

Investigating the Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized with Valerian (*Valeriana officinalis* L.) Flower Extract on some Morphological and Biochemical Characteristics of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Plant

Morteza Ezazi¹ , Bita Behboodan² , Homa Mahmoodzadeh³ , Matin Jami Moeini⁴ 

1. Department of Agricultural Biotechnology, Sab.C., Islamic Azad University, Sabzevar, Iran. E-mail:

morteza.ezazi@iau.ir

2. Department of Biology, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: b.behboodan@iau.ac.ir

3. Department of Biology, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: mahmoodzadeh@iau.ac.ir

4. Department of Agricultural Biotechnology, Sab.C., Islamic Azad University, Sabzevar, Iran. E-mail:

m.jamimoeini@iau.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received 28 June 2026

Received in revised form 29

July 2026

Accepted 08 September 2026

Available online 22 September 2026

Keywords:

Green Synthesis,
Antioxidant Enzymes,
Oxidative Stress,
Enzyme Activity,
Foliar Application
Lipid Peroxidation

ABSTRACT

Objective: Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) have attracted considerable attention due to their antioxidant properties and agricultural applications. Green synthesis using plant extracts provides an eco-friendly approach that reduces toxic compounds and improves nanoparticle stability. This study aimed to synthesize ZnO-NPs using *Valeriana officinalis* L. extract and evaluate their effects on the morphological and biochemical characteristics of safflower (*Carthamus tinctorius* L.).

Method: ZnO-NPs were synthesized using an aqueous extract of *V. officinalis* and characterized by particle size analysis (PSA) and atomic force microscopy (AFM). Foliar applications at 0, 10, 100, 500, and 1000 mg/L were performed in a randomized complete block design. Morphological traits, photosynthetic pigments, and defensive enzyme activities were subsequently evaluated.

Results: Spherical nanoparticles with sizes ranging from 50 to 100 nm were successfully formed. Stem and leaf lengths increased over five weeks; however, differences in stem, leaf, and root lengths compared with the control were not significant ($P > 0.05$). Fresh weight decreased significantly by 27.8% at 100 mg/L ($P < 0.05$). The 1000 mg/L treatment significantly reduced chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid contents ($P < 0.05$). Guaiacol peroxidase activity decreased significantly at 100 and 500 mg/L ($P < 0.01$), while dehydrogenase activity declined at 500 mg/L ($P < 0.05$). Changes in polyphenol oxidase activity and malondialdehyde content were not significant.

Conclusions: Safflower responses to green-synthesized ZnO-NPs were concentration-dependent. Higher concentrations inhibited photosynthetic pigments, whereas intermediate concentrations affected specific enzymatic pathways. Therefore, determining an optimal concentration is essential for the safe and effective application of ZnO-NPs in sustainable agriculture.

Cite this article: Ezazi, M., Behboodan, B., Mahmoodzadeh, H & Jami Moeini, M. (2026). Investigating the Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized with Valerian (*Valeriana officinalis* L.) Flower Extract on some Morphological and Biochemical Characteristics of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Plant. *Nova Biologica Reperta*, 13 (2), 1-23. <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.137496.0>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.137496.0>

Publisher: Kharazmi University.

Introduction

Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) have received increasing attention in agricultural research because of their potential effects on plant growth, nutrient utilization, photosynthetic performance, and physiological responses. However, their effects on plants may vary depending on nanoparticle concentration, physicochemical characteristics, exposure duration, application method, and plant species. Therefore, determining an appropriate concentration is essential before ZnO-NPs can be safely applied in agricultural systems.

Green synthesis provides an environmentally compatible alternative to conventional nanoparticle synthesis methods. Plant extracts contain several bioactive compounds, particularly phenolic compounds and flavonoids, which can participate in nanoparticle formation and stabilization. *Valeriana officinalis* L. is a medicinal plant containing various biologically active compounds and may therefore serve as a suitable biological source for green nanoparticle synthesis.

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is an important oilseed and medicinal crop with considerable agricultural value. The present study aimed to synthesize ZnO nanoparticles using an aqueous extract of *V. officinalis* flowers, characterize the synthesized nanoparticles, and investigate their effects at different concentrations on morphological traits, photosynthetic pigments, lipid peroxidation, and selected enzymatic activities in safflower plants.

Method

For green synthesis of ZnO-NPs, 15 g of dried *V. officinalis* flowers were ground and mixed with 100 mL of distilled water. After heating for 5 min, the extract was filtered. Zinc acetate was used as the precursor, and 1.83 g of zinc acetate prepared in a final volume of 50 mL was added to the plant extract at a ratio of 1:10. The mixture was kept in darkness for 15 min until a color change was observed. The resulting suspension was centrifuged at 12,000 rpm for 20 min, and the precipitate was washed three times with double-deionized water.

Particle size was evaluated using a Particle Size Analyzer (PSA), while Atomic Force Microscopy (AFM) was used to examine nanoparticle morphology and dimensions and to support the PSA findings.

The greenhouse experiment was conducted in a randomized complete block design. Safflower plants were treated with foliar applications of ZnO-NPs at 0, 10, 100, 500, and 1000 mg/L. Six pots were used for each treatment, with one plant maintained in each pot. Greenhouse conditions were approximately 23 °C and 38% relative humidity. The first foliar treatment was applied at the two-leaf stage, followed by two additional applications at 14-day intervals.

Stem and leaf lengths were recorded weekly for five weeks. At the end of the experiment, root length and fresh weight were determined. Chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid contents were measured spectrophotometrically following extraction with 80% acetone. The biochemical responses were evaluated by measuring polyphenol oxidase (PPO), guaiacol peroxidase (GPX), and dehydrogenase activities. Malondialdehyde (MDA) was also determined as an indicator of lipid peroxidation.

Statistical analyses were performed using SPSS version 26 and GraphPad Prism version 10.4.2. Tukey's test was used for one-way analyses and Bonferroni's test for two-way analyses. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

The formation of ZnO nanoparticles was initially indicated by a change in the reaction mixture to a brown color. Particle-size analysis showed that the highest particle frequency occurred in the 40–50 nm range, accounting for approximately 16.7% of the particles. Approximately 97% of the synthesized particles were smaller than 100 nm. AFM analysis showed nanoparticles mainly within the 50–100 nm range, confirming the PSA results. Some localized aggregation was also observed, possibly due to agglomeration during sample preparation and centrifugation. Morphological measurements showed that most growth characteristics were not significantly affected by ZnO-NP treatments. Mean root length was 47.52 ± 10.14 mm. Treatment with 100 mg/L reduced root length to approximately 40.1 mm, corresponding to a 15.6% decrease compared with the control; however, this reduction was not statistically significant ($P > 0.05$). Fresh weight showed a significant response at 100 mg/L. Control plants had a fresh weight of 0.61 ± 0.08 g, whereas plants treated with 100 mg/L ZnO-NPs had a fresh weight of 0.44 ± 0.14 g. This represented a significant 27.8% reduction compared with the control ($P < 0.05$). No statistically significant differences were detected at the other concentrations.

Stem length increased progressively throughout the five-week period, from an overall mean of 37.74 ± 9.87 mm in the first week to 97.11 ± 11.04 mm in the fifth week. Plants exposed to 1000 mg/L generally showed the greatest stem elongation, but the differences among treatments were not statistically significant ($P > 0.05$).

Leaf length showed a similar temporal pattern. Mean leaf length increased from 21.11 ± 2.71 mm in the first week to 61.73 ± 5.67 mm in the fifth week. No significant differences in leaf growth were detected among ZnO-NP concentrations compared with the control.

Photosynthetic pigments were more sensitive to nanoparticle exposure, particularly at the highest concentration. Chlorophyll a showed a slight increase at 10 mg/L, whereas treatment with 1000 mg/L caused a pronounced and statistically significant decrease. Chlorophyll b was also significantly reduced at 1000 mg/L compared with the control. Similarly, carotenoid content decreased markedly at 1000 mg/L. These findings indicate that high concentrations of ZnO-NPs may adversely affect the photosynthetic pigment system of safflower.

Biochemical analysis revealed different concentration-dependent responses among the measured enzymes. PPO activity increased by approximately 12.2% at 500 mg/L and decreased by approximately 43.6% at 1000 mg/L compared with the control. However, none of the changes in PPO activity were statistically significant ($P > 0.05$).

GPX activity was significantly reduced at intermediate nanoparticle concentrations. A reduction of approximately 69.6% was observed at 100 mg/L compared with the control ($P < 0.05$), while treatment with 500 mg/L resulted in an approximately 80.7% reduction ($P < 0.01$). No significant differences were detected at 10 or 1000 mg/L.

MDA content increased by approximately 33.3% at 100 mg/L and decreased by approximately 21.0% at 1000 mg/L compared with the control. However, the differences in MDA content among treatments were not statistically significant ($P > 0.05$), indicating that nanoparticle exposure did not result in a statistically detectable change in lipid peroxidation under the experimental conditions.

Dehydrogenase activity showed its highest level at 10 mg/L, corresponding to an approximately 11.1% increase compared with the control. At higher concentrations, enzyme activity tended to decline. The greatest reduction was observed at 500 mg/L, where dehydrogenase activity decreased by approximately 33.3%; this decrease was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusions

The results demonstrate that the response of safflower to green-synthesized ZnO-NPs was strongly dependent on nanoparticle concentration. Morphological traits such as stem length, leaf length, and root length were relatively unaffected by the treatments, as no statistically significant differences were observed. Although the highest ZnO-NP concentration was associated with greater numerical stem elongation, this response was not statistically significant and therefore should not be interpreted as definitive evidence of growth stimulation.

