نشریه فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۵، شماره ۷۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۵ صفحه: ۲۳۵-۲۱۷
https://doi.org/10.22034/15.71.217

مقاله پژوهشی

پاسخ‌های مورفولوژی، فیزیولوژی و بیان ژن‌های بیوسنتز منتول در گیاه نعناع‌فلفلی (*Mentha piperita* L.) تحت اثر نانوذره اکسید مس

سمیه جامی، حمید سبحانیان*، عنایت‌اله یزدان‌پناه، غلامرضا بخشی خانیکی

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

چکیده

با توجه به اهمیت گیاه دارویی نعناع‌فلفلی و خواص ضدمیکروبی و ضدالتهابی منتول و همچنین با عنایت به توانایی الیسیتورهای نانوذره‌ای اکسید مس (CuO) در القاء پاسخ‌های فیزیوبیولوژیکی، این مطالعه در دانشگاه پیام‌نور تهران در سال ۱۴۰۴ با هدف بررسی اثرگذاری تیمار نانوذرات CuO بر صفات نعناع‌فلفلی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه انجام شد. اولین محلول‌پاشی نانوذرات CuO با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی نعناع‌فلفلی حدود چهار ماه پس از کاشت استولون‌ها و دومین محلول‌پاشی هم یک ماه بعد از محلول‌پاشی اول انجام شد. غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک درحالی‌که غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به کاهش این صفات شدند. تمام غلظت‌های نانوذرات تأثیر منفی بر کلروفیل داشتند و باعث کاهش این رنگدانه شدند. در مقابل، کارتنوئید، پروتئین و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با افزایش غلظت نانوذرات، افزایش یافتند و به عبارتی پاسخ وابسته به غلظت نشان دادند. در رابطه با آنتوسیانین، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر معنی‌داری بر این صفات نداشت درحالی‌که ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش این صفات شدند. درصد اسانس و بیان ژن‌های *LS* و *MFS* نیز تنها در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر تحت تأثیر نانوذرات قرار گرفتند. در کل، پاسخ صفات به نانوذرات CuO وابسته به غلظت نانوذره و نوع صفت بود. افزایش غلظت نانوذره CuO سبب ایجاد تنش اکسیداتیو و فعالسازی سامانه آنتی‌اکسیدانت آنزیمی و غیرآنزیمی می‌شود. همگام با این پاسخ، درصد اسانس و بیان ژن‌های بیوسنتز منتول به عنوان یک متابولیت افزایش می‌یابند. بنابراین، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات CuO برای القاء پاسخ‌های رشدی مثبت در گیاه نعناع فلفلی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: الیسیتور، اسانس، گیاهان دارویی، متابولیت ثانویه

مقدمه

نعناع‌فلفلی (*Mentha piperita* L.) یک گیاه دارویی هیبرید بین

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۱۰، بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۱۸، پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱، اولین انتشار: ۱۴۰۵/۰۲/۱۲

* نویسنده مسئول، رایانامه: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir

حق انتشار این مستند، متعلق به انجمن فیزیولوژی گیاهی ایران است. ۱۴۰۳ ©

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:
Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

M. aquatica و *M. spicata* که از اهمیت صنعتی و دارویی به سزایی برخوردار است. اسانس *M. piperita* در طعم‌دهی مواد غذایی، محصولات آرایشی و بهداشت دهان و دندان استفاده می‌شود (Veleshkolaii *et al.*, 2024). از نظر دارویی، *M. piperita* به دلیل خواص درمانی ویژه خود از جمله توانایی در تسکین مشکلات گوارشی، سردرد و شرایط تنفسی شناخته می‌شود (McKay and Blumberg, 2024). این خواص عموماً به دلیل ترکیبات فعالی مانند منتول است که دارای اثرات ضدمیکروبی، ضدالتهابی و مسکن است (Mahendran and Rahman, 2020).

