). Nanoparticle charge and size control foliar delivery efficiency to plant cells and organelles. *ACS nano*, 14(7), 7970-7986. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b09178>
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1(3), 11-30. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76139>
- Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., & Gurel, E. (2018). Elicitation of secondary metabolites in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under ZnO and CuO nanoparticles stress. *Sugar Tech*, 20(2), 194-201. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0539-1>
- Lew, T. T. S., Wong, M. H., Kwak, S. Y., Sinclair, R., Koman, V. B., & Strano, M. S. (2018). Rational design principles for the transport and subcellular distribution of nanomaterials into plant protoplasts. *Small*, 14(44), 1802086. <https://doi.org/10.1002/sml.201802086>
- Kittler, J., Krüger, H., Ulrich, D., Zeiger, B., Schütze, W., Böttcher, C., & Marthe, F. (2018). Content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid in lemon balm and balm genotypes (*Melissa officinalis*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65(5), 1517-1527. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0635-4>
- Kurczyńska, E., Godel-Jedrychowska, K., Sala, K., & Milewska-Hendel, A. (2021). Nanoparticles—plant interaction: what we know, where we are? *Applied Sciences*, 11, 5473. <https://doi.org/10.3390/app11125473>
- Maani, M., Fallah Chai, M. M., & Shariati, F. (2025). Uptake of zinc and its effects on nutrient and chlorophyll content in seedlings. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 1-9. <https://doi.org/10.22124/cjes.2025.9267>
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in plant science*, 8, 832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832>
- Mohit Rabary, P., Movahedi, Z., Ghabooli, M., & Rostami, M. (2022). Effects of foliar application of zinc oxide nanoparticles on traits of several medicinal plants under aeroponic system conditions. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 9(4), 445-452. https://ijhst.ut.ac.ir/article_87134.html
- Nazir, S., Zhang, J. M., Junaid, M., Saleem, S., Ali, A., Ullah, A., & Khan, S. (2024). Metal-based nanoparticles: basics, types, fabrications and their electronic applications. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 238(6), 965-995. <https://doi.org/10.1515/zpch-2023-0460>
- Nechitailo, G. S., Bogoslovskaya, O. A., Ol'khovskaya, I. P., & Glushchenko, N. N. (2018). Influence of iron, zinc, and copper nanoparticles on some growth indices of pepper plants. *Nanotechnologies in Russia*, 13(3), 161-167.

- Ninkuu, V., Aluko, O. O., Yan, J., Zeng, H., Liu, G., Zhao, J., & Dakora, F. D. (2025). Phenylpropanoids metabolism: Recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1571825. <https://doi.org/10.1134/S1995078018020052>
- Oloumi, H., Soltaninejad, R., & Baghizadeh, A. (2015). The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings. *Indian Journal of Plant Physiology*, *20*: 157-161. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0143-x>
- Öztürk, M., Duru, M. E., Ince, B., Harmandar, M., & Topçu, G. (2010). A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. *Food Chemistry*, *123*(4), 1352-1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.021>
- Pavani, K., Divya, V., Veena, I., Aditya, M., & Devakinandan, G. (2014). Influence of bioengineered zinc nanoparticles and zinc metal on *Cicer arietinum* seedlings growth. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, *2*(4), 216-223. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4865424>
- Rahman, M. S., Chakraborty, A., Kibria, A., & Hossain, M. J. (2023). Effects of silver nanoparticles on seed germination and growth performance of pea (*Pisum sativum*). *Plant Nano Biology*, *5*, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2023.100042>
- Rivero-Montejo, S. D. J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021). Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture*, *11*(2), 134. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020134>
- Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A. W., Bakshi, M., & Dhiman, Z. (2024). Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants-a comprehensive review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *133*, 102383. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102383>
- Shavalibor, A. & Esmaeilzadeh Bahabadi, S. (2021). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Melissa officinalis* L.: Evaluation of growth parameters, secondary metabolites, and antioxidant enzymes. *Iranian Journal of Plant Physiology*, *11*(4), 3799-3809.
- Shehzad, M. A., Khan, M. A., Ali, A., Mohammad, S., Noureldeen, A., Darwish, H., & Khan, R. S. (2021). Interactive effects of zinc oxide nano particles and different light regimes on growth and silymarin biosynthesis in callus cultures of *Silybum marianum* L. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *49*(1), 523-535. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1946069>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144-158.
- Tariq, M., Tufail, A., Hafeez, M. B., Shoukat, M., Ahmad, N., Iqbal, S., & Zahra, N. (2025). Zinc-based nanoparticles improved the growth, chlorophyll, osmoregulation and ions relations of sunflower under combined shade and drought stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 103812. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103351>
- Tarroum, M., Alfarraj, N. S., Al-Qurainy, F., Al-Hashimi, A., Khan, S., Nadeem, M., & 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*(8), 905. <https://doi.org/10.3390/metabo13080905>
- Weitzel, C., & Petersen, M. (2011). Cloning and characterisation of rosmarinic acid synthase from *Melissa officinalis* L. *Phytochemistry*, *72*(7), 572-578. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.039>
- Wang, J., Zheng L., Wu, J., & Tan, R. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, *15*, 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.04.261>
- Zeng, Y., Molnárová, M., & Motola, M. (2024). Metallic nanoparticles and photosynthesis organisms: Comprehensive review from the ecological perspective. *Journal of Environmental Management*, *358*, 120858. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120858>
- Ziari, Z., Tajadod, G., Arbabian, S., & Mirzai, M. (2024). The effect of manganese oxide nanoparticles and zinc oxide nanoparticles on seed germination of medicinal chicory plant *Cichorium intybus* L. *Plant, Algae, and Environment*, *8*(2), 1366-1374. <https://doi.org/10.48308/jpr.2024.236369.1083>