In contrast, fresh biomass and photosynthetic pigments were more sensitive to nanoparticle exposure. The significant reduction in fresh weight at 100 mg/L demonstrates that ZnO-NPs can affect biomass accumulation even when changes in linear growth parameters are limited. More importantly, the significant decreases in chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids at 1000 mg/L indicate that high nanoparticle concentrations may interfere with pigment metabolism and photosynthetic function.

The enzymatic responses were also selective rather than uniform. PPO activity remained statistically unchanged, whereas GPX activity was significantly reduced at 100 and 500 mg/L and dehydrogenase activity was significantly inhibited at 500 mg/L. In contrast, MDA content did not change significantly, suggesting that changes in enzymatic activities and photosynthetic pigments were not accompanied by a generalized increase in lipid peroxidation.

Overall, the green synthesis method successfully produced ZnO nanoparticles predominantly within the nanoscale range. Foliar application of these nanoparticles induced concentration-dependent morphological and biochemical responses in safflower. High concentrations, particularly 1000 mg/L, showed potential phytotoxic effects on photosynthetic pigments, while intermediate concentrations affected specific enzymatic pathways.

These findings emphasize the importance of determining an optimal concentration before the agricultural application of ZnO-NPs. Further studies should investigate nanoparticle uptake and translocation, their molecular mechanisms of action, long-term effects on plant growth and yield, and their behavior under different environmental conditions to establish safe and effective applications in sustainable agriculture.

Conflict of Interest

According to the authors, there is no conflict of interest.

بررسی اثر نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره گل سنبل الطیب (Valeriana officinalis L.) بر برخی خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی گیاه گلرنگ (Carthamus tinctorius L.)

مرتضی اعزازی^۱، بیتا بهبودیان^۲، هما محمودزاده^۳، متین جامی معینی^۴

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران. رایانامه: morteza.ezazi@iau.ir

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. رایانامه: b.behoodian@iau.ac.ir

۳. گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. رایانامه: mahmoodzadeh@iau.ac.ir

۴. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران. رایانامه: m.jamimoeini@iau.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و کاربردهای کشاورزی مورد توجه قرار گرفته‌اند. سنتز سبز با عصاره‌های گیاهی، روشی زیست‌سازگار برای کاهش ترکیبات سمی و بهبود پایداری نانوذرات است. این مطالعه با هدف سنتز سبز ZnO-NPs با عصاره سنبل الطیب (<i>Valeriana officinalis</i> L.) انجام شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۴/۰۷	مواد و روش‌ها: نانوذرات با عصاره آبی سنبل الطیب سنتز و با PSA و AFM مشخصه‌یابی شدند. محلول‌پاشی برگ‌ها در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام و شاخص‌های مورفولوژیک، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های دفاعی ارزیابی شدند.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۵/۰۷	نتایج: نانوذرات کروی با اندازه ۵۰-۱۰۰ نانومتر تشکیل شدند. طول ساقه و برگ طی پنج هفته افزایش یافت، اما تغییرات طول ساقه، برگ و ریشه نسبت به شاهد معنی‌دار نبود ($P>0.05$). وزن تر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۲۷٫۸٪ کاهش یافت ($P<0.05$). غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش معنی‌دار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها شد ($P<0.05$). فعالیت گایاکول پراکسیداز در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ($P<0.01$) و دهیدروژنازاها در ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ($P<0.05$) کاهش یافت، درحالی‌که تغییرات پلی‌فنل اکسیداز و مالون‌دی‌آلدئید معنی‌دار نبود.
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۷	نتیجه‌گیری: پاسخ گلرنگ به ZnO-NPs وابسته به غلظت بود؛ غلظت‌های بالا موجب مهار رنگدانه‌های فتوسنتزی و غلظت‌های متوسط سبب تغییر برخی مسیرهای آنزیمی شدند. بنابراین، تعیین غلظت بهینه برای کاربرد ایمن این نانوذرات در کشاورزی پایدار ضروری است.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۳۱	
کلیدواژه‌ها: سنتز سبز، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیمی، محلول‌پاشی برگ، پراکسیداسیون لیپیدی	

استناد: اعزازی، مرتضی؛ بهبودیان، بیتا؛ هما، محمودزاده و جامی معینی، متین (۱۴۰۵). عنوان مقاله. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۱۳ (۲)، ۲۳-۱.

<https://doi.org/10.22034/nbr.2026.137496.0>



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه خوارزمی.

مقدمه

اکسید روی (ZnO) یک ترکیب با کاربردهای قابل توجه در زمینه‌های مختلف از جمله پزشکی و علوم زیست محیطی است (۱). سنتز سبز نانوذرات به روش‌های سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات با استفاده از مواد بیولوژیکی مانند گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها اشاره دارد. از این رو، کاربردهای بالقوه آن در زمینه‌های مختلف به طور قابل توجهی مورد توجه استفاده قرار گرفته است (۲). استفاده از این روش سبب می‌شود تا تولید محصولات جانبی سمی در طی تولید نانوذرات به حداقل برسد و در عین حال پایداری و عملکرد نانوذرات تولید شده را نیز افزایش می‌دهد (۳). به طور کلی، سنتز سبز جایگزین مناسبی برای روش‌های مرسوم است که با اهداف توسعه پایدار همسو می‌شود. شایان ذکر است که این فرایند زیست‌سازگاری نانوذرات را نیز افزایش می‌دهد (۲). استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان عوامل احیاء کننده و تثبیت‌کننده در فرآیند سنتز سبز، برجسته‌ترین دلیل استفاده از فرایند سنتز سبز نانوذرات است (۴). نانوذرات اکسید روی می‌توانند رشد و نمو گیاه را با بهبود کارایی فتوسنتزی و جذب مواد مغذی، به‌ویژه در محصولاتی مانند گندم و برنج، افزایش دهند (۵،۶). در حالی که مزایای ZnO در کاربردهای گیاهی امیدوارکننده است، نگرانی‌هایی در مورد سمیت نانوذرات در غلظت‌های خاص وجود دارد (۱). پاسخ گیاهان به نانوذرات اکسید روی می‌تواند تحت تأثیر عواملی همچون غلظت نانوذره، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن، روش کاربرد، مدت زمان مواجهه و گونه گیاهی قرار گیرد (۷).

نانوذرات به عنوان یک ابزار دگرگون‌کننده در افزایش عملکرد گیاه، به‌ویژه در زمینه مدیریت تنش غیرزیستی و بهره‌وری کلی محصول پدیدار شده‌اند. نانوذرات فلزی مانند نقره، طلا و روی با افزایش جذب مواد مغذی، فعال کردن ژن‌های پاسخ‌دهنده به استرس و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، رشد گیاه را با افزایش بهره‌وری به طور متوسط ۲۰ درصد و کاهش بروز بیماری تا ۵۰ درصد بهبود می‌بخشند (۸). علاوه بر این، نانوذرات فرآیندهای فیزیولوژیکی بهتری را تسهیل می‌کنند و گیاهان را قادر می‌سازند تا در برابر تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری مقاومت کنند، در نتیجه عملکرد و کیفیت را بهبود می‌بخشند (۹،۱۰). ادغام نانوذرات در بیوچار فواید قابل توجهی از جمله بهبود رشد و عملکرد دانه در گلرنگ تحت شرایط تنش شوری با افزایش در دسترس بودن مواد مغذی و کاهش تجمع مضر سدیم نشان داده است (۱۰).

نانوذرات اکسید روی (ZnO) سنتز شده از عصاره‌های گیاهی به دلیل خواص ضد باکتریایی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی، پتانسیل قابل توجهی در طب گیاهی نشان داده است. مطالعات مختلف سنتز سازگار با محیط زیست نانوذرات اکسید روی با استفاده از مواد گیاهی مانند *Catharanthus roseus* (L.) G. Don و *Chamaecostus cuspidatus* (Nees & Mart.) C. Specht & D. W. Stev. را برجسته می‌کنند که نه تنها زیست‌سازگاری آن‌ها را افزایش می‌دهد، بلکه خواص دارویی گیاهان مورد استفاده را نیز حفظ می‌کند (۱۱-۱۳). این نانوذرات فعالیت ضد باکتریایی موثری در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها از جمله *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* از خود نشان می‌دهند که آن‌ها را به کاندیدایی امیدوارکننده برای درمان عفونت تبدیل می‌کند (۱۴،۱۳). علاوه بر این، فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آنها کاربردهای بالقوه‌ای را در مدیریت شرایطی مانند مسائل بهداشت دهان و دندان و التهاب مزمن نشان می‌دهد (۱۲). با این حال، در حالی که نانوذرات اکسید روی خواص چند منظوره را نشان می‌دهند، نگرانی‌ها در مورد پایداری و اثرات سیتوتوکسیک آن‌ها در محیط‌های بیولوژیکی، تحقیقات بیشتری را برای بهینه‌سازی استفاده از آن‌ها در نانوپزشکی ضروری می‌کند (۱۵). به طور کلی، استفاده از نانوذرات اکسید روی یک رویکرد امیدوارکننده با کاربردهای درمانی است. نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) جذب مواد مغذی را افزایش می‌دهند، نسبت یون‌های سدیم به پتاسیم (+Na+/K) را تنظیم می‌کنند، تعادل آب را حفظ می‌کنند، تجمع یون‌ها را فعال می‌کنند و اثرات منفی عوامل استرس‌زای غیرزیستی مانند استرس شوری را کاهش می‌دهند (۱۶).