منتول از طریق مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها تولید می‌شود که با تشکیل ایزوپنتنیل دی‌فسفات و دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات، به عنوان بلوک‌های سازنده ترپن‌ها، شروع می‌شود (Kamatou *et al.*, 2023). این پیش‌سازها به ژرانیل دی‌فسفات تبدیل می‌شوند که سپس تحت فعالیت آنزیم لیمونن سنتاز منجر به تولید لیمونن می‌شود. پس از آن لیمونن به ترانس-ایزوپیپریتنول تبدیل می‌شود، که بعداً به پیپریترون و در نهایت به منتول احیا می‌یابد (Trevisan *et al.*, 2017). دو ژن مهم در این مسیر، لیمونن سنتاز و منتوفوران سنتاز اند. لیمونن سنتاز مرحله سیکلیزاسیون را آغاز می‌کند که برای تشکیل اسکلت منتول لازم است، درحالی‌که منتوفوران سنتاز مسیر را به سمت تولید منتوفوران منحرف می‌کند. تنظیم بیان این ژن‌ها برای بهینه‌سازی تولید منتول در *M. piperita* مهم است، زیرا آنها به طور مستقیم بر کارایی و تعادل مسیر بیوسنتزی تأثیر می‌گذارند و بر محتوای منتول برای کاربردهای صنعتی و دارویی تأثیر می‌گذارند (Chakraborty *et al.*, 2022).

السیتورهای نانوذره‌ای به طور فزاینده‌ای برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند و رویکردی امیدوارکننده برای بهبود بازده تولید ترکیبات زیست‌فعال در گیاهان شناخته می‌شوند (Inam *et al.*, 2023). در میان این نانومواد، نانوذرات اکسید مس (Cu_2O) به خاطر خصوصیات منحصر به فرد و اثربخشی خود، توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند. نانوذرات اکسید مس به عنوان الیسیتورهای غیرزیستی عمل کرده و مکانیسم‌های دفاعی گیاه و مسیرهای متابولیکی را تحریک می‌کنند که سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها می‌شوند (Humbal and Pathak, 2023). این نانوذرات همچنین به بافت‌های گیاهی نفوذ کرده و با اجزای سلولی تعامل برقرار می‌کنند، تنش اکسیداتیو ایجاد کرده و مسیرهای سیگنال‌دهی را فعال می‌نمایند که در نهایت بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهند (Holghoomi and Colagar, 2024). علاوه‌براین، نانوذرات اکسید مس زیست‌سازگار، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست‌اند، که آنها را به گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای زراعی تبدیل کرده است. نانوذرات اکسید مس به دلیل نقش دوگانه خود نه تنها در افزایش تولید متابولیت‌ها، بلکه در بهبود رشد گیاه و تحمل به تنش‌ها، به عنوان ابزاری مفید برای بهینه‌سازی کشت گیاهان دارویی پیشنهاد می‌شوند (Zhang *et al.*, 2022).

تا کنون، مطالعات متعددی در رابطه با شناخت تأثیر الیسیتورهای نانوذره‌ای اکسید مس بر صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گونه‌های گیاهی انجام شده است که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود. برای مثال، Ameri و همکاران (۲۰۲۵) در بررسی تأثیر نانوذره مس (۵، ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام) بر صفات گیاه مورینگا (*Moringa oleifera*) دریافتند که محلول‌پاشی نانومس سبب افزایش وزن تر اندام هوایی و کربوهیدارت‌ها و کاهش کلروفیل می‌شود. بر اساس نتایج آنها، تأثیر نانوذره مس بر صفات گیاه مورینگا وابسته به غلظت بود به نحوی‌که غلظت‌های پایین مؤثر درحالی‌که غلظت‌های بالای دارای اثر سمی بودند. Shafiq و همکاران (۲۰۲٤) با ارزیابی پاسخ ذرت (*Zea mays*) به غلظت ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید مس متوجه شدند که غلظت‌های پایین نانوذرات اکسید مس سبب افزایش صفات رشد و محتوای کلروفیل درحالی‌که غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید مس باعث کاهش این صفات شد. Mahawar و همکاران (۲۰۲٤) در آزمایش خود بر روی اثر نانوذرات اکسید مس (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) دریافتند که نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و محتوای آنتوسیانین می‌شود. Naderi و همکاران (۲۰۲۳) تأثیر محلول‌پاشی برگی نانوذرات اکسید مس (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) را بر صفات رازیانه (*Foeniculum vulgare*) مورد مطالعه قرار دادند. آنها نشان دادند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی، محتوای کلروفیل a و b، زیست‌توده و درصد اسانس شد. در مقابل، محلول‌پاشی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر سمیت سلولی نشان داد. Amooaghaie و Naderi (۲۰۲۳) اثر نانوذرات اکسید مس (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) را صفات رازیانه مورد مطالعه قرار دادند. محلول‌پاشی برگی با نانوذرات تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، باعث بهبود رشد، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، تجمع اسمولیت‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. در مقابل، غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس سبب کاهش این صفات شد. لذا نویسندگان پیشنهاد کردند که غلظت کم نانوذرات اکسید مس سبب تقویت، درحالی‌که کاربرد غلظت زیاد آنها باعث تضعیف صفات رازیانه می‌شود. در پژوهشی دیگر، Khaldari و همکاران (۲۰۲٤) نشان دادند که تیمار نانوذره مس سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز آلکالوئید مورفین در خشخاش (*Papaver orientale*) می‌شود. علیرغم این مطالعات، هنوز تأثیر نانوذره اکسید مس بر پاسخ‌های مورفولوژی، فیزیولوژی، و بیان ژن‌های لیمونن سنتاز و منتوفوران سنتاز مسیر بیوسنتز منتول در گیاه دارویی نعناع‌فلفلی مورد بررسی قرار نگرفته است.