Valeria officinalis L. که معمولاً با نام سنبل الطیب شناخته می‌شود، یک گیاه علفی چند ساله متعلق به خانواده Valerianaceae است که عمدتاً در اروپا و آسیا یافت می‌شود. از نظر تاریخی، از آن برای خواص دارویی خود، به‌ویژه به عنوان یک عامل آرام‌بخش و ضد اسپاسم، برای رفع شرایطی مانند بی‌خوابی، اضطراب، و تحریک پذیری عصبی استفاده شده است (۱۷-۱۹). بخش‌های دارویی گیاه شامل اجزای زیرزمینی خشک شده، مانند ریزوم‌ها و ریشه‌ها است که باید استانداردهای خاصی را برای محتوای اسانس و اسید سسکوئی ترپنیک مطابق با فارماکوپه اروپایی داشته باشند (۱۸). اثرات دارویی سنبل

الطیب به مخلوط پیچیده ای از ترکیبات فعال زیستی از جمله والپوتریات ها، ایریدولاکتون ها و فلاونوئیدها نسبت داده می شود (۱۸،۱۹). عصاره گیاه سنبل الطیب حاوی ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتی اکسیدان می باشد که نقش احیاکنندگی دارند. عصاره این گیاه با محلول نمک فلزی ترکیب شده و باعث کاهش یون های فلزی و تشکیل نانوذرات می شود (۲۰).

Carthamus tinctorius L. معمولاً به نام گلرنگ شناخته می شود. عصاره ها و روغن *C. tinctorius* در توسعه دارو با فعالیت های دارویی متعدد در جهان مهم هستند. این گیاه عمدتاً برای بذر آن که به عنوان روغن خوراکی استفاده می شود، کشت می شود (۲۱). گل های این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانی قابل توجهی هستند که به فیتوکمیکال های مختلف نسبت داده می شود و آن ها را برای مسائل زیست پزشکی مانند فشار خون بالا و مدیریت کلسترول مفید می کند (۲۲). به طور کلی، *C. tinctorius* هم ارزش کشاورزی و هم فواید سلامتی را نشان می دهد، که اکتشاف بیشتر و بهینه سازی کشت را تضمین می کند. در حوزه کشاورزی، استفاده از کودهای زیستی و معدنی می تواند با بهبود رشد و توسعه گیاه گلرنگ، موجب افزایش عملکرد دانه، ارتفاع بوته و میزان محتوای روغن آن شود. ترکیب بهینه کودهای نیتروژن و فسفر، همراه با کودهای زیستی خاص، به طور قابل توجهی باعث افزایش عملکرد و خواص بیوشیمیایی مانند محتوای فنول و فلاونوئید کل می شود (۲۳،۲۴). در کاربردهای پزشکی، گلرنگ پتانسیل درمانی را در درمان سکنه مغزی ایسکمیک نشان می دهد، در درجه اول به دلیل فلاونوئیدهای آن که التهاب و استرس اکسیداتیو را کاهش می دهند، آپوپتوز عصبی را مهار می کنند و جریان خون را افزایش می دهند. علاوه بر این، نشان داده شده است که تیمارهایی مانند هیدروپرایمینگ و هورموپرایمینگ تنش شوری را در طول جوانه زنی بذر کاهش داده و باعث رشد بهتر گیاهچه می شود (۲۵). به طور کلی، *C. tinctorius* مزایای کشاورزی و دارویی قابل توجهی را نشان می دهد که پتانسیل بالا در کاربرد را تضمین می کند.

این مطالعه با هدف بررسی تغییرات ریخت شناسی و بیوشیمیایی حاصل از تیمار گیاه گلرنگ با نانوذرات سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه سنبل الطیب انجام شد.

مواد و روش ها

تهیه گیاه سنبل الطیب و بذر گیاه گلرنگ

گیاه سنبل الطیب از مرکز فروش گیاهان دارویی مشهد خریداری شد. بذر گیاه گلرنگ از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری گردید.

سنتز سبز نانوذرات اکسید روی

۱۵ گرم گل خشک شده گیاه سنبل الطیب آسیاب و سپس با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه همراه با گرمادهی مخلوط و در نهایت از کاغذ صافی عبور داده شد. جهت سنتز نانوذره، ۱/۸۳ گرم نمک استات روی به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و با نسبت ۱:۱۰ به عصاره تهیه شده اضافه گردید. سپس ۱۵ دقیقه در فضای تاریک قرار داده شد تا واکنش با تغییر رنگ محلول کامل شد. جهت تغلیظ نانوذرات تشکیل شده، محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب تشکیل شده در ۳ مرحله با آب دو بار دیونیزه شست و شو داده شد.

مشخصه یابی نانوذرات اکسید روی

اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه Nanoparticle Size Analyzer و مورفولوژی آن ها با میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی (AFM) بررسی شد.

کاشت بذر گیاه گلرنگ

به منظور بررسی تأثیر نانوذرات اکسید روی سنتز شده بر ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*)، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی اجرا گردید. بذر ها پس از ضدعفونی سطحی، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک زراعی غنی شده کشت شدند. هر تیمار شامل ۶ تکرار (گلدان) بود و در هر گلدان تعداد ۱ بوته به عنوان واحد آزمایشی نگهداری شد. شرایط محیطی گلخانه شامل دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۸ درصد و دوره نوری استاندارد تنظیم گردید.

تیمار با نانوذرات اکسید روی

حجم معینی از محلول‌های نانوذره اکسید روی سنتز شده در غلظت‌های مختلف (بر حسب میلی گرم در لیتر) تهیه شد و به گلدان‌ها با فواصل معین (اولین اسپری برگی نانوذرات اکسید روی با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر در مرحله دو برگی و دومین و سومین اسپری با فاصله ۱۴ روز بعد از اولین اسپری، انجام شد) اسپری شدند (۷).

اندازه‌گیری‌های ریخت شناسی

اندازه‌های ساقه و برگ گیاهان هر هفته اندازه‌گیری و ثبت شد. پس از اتمام دوره تیمار، گیاهان به دقت جمع‌آوری شده و برخی پارامترهای ریخت شناسی شامل طول ریشه، طول ساقه، وزن تر و بخش هوایی اندازه‌گیری شد. طول ریشه و ساقه با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و میانگین طول ریشه و ساقه در هر تکرار بر اساس واحد سانتی‌متر گزارش شد. جهت تعیین وزن تر و طول ریشه و بخش هوایی، پس از برداشت نمونه‌ها، شست‌وشو با آب مقطر انجام شد و پس از توزین، میانگین وزن ساقه و ریشه در هر تکرار بر حسب گرم گزارش شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند تا خشک شوند و سپس اندازه‌گیری‌های وزن خشک ریشه و ساقه در هر تکرار محاسبه گردید.

سنجش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و b و کارتنوئیدها)

مقدار نیم گرم از برگ هر تیمار با ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ در هاون چینی کاملاً ساییده و سپس محلول حاصل صاف گردید و در سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا باقی‌مانده گیاهی تفکیک گردد. عصاره جداشده فوقانی به بالن شیشه‌ای منتقل شد. مقداری از نمونه داخل بالن در کووت اسپکتروفتومتر ریخته شد و سپس به صورت جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ nm برای کلروفیل a، ۶۴۵ nm برای کلروفیل b و ۴۷۰ nm برای کارتنوئیدها در دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی و مقدار جذب قرائت گردید. در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر، میزان کلروفیل‌های a و b و کارتنوئیدها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد.

$$\begin{aligned}\text{Chlorophyll a} &= (19.3 * A_{663} - 0.86 * A_{645}) V / 100 * W \\ \text{Chlorophyll b} &= (19.3 * A_{645} - 0.86 * A_{663}) V / 100 * W \\ \text{Carotenoids} &= (100 * A_{470}) - 3.27 \text{ mg chl. A} - 104 \text{ mg chl. B} / 227\end{aligned}$$

در این فرمول‌ها V = حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، A = جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر و W = وزن تر نمونه بر حسب گرم هستند.

اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی

فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز و دهیدروژنازها با روش رنگ‌سنجی سنجیده شد. همچنین مقدار مالون‌دی‌آلدئید نیز اندازه‌گیری شد. جهت سنجش فعالیت آنزیمی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ابتدا نمونه‌ها در هاون به همراه PBS

هموژنایز گردید. سپس نمونه‌ها به میکروتیوب افزوده و در دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. لوله‌های آزمایش در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، گرم شدند و ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول پیروگال ۲ درصد به هر لوله افزوده شد. پس از افزایش دمای هر لوله حاوی محلول تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی نمونه به محلول اضافه شد. جذب محلول در ۴۳۰ نانومتر و هر ۳۰ ثانیه و مجموعاً به ۴ دقیقه خوانش شد. در مورد آنزیم گایاکول پراکسیداز، نمونه‌ها در هاون به همراه PBS هموژنایز گردید. سپس به میکروتیوب افزوده و در دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه و یک لوله نیز بدون نمونه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به هر لوله به میزان ۵۰ میکرولیتر گایاکول و ۵۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید افزوده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول نهایی به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. مقادیر جذب بر اساس پروتکل‌های متفاوت در ۴۳۶، ۵۱۹ و ۵۵۰ نانومتر، هر ۳۰ ثانیه و مجموعاً به ۴ دقیقه خوانش شد. در اندازه‌گیری مقدار آنزیم مالون دی‌آلدهید در پراکسیداسیون لیپیدی از کیت شرکت کیازیت استفاده گردید. همچنین جهت بررسی فعالیت آنزیمی دهیدروژنازها در ابتدا سوبسترای TTC از ترکیب ۰٫۱ گرم TTC به همراه ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه تهیه گردید. سپس از هر نمونه به میزان ۱۰ گرم جدا شد و از هر نمونه ۵ گرم در یک میکروتیوب قرار گرفت، بنابراین از هر نمونه ۲ میکروتیوب کنار گذاشته شد که یکی لوله آزمون و دیگری کنترل نام گرفت. پس از این مرحله بر روی نمونه‌های میکروتیوب‌های آزمون، ۲٫۵ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه ۱ میلی‌لیتر از سوبسترای TTC ریخته شد و میکروتیوب‌های کنترل با ۳٫۵ میلی‌لیتر آب مقطر پر شدند. تمامی میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. به هر لوله میزان ۱۰ میلی‌لیتر متانول افزوده و سپس به مدت ۷ دقیقه ورتکس شدند. پس از فیلتر کردن نمونه‌ها، جذب آن‌ها در ۴۸۵ نانومتر خوانده شد و مقادیر تولید TPF بر حسب درصد در جدول مجزا نوشته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و بررسی جداول، از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۶) استفاده شد. همچنین برای تحلیل‌های تکمیلی و ترسیم نمودارها، از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۱۰٫۴٫۲) بهره گرفته شد؛ به‌طوری‌که برای آنالیزهای یک‌طرفه از آزمون تعقیبی Tukey و برای آنالیزهای دوطرفه از آزمون Bonferroni استفاده گردید. سطح معناداری برای تمامی مقایسات آماری در حدود $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد و تفاوت‌های معنی‌دار در نمودارها با استفاده از ستاره‌های معنی‌داری (*) نمایش داده شدند.

نتایج

کاشت گیاه، مشخصه‌یابی و مورفولوژی نانوذرات

گیاه گلرنگ در تیمارهایی با ۶ تکرار کاشته شدند و در هر گلدان تعداد ۱ بوته به عنوان واحد آزمایشی نگهداری شد.



شکل ۱- گیاه گلرنگ کاشته شده در تکرارهای ۶ تایی

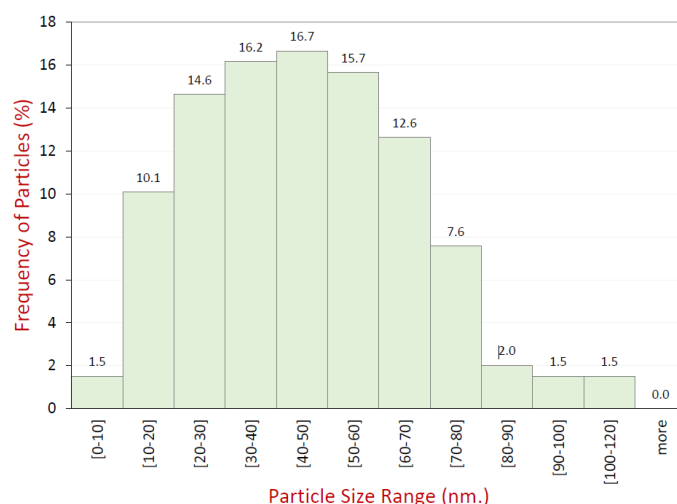
Figure 1. Safflower plant planted in 6 replicates

شواهد اولیه سنتز نانوذرات از طریق تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات به رنگ قهوه‌ای به عنوان یک شاهد کیفی نشان داده شد (شکل ۲). اندازه نانوذرات اکسید روی با استفاده از دستگاه Particle Size Analyzer سنجیده شد و نتایج در شکل ۳ آورده شده است. بیشترین تعداد نانوذرات در ابعاد ۴۰ تا ۵۰ نانومتر با فراوانی ۱۶/۷ درصد می‌باشد. ۹۷٪ ذرات نمونه دارای اندازه‌ای کمتر از ۱۰۰ نانومتر داشتند.



شکل ۲- تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات اکسید روی به رنگ قهوه‌ای

Figure 2. Color change of a solution containing zinc oxide nanoparticles to brown

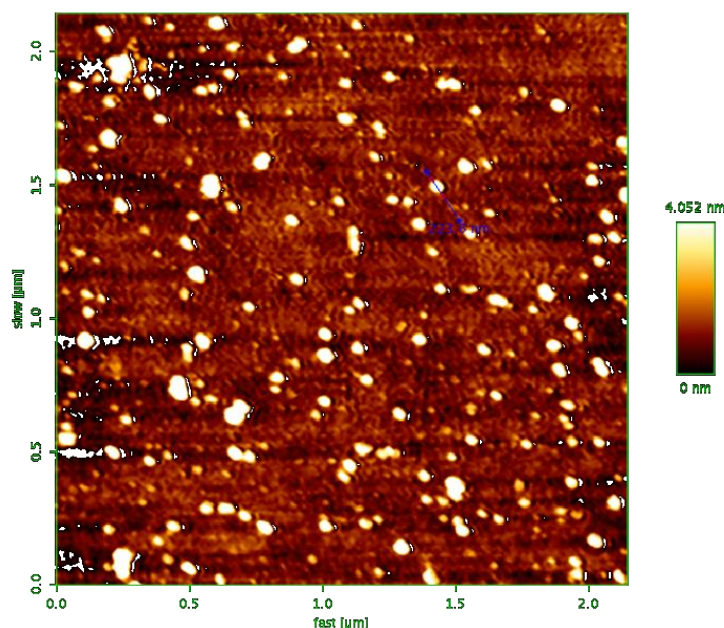


شکل ۳- فراوانی نانوذرات در ابعاد مختلف بر اساس تکنیک Particle Size Analyzer

Figure 3. Graph of the abundance of nanoparticles in different dimensions based on the Particle Size Analyzer technique

نتایج میکروسکوپ الکترونی نیروی اتمی (AFM) نانوذرات اکسید روی

آنالیز میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) به منظور بررسی مورفولوژی سطحی و ابعاد نانوذرات سنتز شده (شکل ۴) و همچنین بررسی همخوانی نتایج حاصل از Particle Size Analyzer انجام شد. نتایج AFM حضور نانوذراتی در محدوده اندازه ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر را نشان داد که با نتایج حاصل از آنالیز اندازه ذرات همخوانی داشت. تجمع مشاهده شده در برخی نواحی می‌تواند ناشی از آگلومره شدن نانوذرات طی مراحل آماده سازی نمونه و سانتریفیوژ باشد.



شکل ۴- تصویر حاصل از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)
Figure 4. Atomic force microscope (AFM) image

اندازه‌گیری های مورفولوژیکی گیاه

طول ریشه: در این پژوهش میانگین طول ریشه گیاه 47.52 ± 10.14 میلی‌متر (با دامنه حداقل ۲۵.۵۳ و حداکثر ۷۳.۲۸ میلی‌متر و ضریب تغییرات ۲۱.۳۴٪) ثبت گردید (جدول ۱). ارزیابی شکل ۵ نشان داد که اگرچه غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به کاهش طول ریشه به ۴۰.۱ میلی‌متر (۱۵.۶٪ کاهش نسبت به شاهد ۴۷.۵ میلی‌متر) شد، اما هیچ‌یک از غلظت‌های نانوذرات اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ایجاد نکردند. ($P > 0.05$)

وزن تر: میانگین کل وزن تر گیاه برابر با 0.528 ± 0.105 گرم (۲۱.۳۴٪ CV) بود (جدول ۱). مطابق شکل ۶، وزن تر در گروه شاهد برابر با 0.61 ± 0.08 گرم ثبت شد. اعمال غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش معنی‌دار وزن تر به 0.44 ± 0.14 گرم گردید که نشان‌دهنده ۲۷.۸٪ کاهش نسبت به شاهد است. ($P < 0.05$, *) در سایر غلظت‌ها تغییرات نسبت به شاهد معنادار نبود.

سنجش رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها):

تأثیر نانوذرات بر محتوای رنگدانه‌ها با ۳ فرمول مختلف ارزیابی شد (شکل‌های ۷، ۸ و ۹):

در تمام فرمول‌ها، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش جزئی محتوای کلروفیل a شد، اما افزایش غلظت تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به شکل معنی‌داری باعث کاهش محتوای کلروفیل a نسبت به بالاترین غلظت / شاهد گردید ($P < 0.0001$, ****).

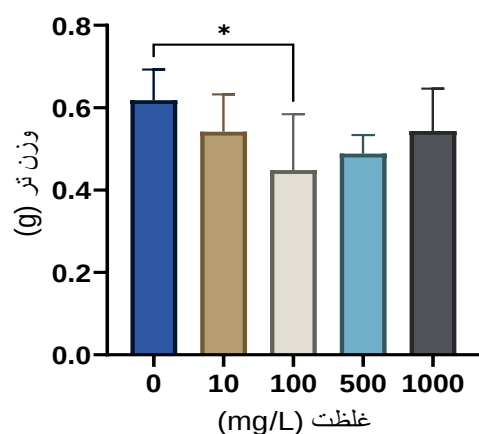
محتوای کلروفیل b تحت تأثیر غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به گروه کنترل دچار کاهش معنی‌دار گردید ($P < 0.05$, * در فرمول‌های ۱ و ۳؛ $P < 0.01$ در فرمول ۲).

سنجش کاروتنوئیدها نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات به ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افت شدید و معنی‌داری در میزان این رنگدانه نسبت به شاهد ایجاد کرد ($P < 0.001$, *** در فرمول ۱ و ۳؛ $P < 0.0001$, **** در فرمول ۲).

جدول ۱- اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک طول ریشه، وزن و میزان کلروفیل

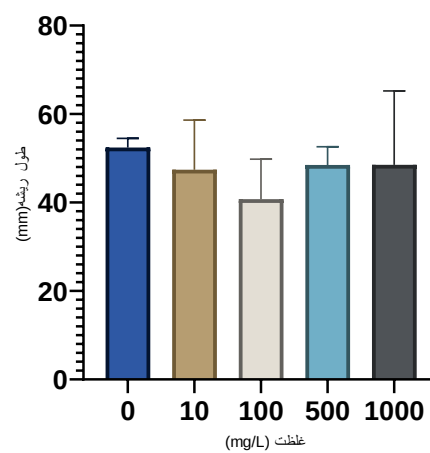
Table 1. Morphological measurements of root length, weight and chlorophyll content

CV %	SD	Mean	Max	Min	N	متغیر
۲۱/۳۴۰۶	۱۰/۱۴۲۴۴	۴۷/۵۲۶۳	۷۳/۲۸	۲۵/۵۳	۳۰	طول ریشه
۱۹/۹۹۰۵	۰/۱۰۵۵۵	۰/۵۲۸۰	۰/۷۳	۰/۲۴	۳۰	وزن تر
۲۱/۵۲۲۴	۹/۲۱۴۰۵	۴۲/۸۱۱۱	۶۲/۰۰	۲۳/۱۰	۱۸	میزان کلروفیل



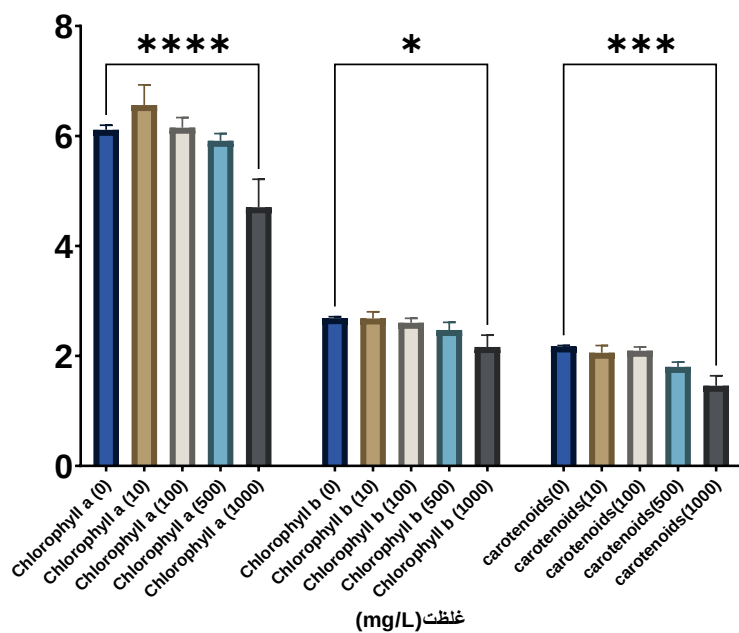
شکل ۶- وزن تر گیاه گلرنگ در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/l

Figure 6. Fresh weight of safflower plant at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l



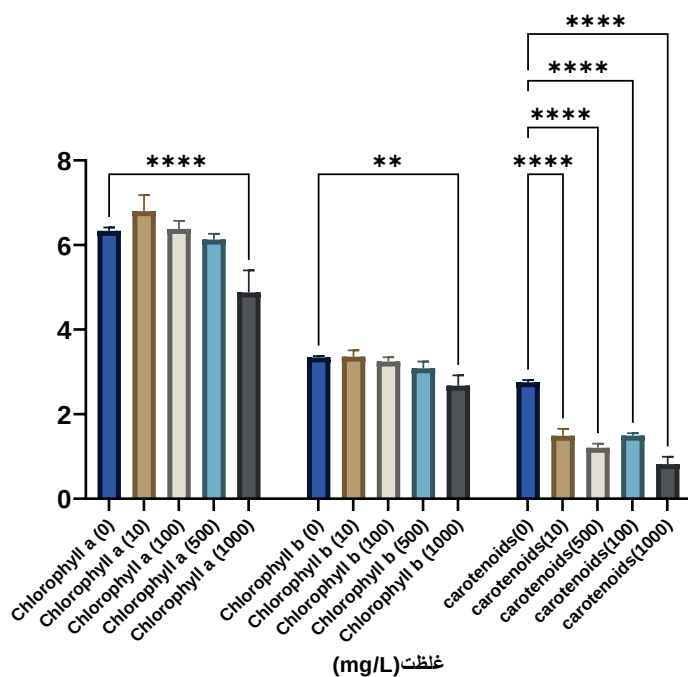
شکل ۵- طول ریشه گیاه گلرنگ در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/l

Figure 5. Root length of safflower plant at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l



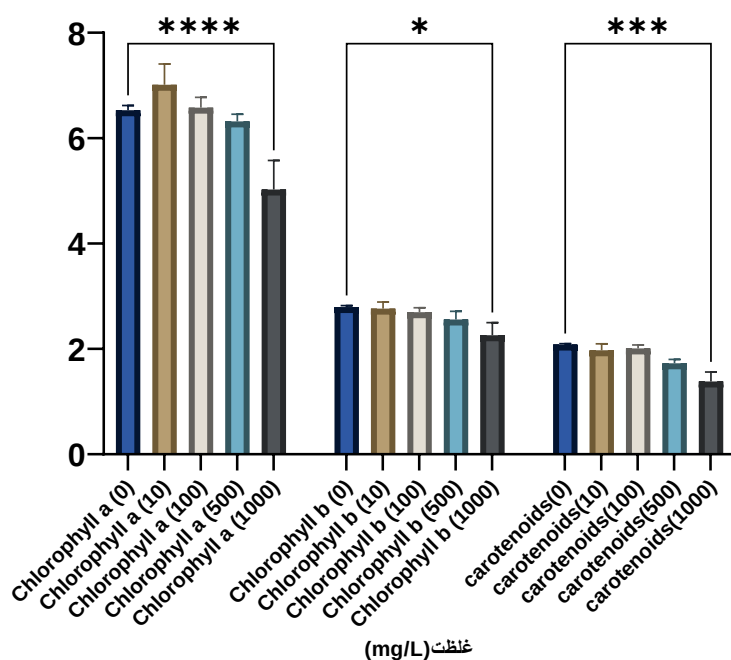
شکل ۷- سنجش میزان کلروفیل گیاه گلرنگ (فرمول ۱)

Figure 7. Measuring the chlorophyll content of safflower plants (Formula 1)



شکل ۸- سنجش میزان کلروفیل گیاه گلرنگ (فرمول ۲)

Figure 8. Measuring the chlorophyll content of safflower (Formula 2)



شکل ۹- سنجش میزان کلروفیل گیاه گلرنگ (فرمول ۳)

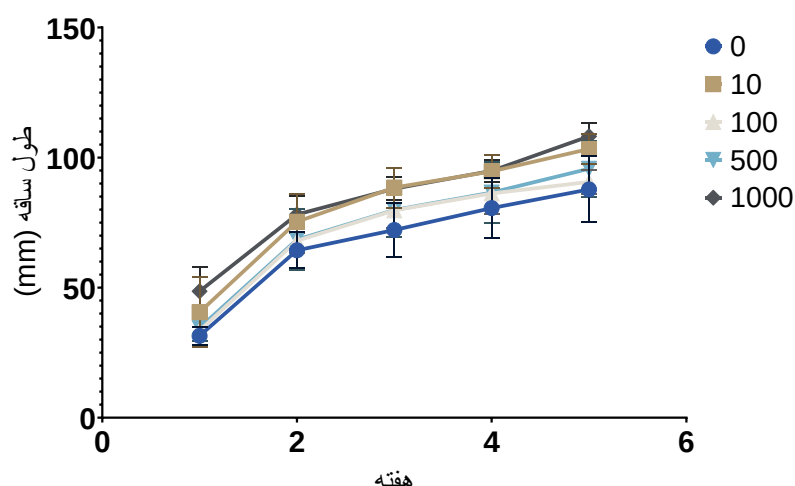
Figure 9. Measuring the chlorophyll content of safflower (Formula 3)

طول ساقه: با توجه به شکل ۱۰، میانگین کلی طول ساقه از 37.74 ± 9.87 میلی‌متر در هفته اول به 11.04 ± 97.11 میلی‌متر در هفته پنجم رسید (جدول ۲). بررسی روند رشد طول ساقه در غلظت‌های مختلف نشان داد که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در طی تمام هفته‌ها بیشترین مقدار رشد را القا کرد، اما تفاوت آماری معنی‌داری بین تیمارها در هفته‌های مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۲- آمار توصیفی اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک طول ساقه

Table 2. Descriptive statistics of morphological measurements of stem length

متغیر طول ساقه	N	Min	Max	Mean	SD	CV %
هفته اول	۳۰	۲۵/۹۱	۶۳/۲۰	۳۷/۷۴۰۰	۹/۸۷۲۲۵	۲۶/۱۵۸۵
هفته دوم	۳۰	۵۶/۵۷	۹۰/۶۶	۷۰/۸۶۰۰	۹/۵۴۷۰۱	۱۳/۴۷۳۰
هفته سوم	۳۰	۶۲/۲۷	۹۹/۷۰	۸۱/۶۵۳۷	۹/۸۹۵۹۵	۱۲/۱۱۹۴
هفته چهارم	۳۰	۷۰/۰۲	۱۰۷/۳۷	۸۸/۵۸۳۰	۹/۸۹۲۹۶	۱۱/۱۶۸۰
هفته پنجم	۳۰	۷۵/۳۰	۱۱۵/۶۰	۹۷/۱۱۵۷	۱۱/۰۴۷۱۱	۱۱/۳۷۵۲