با توجه به اهمیت گیاه دارویی *M. piperita* و خواص ترکیب منتول و همچنین با عنایت به توانایی الیسیتورهای نانوذره‌ای اکسید مس، این مطالعه با هدف بررسی اثرگذاری نانوذره اکسید مس بر پاسخ‌های فیزیولوژی، مورفولوژی، بیوشیمیایی و بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز منتول در گیاهان دارویی *M. piperita* انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار آزمایشی: این آزمایش در دانشگاه پیام‌نور تهران در سال ۱٤۰٤ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه با شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس و شاهد بدون استفاده از نانوذره بود. استولون‌های ۵ سانتی‌متری حاوی حداقل دو گره *M. piperita* در گلدان‌های پلاستیک حاوی دو قسمت خاک باغچه مرغوب، یک قسمت خاک‌برگ و یک قسمت ماسه نرم کشت شدند. اولین محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی *M. piperita* حدود چهار ماه پس از کاشت استولون‌ها و دومین محلول‌پاشی هم یک ماه بعد از محلول‌پاشی اول انجام شد. برای هر تکرار و تیمار، ۱۵ میلی‌لیتر نانوذره مس محلول‌پاشی شد. غلظت‌های نانوذره بر اساس مطالعه Naderi و همکاران (۲۰۲۳) انتخاب شدند. سه روز بعد از اتمام دوره تیماردهی گیاهان، گروه‌های تیمار و شاهد برای سنجش صفات نمونه‌برداری شدند. نمونه‌برداری به شکل برداشت برگ‌های جوان سوم و چهارم راس گیاهان بود. جهت اجرای آنالیزهای آزمایشگاهی، نمونه‌ها در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نانوپودر اکسید مس با مشخصات زیر از شرکت Fine-Nano خریداری شد: جرم مولی نقره ۷۹/۵٤ گرم بر مول؛ خلوص نانوپودر: ۹۹/۹۹ درصد؛ اندازه ذرات نانو: ٤۰ نانومتر؛ شکل ذرات: شبه‌کروی شکل؛ رنگ نانوپودر: تیره. آنالیز طیف‌سنجی فرابنفش نانوذرات، اطلاعات نانوذرات ارائه شده توسط شرکت سازنده را تأیید کرد. طیف‌سنجی فرابنفش، حداکثر جذب را در طول‌موج ۲۷۰ نانومتر نشان داد. برای تهیه غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس، ابتدا محلول استوک تهیه و سپس در یک بالن حجم‌سنجی ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت تا ذرات کاملاً پخش شوند. از این محلول استوک، با رقیق‌سازی‌های متوالی، غلظت‌های مورد نظر

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

در بالن‌های حجم‌سنجی جداگانه تهیه شدند. قبل از هر بار استفاده محلول تکان خورد و مجدداً سونیکیت کوتاه‌مدت انجام شد تا از یکنواختی محلول نانوذره‌ای اطمینان شود.

اندازه‌گیری صفات،ارتفاع و وزن اندام هوایی: وزن تر و خشک گیاهان به کمک ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ تعیین شد. پس از اندازه‌گیری وزن تر، نمونه‌ها به مدت ٤٨ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند تا وزن خشک آنها تعیین شود.

رنگدانه‌های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری محتوای برگی رنگیزه‌های کاروتنوئید و کلروفیل، نخست ۰/۵ گرم برگی به همراه ۳۰ میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد توسط هاون چینی به خوبی ساییده شد. سپس، عصاره برگی در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه، جذب فازهای بالایی نمونه‌ها از طریق اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٦٦٢، ٦٤٥ و ٤٧٠ نانومتر خوانده شد. در آخر، از فرمول‌های زیر برای تعیین غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها استفاده شد. در این فرمول‌ها، A همان میزان جذب در هر طول‌موج است (Asle-Mohammadi *et al*., 2024).

$$Chl\ a = (12.25 \times A663.2 - 2.79 \times A646.8)$$
$$Chl\ b = (21.50 \times A646.8 - 5.1 \times A663.2)$$
$$Total\ chl = (7.15 \times A663.2 + 18.71 \times A646.8)$$
$$Car = (1000 \times A470 - 1.82 \times Chl\ a - 85.02 \times Chl\ b)/198$$

آنتوسیانین: ابتدا ۰/۱ گرم از وزن تر برگی در ۱۰میلی‌لیتر متانول اسیدی حل و خرد شد. بعد از سانتریفوژ عصاره به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور، فاز بالای آن جداسازی و به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰\ mM^{-1}cm^{-1}$ برای تعیین غلظت آنتوسیانین استفاده شد (Asle-Mohammadi *et al*., 2024).

غلظت پروتئین: جهت استخراج عصاره پروتئینی، ابتدا ۰/۲۵ گرم از پودر برگ با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار) مخلوط شد. در ادامه، از تکنیک بردفورد برای سنجش غلظت پروتئین برگی استفاده می‌شود (Bradford, 1976).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): ابتدا، ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (با pH برابر ٦/٨)، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم، و ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳/٤ مولار) باهم ترکیب شدند. سپس، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر اسپکتروفتومتری خوانده شد (Chance and Maehly, 1955).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD): ۳۰۰ میکرولیتر بافر واکنش حاوی ترایتون ایکس- ۱۰۰ (۰/۰۲۵ درصد)، متیونین ۱۲ میلی‌مولار، بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (با pH برابر ۷)، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، و ۵ میکرولیتر از بافر ریبوفلاوین ۲ میکرومولار ترکیب شدند. واکنش‌ها بر مبنای احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم و توانایی آنزیم در مهار این واکنش‌ها تعیین شد. در آخر، فعالیت آنزیم SOD در طول موج ٦٤٤ نانومتر تعیین شد (Beyer and Fridovich, 1987).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت این آنزیم از طریق اسپکتروفتومتری برآورد شد. مخلوط واکنش عبارت بود از: ۱۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، آسکوربات ۵ میلی‌مولار، H_2O_2 یک میلی‌مولار، بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸). فعالیت آسکوربات پراکسیداز بر اساس حداکثر جذب آسکوربات در طول‌موج ۲۹۰ nm تعیین شد (Ranieri *et al*., 2003).

درصد اسانس: پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، برگ‌ها تمیز شده و تحت شرایط سایه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه تهویه‌دار خشک شدند. برگ خشکیده از طریق دستگاه آسیاب سرامیکی به قطعات ریز خرد شد. بعد از الک‌کردن با فیلتر ۳۰۰ میکرومتری، بافت برگی از طریق ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شد. عملیات اسانس‌گیری برای هر تکرار و تیمار با نمونه‌های ۲۵ گرمی و به کمک دستگاه کلونجر در مدت سه ساعت بعد از جوش‌آمدن انجام شد. درصد اسانس (وزن اسانس/ماده خشک×۱۰۰) براساس وزن خشک نمونه‌ها برآورد شد (Veleshkolaii *et al*., 2024).

سنجش بیان ژن‌های لیمونن سنتاز و منتوفوران سنتاز: با استفاده از کیت استخراج RNA (speedPURE RNA) و مطابق

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

جدول ۱- آغازگرهای ژن‌های مورداستفاده در این پژوهش

نام ژن	دمای ذوب	دمای اتصال	توالی آغازگر	طول قطعه
LS	۶۰	۵۸	F: CGCCTTTCTCTTTCATAACATCG R: AGAGTGAATGAGGGTGGTGGTGAG	۲۰۵
MFS	۶۰	۵۸	F: TCTACGCCTACATCCACCTTTC R: CCTCCGCTCTATCTCCATTACC	۱۷۹
act	۶۱	۵۹	F: TCTGGAGATGGTGTGAGCCACAC	۱۸۳