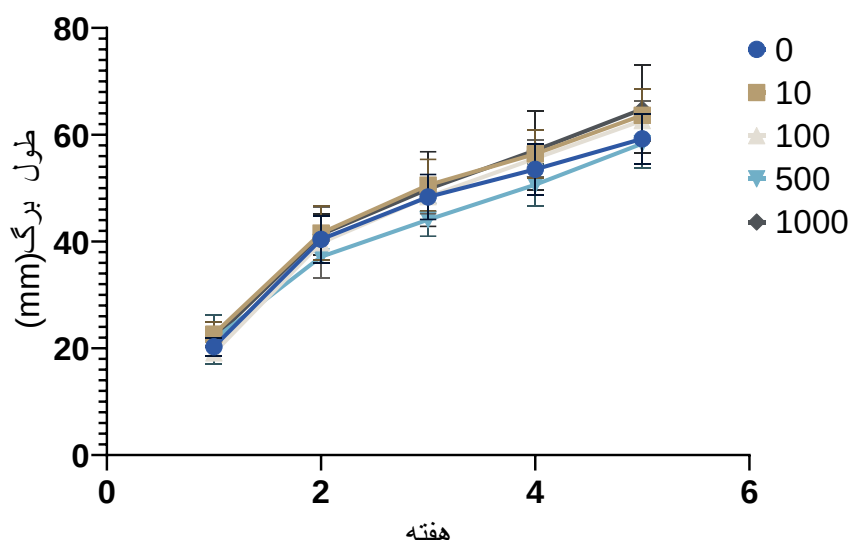
شکل ۱۰- نمودار بررسی‌های مورفولوژیک طول ساقه گیاه گلرنگ طی پنج هفته در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۰ mg/l
Figure 10. Diagram of morphological studies of safflower plant stem length over five weeks at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l

طول برگ: میانگین طول برگ از 21.11 ± 2.71 میلی‌متر در هفته اول تا 61.73 ± 5.67 میلی‌متر در هفته پنجم افزایش یافت (جدول ۳ و شکل ۱۱). بر اساس آنالیز دوطرفه، نرخ رشد طول برگ در تمامی غلظت‌ها روند صعودی مشابهی داشت و هیچ اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نانوذره نسبت به گروه شاهد در طول زمان ثبت نگردید. ($P > 0.05$)

جدول ۳- آمار توصیفی اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک طول برگ

Table 3. Descriptive statistics of morphological measurements of leaf length

متغیر طول برگ	N	Min	Max	Mean	SD	CV %
هفته اول	۳۰	۱۷/۱۴	۳۰/۳۰	۲۱/۱۱۷۷	۲/۷۱۹۴۲	۱۲/۸۷۷۴
هفته دوم	۳۰	۲۹/۷۸	۴۷/۱۰	۴۰/۰۴۸۷	۴/۷۹۴۵۶	۱۱/۹۷۱۸
هفته سوم	۳۰	۳۹/۹۶	۶۱/۷۵	۴۸/۲۵۸۳	۴/۹۱۲۲۱	۱۰/۱۷۸۹
هفته چهارم	۳۰	۴۵/۱۸	۷۰/۰۱	۵۴/۶۴۸۷	۵/۲۱۲۵۹	۹/۵۳۸۳
هفته پنجم	۳۰	۵۱/۴۱	۷۹/۲۳	۶۱/۷۳۲۰	۵/۶۷۴۳۸	۹/۱۹۱۹



شکل ۱۱- نمودار بررسی‌های مورفولوژیک طول برگ گیاه گلرنگ طی پنج هفته در غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/l
Figure 11. Diagram of morphological studies of safflower leaf length over five weeks at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l

بررسی پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

به منظور ارزیابی پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی بر اساس محتوای مالون‌دی‌آلدئید، پلی‌فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز و دهیدروژنازها در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در ادامه ارائه شده است.

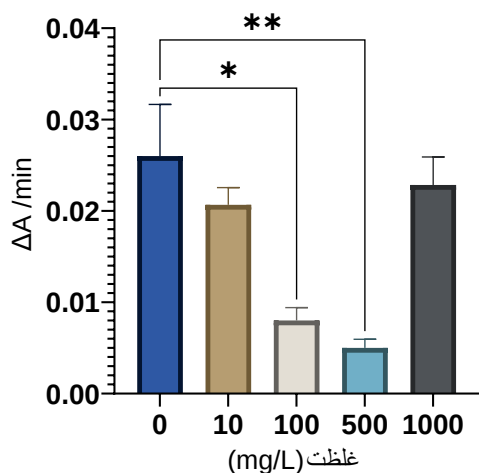
فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO): بیشترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (با حدود ۱۲٫۲٪ افزایش نسبت به شاهد) و کمترین میزان آن در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (با ۴۳٫۶٪ کاهش نسبت به شاهد) مشاهده شد؛ با این وجود، تحلیل‌های آماری نشان داد که تغییرات فعالیت این آنزیم در تمامی غلظت‌ها نسبت به گروه شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار آماری بود ($p > 0.05$; شکل ۱۲).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): تیمار با نانوذرات منجر به کاهش فعالیت این آنزیم نسبت به گروه شاهد گردید. فعالیت آنزیم در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش چشمگیری نشان داد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۶۹٫۶٪ کاهش نسبت به شاهد) اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) و در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۸۰٫۷٪ کاهش نسبت به شاهد) اختلاف بسیار معنی‌دار در سطح ۱ درصد ($p < 0.01$) با گروه کنترل به ثبت رسید. در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد ($p > 0.05$; شکل ۱۳).

میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA): سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی نشان داد که بیشترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۳۳٫۳٪ افزایش نسبت به شاهد) و کمترین آن در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۲۱٫۰٪ کاهش نسبت به شاهد) رخ داده است. با این حال، تفاوت میزان MDA در هیچ‌یک از غلظت‌های نانوذره نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$; شکل ۱۴).

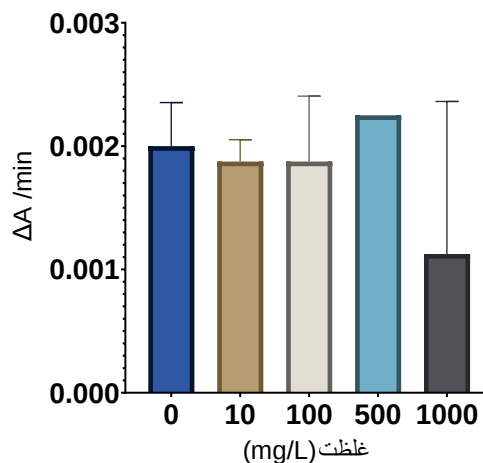
فعالیت آنزیمی دهیدروژنازها: بیشترین میزان فعالیت در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر (با ۱۱٫۱٪ افزایش نسبت به شاهد) ثبت شد، در حالی که با افزایش غلظت نانوذرات، فعالیت آنزیم روندی کاهشی نشان داد. کمترین میزان فعالیت در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با ۳۳٫۳٪ کاهش نسبت به شاهد مشاهده شد که این کاهش از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ($p > 0.05$).

در سایر غلظت‌ها (۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد وجود نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۱۵).



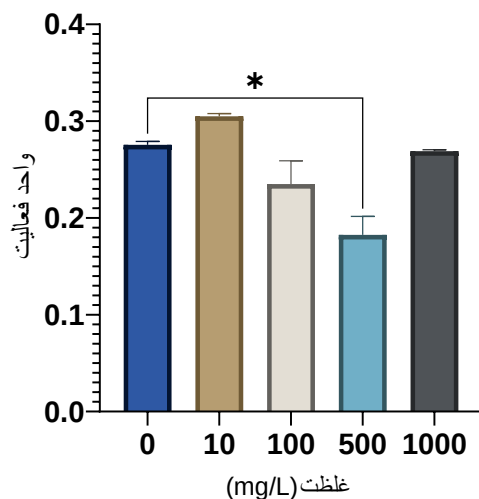
شکل ۱۳- نمودار سنجش فعالیت آنزیمی آنزیم گایاکول پراکسیداز در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۰ mg/l

Figure 13. Diagram of measuring the enzymatic activity of guaiacol peroxidase at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l.



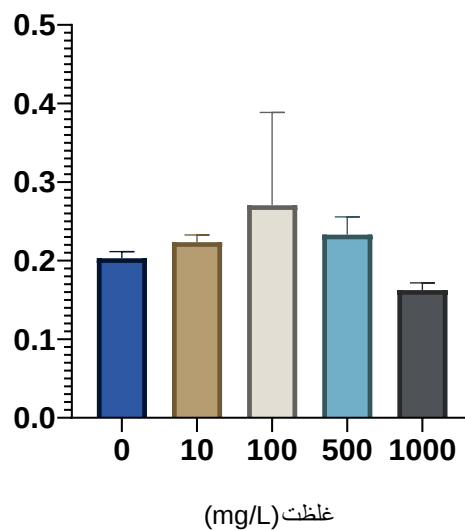
شکل ۱۲- سنجش فعالیت آنزیمی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۰ mg/l

Figure 12. Measurement of the enzymatic activity of polyphenol oxidase at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l.