با دستورالعمل شرکت دنازیست، استخراج RNA انجام شد. این کیت شامل سه محلول و بی‌نیاز از Dnase است. محلول DR1 سبب شکست دیواره سلولی، جلوگیری از فعالیت نوکلئازها و تفکیک RNA و DNA از یکدیگر و دیگر اجزای سلولی می‌شود. در ضمن در اتصال RNA به ستون کمک می‌کند. محلول DR2 دارای نمک است و برای شستشوی ستون حاوی RNA استفاده می‌شود. در حین شستشو با این محلول، RNA متصل با ستون باقی می‌ماند. محلول DR3 نیز برای آزادسازی و بازیابی از ستون استفاده می‌شود. برای تعیین خلوص RNA، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نمونه‌ها به کمک دستگاه نانودراپ ثبت شد. الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد نیز برای تعیین یکپارچگی RNA اجرا شد. از طریق کیت سنتز cDNA (Thermostable M-MLV Reverse Transcriptase) و بر مبنای دستورالعمل شرکت دنازیست، سنتز cDNA انجام شد. اجزا واکنش هم عبارتند از: آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase، بافر واکنش x۵، محلول ۰/۱ مولار DTT، مخلوط dNTPها (هر باز با غلظت ۱۰ میلی‌مولار)، پرایمر oligo-dT (۵۰ میکرومولار) و آب فاقد ریبونوکلئاز. برای اطمینان از سنتز cDNA، واکنش PCR توسط آغازگرهای ژن کنترل داخلی اکتین و طبق برنامه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) اجرا شد (Afkar and Karimzadeh, 2024). از سایت NCBI، نخست توالی ژن‌های لیمونن سنتاز (*LS*) و منتوفوران سنتاز (*MFS*)، جمع‌آوری شده و آغازگرهای اختصاصی آنها از طریق ابزار بیوانفورماتیکی PRIMER3 طراحی شدند. بهترین آغازگرهای پیشنهادی توسط نرم‌افزار با توجه به دمای ذوب، درصد GC، وجود ساقه‌حلقه و دایمرها انتخاب شدند. برای اجرای واکنش Real-Time PCR در دستگاه Rotor Gene Q 5plex از سایبرگرین ریل‌تایم (شرکت دنازیست) به شرح ذیل استفاده شد. به عنوان الگو، مقدار ۵ میکرولیتر از cDNA رقیق در واکنش (شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشتی و ۶/۵ میکرولیتر آب دیونیزه) استفاده شد. چرخه حرارتی واکنش Real-Time PCR بدین شکل بود: واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای مربوطه (جدول ۱) برای ۱۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه. در اینجا، سه تکرار بیولوژیکی (تعداد تکرار برای هر تیمار) و دو تکرار تکنیکی (تعداد تکرار برای هر نمونه) لحاظ شد. از کمی‌سازی نسبی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها بین تیمارهای مختلف به کمک نرم‌افزار REST استفاده شد (Parmigiani *et al.*, 2023).

فرمول کمی‌سازی نسبی $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

ΔCt = Ct ژن موردنظر – Ct ژن مرجع

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt نمونه تیمار – ΔCt نمونه شاهد

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = اختلاف بیان ژن در نمونه تیمار نسبت به شاهد

طرح آزمایشات به شکل کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش از طریق نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. آنالیز واریانس به شکل یک طرفه و مقایسه میانگین‌های بین تیمارها از طریق LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

نتایج

یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیرگذاری نانوذرات اکسید مس بر صفات نعناع‌فلفلی مؤید این مطلب است که اثر نانوذرات اکسید مس بر ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک گیاه، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئیدها، آنتوسیانین، پروتئین، فعالیت آنزیم کاتالاز، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، بیان ژن *LS*، بیان ژن *MFS*، و درصد اسانس نعناع‌فلفلی در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۲).

ارتفاع: در شکل ۱، تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر ارتفاع گیاه نعناع‌فلفلی با روندی مشخص مشاهده می‌شود. با افزایش غلظت نانوذره از صفر (شاهد) به ۵ میلی‌گرم بر لیتر، میانگین ارتفاع گیاه به‌طور غیرمعناداری از حدود ۳۱ به ۳۶ سانتی‌متر افزایش یافت که نشان‌دهنده تقویت رشد حدود ۱۵ درصد است. اما با ادامه افزایش غلظت به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، ارتفاع به‌طور چشمگیری تا حدود ۲۳ سانتی‌متر کاهش یافته و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر این روند نزولی با افت بیشتر تا حدود ۲۱/۵ سانتیمتر ادامه یافت که معادل کاهش ۳۰ درصدی نسبت به گروه شاهد است. بنابراین، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات CuO سبب افزایش ناچیز ارتفاع شد، درحالی‌که غلظت‌های بالاتر اثر بازدارنده بر رشد گیاه داشتند (شکل ۱).

در مطالعه‌ای مشابه بر روی تأثیر نانوذره مس (۵، ۱۰ و ۲۰ پی‌پی‌ام) بر صفات گیاه مورینگا، Ameri و همکاران (۲۰۲۵) مشاهده کردند که محلول‌پاشی نانومس سبب افزایش ارتفاع گیاه می‌شود. یافته‌های آنها گویای تأثیر نانوذره مس بر صفات گیاه مورینگا وابسته به غلظت بود به‌نحوی‌که غلظت‌های پایین مؤثر درحالی‌که غلظت‌های بالای دارای اثر سمی بودند. همچنین با ارزیابی پاسخ ذرت به غلظت ۵ میکرومولار نانوذرات اکسید مس، Shafiq و همکاران (۲۰۲٤) دریافتند که غلظت‌های پایین نانوذرات اکسید مس سبب افزایش صفات رشد و ارتفاع گیاه درحالی‌که غلظت‌های بالای نانوذرات منجر به کاهش این صفات می‌شود. به علاوه با تعیین تأثیر محلول‌پاشی برگی نانوذرات اکسید مس (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات رازیانه، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های زیست‌توده و ارتفاع درحالی‌که محلول‌پاشی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب اثر سمیت سلولی می‌شود.

در توضیح مشاهدات ما می‌توان گفت که پاسخ دوگانه مشاهده‌شده در ارتفاع گیاهان نسبت به غلظت‌های افزایشی نانوذرات اکسید مس، یعنی تحریک جزئی در ۵ میلی‌گرم بر لیتر و سپس مهار رشد در ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، ناشی از تغییرات وابسته به غلظت در فرآیندهای مولکولی و فیزیولوژیکی است. در غلظت‌های پایین، این نانوذرات با آزادسازی یون‌های Cu^{2+}، دسترسی به این ریزمغذی ضروری را بهبود بخشیده و کوفاکتور لازم برای آنزیم‌های کلیدی متابولیکی را فراهم می‌کنند که به رشد سلولی منجر می‌شود (Shafiq *et al.*, 2024). در مقابل، غلظت‌های بالاتر عمدتاً از طریق تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ایجاد سمیت می‌کنند که با افزایش سطح مالون دی‌آلدهید و نشت الکترولیت اثبات شده و به تخریب یکپارچگی غشا و اختلال در هومئوستازی سلولی می‌انجامد. این تنش اکسیداتیو، رشد را با کاهش بیان ژن‌های سنتز کلروفیل (مانند کلروفیل سنتاز) و کاهش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئیدها) سرکوب می‌کند. افزون بر این، غلظت‌های بالای نانوذرات CuO، تعادل فیتوهورمون‌ها را برهم زده و با افزایش سطح اسید ABA و اتیلن و همزمان مهار اکسین‌ها و جیبرلین‌ها، تقسیم و طویل‌شدن سلول‌ها را محدود می‌سازد. همچنین، غلظت بالای یون‌های Cu^{2+} سبب تنش یونی و اختلالات متابولیک مؤثر بر رشد گیاه می‌شود (Faraz *et al.*, 2022).

وزن تر و خشک اندام هوایی: بر اساس تغییرات روند وزن تر و خشک اندام هوائی گیاه نعناع‌فلفلی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO)، با افزایش غلظت نانوذره از صفر به ۵ میلی‌گرم بر لیتر، وزن تر گیاه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