شکل ۱۵- سنجش فعالیت آنزیمی دهیدروژنازها در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۰ mg/l

Figure 15. Measurement of enzymatic activity of dehydrogenases at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l.



شکل ۱۴- سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۱۰، ۰ mg/l

Figure 14. Measurement of malondialdehyde at concentrations of 0, 10, 100, 500 and 1000 mg/l.

بحث و نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج حاصل از بررسی نانوذرات سنتز شده، صحت و درستی روش سنتز نانوذره با ابعاد مناسب جهت جذب توسط گیاه مشخص شد. مطابق با آنچه که در این مطالعه انجام شد، افزایش طول ساقه در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر رخ داده است در حالی که این افزایش طول معنی‌دار نبوده است. اگرچه روند افزایشی در اندازه برگ مشاهده شد، اما تفاوت ایجاد شده بین تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مورد تغییرات طول ریشه نیز مشابه با تغییرات مورفولوژیک پیشین، هیچ تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید. در بررسی مربوط به تغییرات رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش غلظت تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سبب کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a گردید. در مورد کلروفیل b و کاروتنوئیدها نیز تاثیر غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر همراه با کاهش معنی‌دار مشاهده شد. تغییرات در وزن تر گیاه در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به گروه کنترل اختلاف و کاهش معنی‌داری نشان دادند. بر این اساس غلظت‌های بالا مانند ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر ممکن است باعث تحریک رشد ساقه از طریق بهبود جذب روی (Zn) به عنوان ریزمغذی شوند (۲۶). همچنین عدم تأثیر بر ریشه می‌تواند ناشی از محدودیت در انتقال نانوذرات به بخش‌های زیرزمینی باشد. نتایج یک مطالعه نشان داده است که محلول پاشی ZnO-NPs تأثیر قابل توجهی بر ارتفاع بوته، عرض ساقه و سطح برگ گونه‌ای گوجه فرنگی داشت (۲۷). تصور می‌شود که تأثیر مثبت ZnO-NP ها به دلیل افزایش اسید آمینه تریپتوفان است که تولید اکسین‌های مبتنی بر ایندول را افزایش می‌دهد (۲۸). در مطالعه دیگری بر روی گیاه گوجه فرنگی، مشخص شد که استفاده از محلول ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ZnO-NPs از طریق محلول پاشی منجر به افزایش تعداد بوته‌های گوجه فرنگی می‌شود (۲۹). مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۴ نشان داد که نانوذرات ZnO می‌توانند فتوسنتز، رشد ساقه، و توسعه جوانه‌های گیاه چای را بهبود بخشند، که به واسطه افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فتوسنتز و تنظیم عناصر معدنی صورت می‌گیرد (۳۰). این یافته‌ها با افزایش طول ساقه در غلظت‌های بالا در مطالعه حاضر هم‌راستا هستند و نشان می‌دهند که ZnO-NPs می‌توانند مسیرهای فیزیولوژیکی گیاه را تحریک کنند. به طور کلی، استفاده از نانوذرات اکسید روی ممکن است رشد گیاه را، به ویژه از نظر ارتفاع، با تسهیل آزادسازی مواد مغذی ضروری برای توسعه محصول افزایش دهد (۲۶). نانوذرات با تغییر اجزای اکسیداتیو، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و سنتز DNA بر واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه تأثیر می‌گذارند و به طور بالقوه بر بهره‌وری گیاه و توسعه پایدار تأثیر می‌گذارند (۳۰). در یک مطالعه مشخص شد که نانوذرات می‌توانند ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه را با القای استرس اکسیداتیو، آسیب DNA، تغییر بیان ژن و ایجاد تغییرات اپی ژنتیکی مختل کنند (۳۱). بر این اساس نتایج محلول پاشی در این مطالعه به صورت هم‌سو با برخی مطالعات، اختلاف معنی‌دار در طول ساقه و طول ریشه را نشان داد. در مقابل به کارگیری نانوذرات در برخی مطالعات منجر به نتایج منفی و نامطلوب شده است. به عنوان مثال نانوذرات می‌توانند ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه را با تأثیر بر جوانه زنی بذر، تولید زیست‌توده و یکپارچگی غشای سلولی مختل کنند که منجر به اثرات نامطلوب بالقوه بر رشد گیاه می‌شود (۳۱). این تفاوت ممکن است ناشی از تفاوت در گونه گیاهی یا روش کاربرد نانوذرات باشد. نتایج این مطالعه با پژوهش‌های قبلی همسو است که نشان می‌دهند نانوذرات ZnO می‌توانند رشد گیاه را از طریق بهبود جذب مواد مغذی و کاهش سمیت یون‌های مضر تحت تنش‌های محیطی افزایش دهند (۳۲-۳۴).

بیشترین فعالیت آنزیمی در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر مربوط به آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز بود به طوری که افزایش فعالیت در آنزیم پلی فنل اکسیداز به صورت غیرمعنی‌دار و در مورد آنزیم گایاکول پراکسیداز به صورت معنی‌دار مشاهده شد. بر این اساس غلظت‌های بالا مانند ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر احتمالاً با مهار رادیکال‌های آزاد، استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند. اما در مقابل غلظت متوسط ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر ممکن است با القای استرس اکسیداتیو خفیف، سیستم دفاعی گیاه را فعال کنند. نانوذرات بر واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه تأثیر می‌گذارند و بر تحمل استرس، رشد و استرس اکسیداتیو تأثیر می‌گذارند. آن‌ها در سطح بیوشیمیایی برهمکنش دارند و بر سیستم‌های آنتی اکسیدانی و مسیرهای مختلف در گیاهان تأثیر می‌گذارند (۳۵). به طور ویژه، نانوذرات اکسید فلز می‌توانند با تغییر غشاها، فعال کردن سیستم‌های دفاعی و القای انفجار اکسیداتیو بر متابولیسم گیاه تأثیر بگذارند و مسیرهای بیوشیمیایی در گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند (۳۶). نانوذرات استرس اکسیداتیو را در سلول‌های گیاهی القا می‌کنند و بر سیستم‌های دفاعی آنزیمی تأثیر می‌گذارند و منجر به مهار و تحریک فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌شوند و در نهایت رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۳۷).

از منظر زیست‌محیطی، سنتز سبز نانوذرات ZnO با استفاده از گیاهان دارویی مانند *V. officinalis*، به دلیل وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، موجب کاهش سمیت و افزایش پایداری نانوذرات می‌شود (۳۸). این ویژگی‌ها در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد، جایی که غلظت‌های بالا موجب کاهش استرس اکسیداتیو و غلظت‌های متوسط موجب تحریک سیستم دفاعی گیاه شدند. بررسی حاضر نشان داد که سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه سنبل‌الطیب نه تنها با موفقیت انجام شد، بلکه ذراتی با اندازه مناسب و ویژگی‌های مطلوب حاصل گردید. الگوی پاسخ گیاه گلرنگ به نانوذرات ZnO در غلظت‌های مختلف متفاوت بود به طوری که غلظت متوسط ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش معنی‌دار وزن تر و تحریک فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. در مقابل در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش بیشتری در طول ساقه مشاهده شد، اما فعالیت آنزیمی کاهش یافت. همچنین تغییرات کلروفیل و طول برگ معنی‌دار نبودند، که بیانگر تأثیر انتخابی نانوذره بر ویژگی‌های گیاه است. به‌طور کلی، استفاده هوشمندانه از غلظت‌های بهینه ZnO-NPs می‌تواند عملکرد فیزیولوژیکی و دفاعی گیاه گلرنگ را تقویت کرده و در مسیر کشاورزی پایدار، راهکاری موثر برای افزایش رشد و مقاومت گیاهان ارائه دهد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آنهاست.

مشارکت نویسندگان

مرتضی اعزازی: تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها، انجام آزمایش و گردآوری داده‌ها، انجام محاسبات، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، تحلیل و تفسیر اطلاعات و نتایج، تهیه پیش‌نویس مقاله. بیتا بهبودیان: استاد راهنمای پایان‌نامه، طراحی پژوهش، نظارت بر مراحل انجام پژوهش، بررسی و کنترل نتایج، اصلاح، بازبینی و نهایی‌سازی مقاله. هما محمودزاده: استاد مشاور پایان‌نامه، مشارکت در طراحی پژوهش، نظارت بر پژوهش، مطالعه و بازبینی مقاله. متین جامی معینی: استاد مشاور پایان‌نامه، مشارکت در طراحی پژوهش، نظارت بر پژوهش، مطالعه و بازبینی مقاله.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

حامی مالی

مقاله حاضر بدون حمایت از سازمان خاصی انجام گردیده است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد به خاطر حمایت معنوی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. از داوران محترم نیز به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Jeon YN, Ryu SJ, Lee HY, Kim JO, Baek JS. Green Synthesis of Silver Nanoparticle Using Black Mulberry and Characterization, Phytochemical, and Bioactivity. *Antibiotics*. 2024;13(8):1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080686>
2. Cortez Caillahua M, Cuadro Oria SM. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using extract of onion (*Allium cepa*) peel. *Journal of Nanotechnology*. 2024;6(1):1-6. [doi:10.32829/nanoj.v6i1.212](https://doi.org/10.32829/nanoj.v6i1.212).

3. Ekinci A, Şahin Ö, Kutluay S, Horoz S, Canpolat G, Çokyaşa M, et al. Designing copper-doped zinc oxide nanoparticle by tobacco stem extract-mediated green synthesis for solar cell efficiency and photocatalytic degradation of methylene blue. *Int J Phytoremediation* [Internet]. 2024 Nov 9;26(13):2183–93. Available from: <https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2379605>
4. Strekalovskaya EI, Perfileva AI, Krutovsky K V. Zinc Oxide Nanoparticles in the “Soil–Bacterial Community–Plant” System: Impact on the Stability of Soil Ecosystems. *Agronomy*. 2024;14(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy14071588>
5. Pandya P, Kumar S, Patil G, Mankad M, Shah Z. Impact of ZnO nanopriming on physiological and biochemical traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *CABI Agric Biosci* [Internet]. 2024;5(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s43170-024-00228-z>
6. Chanu T, Meetei TT, Devi Y, Panda S, Upadhyaya H. Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs): a promising nanoparticle in renovating plant science. *Acta Physiol Plant*. 2021 Oct 1;43. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03307-0>
7. Javed R, Khan B, Sharafat U, Bilal M, Galagedara L, Abbey L, Cheema M. Dynamic interplay of metal and metal oxide nanoparticles with plants: Influencing factors, action mechanisms, and assessment of stimulatory and inhibitory effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2024;271:115992. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.115992.
8. Francis D V., Abdalla AK, Mahakham W, Sarmah AK, Ahmed ZFR. Interaction of plants and metal nanoparticles: Exploring its molecular mechanisms for sustainable agriculture and crop improvement. *Environ Int* [Internet]. 2024;190(June):108859. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108859>
9. Zulfiqar H, Afroze B, Shakoor S, Bhutta MS, Ahmed M, Hassan S, et al. Nanoparticles in Agriculture: Enhancing Crop Resilience and Productivity against Abiotic Stresses. In 2024. DOI: 10.5772/intechopen.114843
10. Ghassemi-Golezani K, Mousavi SA, Farhangi-Abriz S. Enriched biochars with silicon and calcium nanoparticles mitigated salt toxicity and improved safflower plant performance. *Int J Phytoremediation*. 2024 Feb 27;26(8):1359–68. <https://doi.org/10.1080/15226514.2024.2321167>
11. Kumar B, Ramesh B, Srinivasan K, Supraja N, Pitchika GK. Zinc Oxide Nanoparticles Synthesis Using Herbal Plant Extracts and Its Applications. In 2023. p. 221–49. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5454-2_8
12. Malaiappan S, P T P, Niveditha S. Green Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Catharanthus roseus* Extract: A Novel Approach. *Cureus*. 2024;16(5). <https://doi.org/10.7759/cureus.60407>
13. Kayalvizhi R, Vijayashanthi R, Vijaya V, Neyvasagam K. Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Employing *Costus igneus* Leaf Extract and their Antibacterial, Antifungal and Anticarcinogenic Activities. *Asian J Chem*. 2022 Aug 19;34:2357–62. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2022.23886>
14. Salman S, Taki M, Jameel Hadi S, Jasim A. Green synthesis and Characterization of Zinc Nanoparticles using Herbal plant Extracts with their Influence on some Bacterial Infection. *Res J Pharm Technol*. 2022 Jul 29;3147–52. <https://doi.org/10.52711/0974-360x.2022.00526>

15. RS. Analytical Study of Zinc-Oxide Nanoparticles for Human Health. *Int J Multidiscip Res*. 2023;5(5):1–7. <https://doi.org/10.36948/ijfmr.2023.v05i05.7095>
16. Ahmed M, Tóth Z, Decsi K. The Impact of Salinity on Crop Yields and the Confrontational Behavior of Transcriptional Regulators, Nanoparticles, and Antioxidant Defensive Mechanisms under Stressful Conditions: A Review. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5). <https://doi.org/10.3390/ijms25052654>
17. Mungali M, Gauri, Tripathi A, Singhal S. *Valeriana officinalis* (valerian). *Nat Occur Chem against Alzheimer's Dis*. 2020;(January):283–91. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819212-2.00023-2>
18. Kokitko VIB, Odyntsova VM. *Valeriana officinalis* (Valerian) – review. 2024;1(44):79–87. <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2024.1.290436>
19. Nandhini S, Narayanan KB, Ilango K. *Valeriana Officinalis*: a Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018;11(1):36. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v11i1.22588>
20. Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chin J Integr Med*. 2013 Feb;19(2):153–9. <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1354-5>
21. VRIJENDRA SINGH, N M KOLEKAR, N NIMBKAR. Maximization of flower yield in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J Oilseeds Res*. 2013;30(1). <https://doi.org/10.56739/jor.v30i1.142756>
22. Ghiyasi M, Rezaee Danesh Y, Amirnia R, Najafi S, Mulet JM, Porcel R. Foliar Applications of ZnO and Its Nanoparticles Increase Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Growth and Yield under Water Stress. *Agronomy*. 2023;13(1):1–13. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010192>
23. Lamichhane G, Devkota HP, Sai K, Poudel P. *Carthamus tinctorius* L.: Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. In: *Medicinal Plants of the Asteraceae Family: Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities*. 2022. p. 103–23. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6080-2_7
24. Gürsoy M. Morphological and biochemical changes with hormone and hydropriming applications in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings under salinity stress conditions. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca*. 2023;51(3). <https://doi.org/10.15835/nbha51313282>
25. Ahmed M, Marrez DA, Rizk R, Zedan M, Abdul-Hamid D, Decsi K, et al. The Influence of Zinc Oxide Nanoparticles and Salt Stress on the Morphological and Some Biochemical Characteristics of *Solanum lycopersicum* L. *Plants*. 2024;13(10). <https://doi.org/10.3390/plants13101418>
26. Hamzah Saleem M, Usman K, Rizwan M, Al Jabri H, Alsafran M. Functions and strategies for enhancing zinc availability in plants for sustainable agriculture. *Front Plant Sci*. 2022;13(October):1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1033092>

27. Sun L, Wang Y, Wang R, Wang R, Zhang P, Ju Q, et al. Physiological, transcriptomic, and metabolomic analyses reveal zinc oxide nanoparticles modulate plant growth in tomato. *Environ Sci Nano*. 2020 Nov 16;7:3587–604. <https://doi.org/10.1039/d0en00723d>
28. Khanm H, Vaishnavi BA, Shankar AG. Raise of Nano-Fertilizer Era: Effect of Nano Scale Zinc Oxide Particles on the Germination, Growth and Yield of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2018;7(05):1861–71. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.219>
29. Alabdallah NM, Kotb E. Nanoparticles: unveiling the impact on biochemical reactions in plants. In: Tombuloglu H, Tombuloglu G, Al-Suhaimi E, Baykal A, Hakeem KRBMI of N on P and A, editors. *Molecular Impacts of Nanoparticles on Plants and Algae* [Internet]. Academic Press; 2024. p. 195–209. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323957212000154>. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95721-2.00015-4>
30. Chen H, Song Y, Wang Y, Wang H, Ding Z, Fan K. Zno nanoparticles: improving photosynthesis, shoot development, and phyllosphere microbiome composition in tea plants. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2024;22(1):389. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02667-2>
31. H. G. D, Shilpa N, Singh S, Aiyaz M, Abhilash MR, Nataraj K, et al. Toxicological effects of nanoparticles in plants: Mechanisms involved at morphological, physiological, biochemical and molecular levels. *Plant Physiol Biochem*. 2024 Apr 1;210:108604. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108604>
32. Ali B, Saleem MH, Ali S, Shahid M, Sagir M, Tahir MB, et al. Mitigation of salinity stress in barley genotypes with variable salt tolerance by application of zinc oxide nanoparticles. *Front Plant Sci*. 2022;13(August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.973782>
33. Mogazy AM, Hanafy RS. Foliar Spray of Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles Alleviate Salinity Stress Effect on *Vicia faba* Plants. *J Soil Sci Plant Nutr* [Internet]. 2022;22(2):2647–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00833-9>
34. El-Badri AMA, Batool M, Mohamed IAA, Khatab A, Sherif A, Wang Z, et al. Modulation of salinity impact on early seedling stage via nano-priming application of zinc oxide on rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Physiol Biochem*. 2021;166(June):376–92. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.040>
35. Raj A, Sriwastaw S, Rai KK, Rai R, Singh S, Rai LC. Impact of nanoparticles on biochemical reactions. In: *Molecular Impacts of Nanoparticles on Plants and Algae*. 2024. p. 249–75. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95721-2.00009-9>
36. Iram D, Sansi MS, Singh P, Chandhni PR, Zanab S, Rana S, et al. Effect of metal oxide nanoparticles on biochemical pathways in plants. In: *Nanometal Oxides in Horticulture and Agronomy*. 2023. p. 19–49. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91809-1.00018-4>
37. Khlebnikova DA, Polivanova OB, Boytsova M V., Chepovoy II, Munkhbaatar NO, Cherednichenko MY. Physiological Aspects of Interaction of Nanoparticles with Plant and

Microorganism Cells. Timiryazev Biol J. 2023;(2):77–93. <https://doi.org/10.26897/2949-4710-2023-2-77-93>

38. Mahajan M, Kumar S, Gaur J, Kaushal S, Dalal J, Singh G, et al. Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Justicia adhatoda* for photocatalytic degradation of malachite green and reduction of 4-nitrophenol. RSC Adv. 2025;15(4):2958–80. <https://doi.org/10.1039/d4ra08632e>