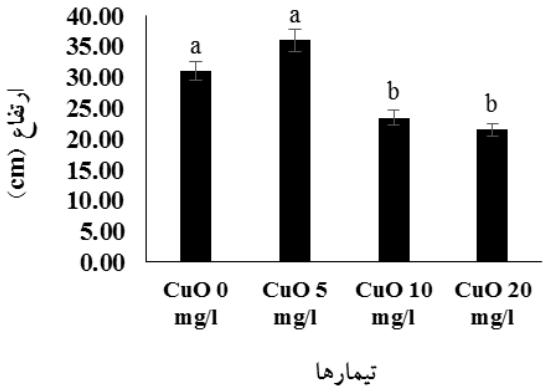
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات نعناع‌فلفلی تحت تأثیر نانوذرات اکسید مس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		ارتفاع	وزن تر	وزن خشک	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید
نانوذرات	۳	۱۳۷/۰۷**	۲/۷۷**	۰/۰۳۷**	۵/۵٤**	۱/۰۹**	۸/۱۷**	۱/۰۱**
خطا	۸	۱۰/۲٤	۰/۲۸	۰/۰۰۲٦	۰/۱۸	۰/۰۸	۰/٦۲	۰/۰۷
ضریب تغییرات	-	۱۱/٤۲	۱۳/٦٦	۱۰/۷۱	۹/۵۳	۱٤/۱۵	۱۳/۳۸	۱٤/۱۹

ادامه جدول ۲ -

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		آنتوسیانین	پروتئین	CAT	SOD	APX	بیان *LS*	بیان *MFS*	درصد اسانس
نانوذرات	۳	۰/۰۰۱٤**	۸۷/٦۷**	۲۸۰/۲۹**	۸/۱٤**	۰/۱۹**	۳/٦۹**	۲/٦۱**	۰/۷۱**
خطا	۸	۰/۰۰۰۰۵	۸/۲۳	۱۸/٤۲	۰/۳۸	۰/۰۰۵	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۰٦۸
ضریب تغییرات	-	۱۱/٤۵	۱۵/۱٤	۱٦/۲۲	۱٤/۰۳	۱۳/۵۷	۱۳/۹۳	۱٦/٦۲	۱۵/۰٤

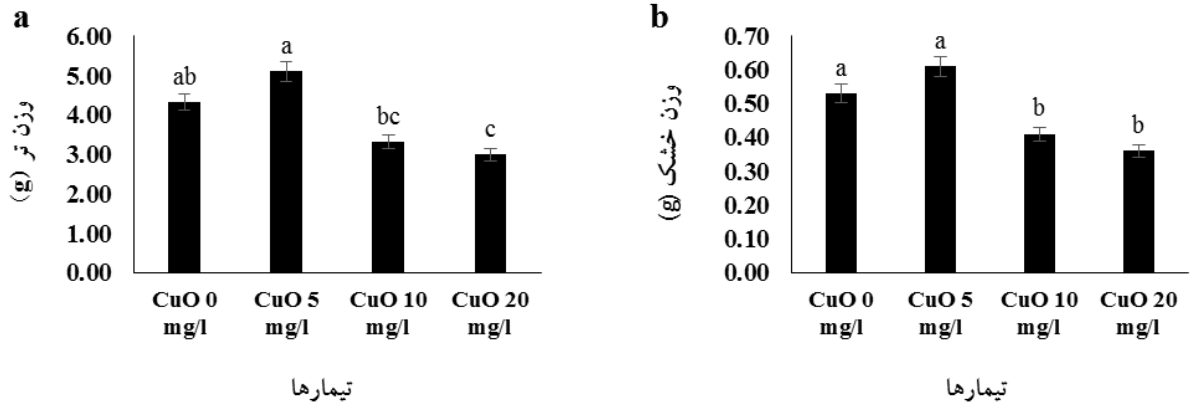


شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر ارتفاع گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ > P است.

به‌طور غیرمعناداری افزایش یافت که نشان‌دهنده اثر تحریک‌کننده ضعیف نانوذرات در غلظت پایین است. با این حال، با تدوام افزایش غلظت به ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، وزن تر و خشک اندام هوایی به‌طور پیوسته کاهش یافتند. به‌طوری‌که وزن تر و خشک در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور میانگین با کاهش حدود ۲۳ درصدی نسبت به شاهد و در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور میانگین با کاهش حدود ۳۱ درصدی نسبت به شاهد رسیدند که حاکی از اثر بازدارنده غلظت‌های بالاتر است (شکل ۲ a و b).

هم‌راستا با مشاهدات ما، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات منجر به افزایش زیست‌توده رازیانه درحالی‌که محلول‌پاشی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب اثر سمیت سلولی می‌شود. Shafiq و همکاران (۲۰۲٤) نیز دریافتند که غلظت‌های پایین نانوذرات اکسید مس سبب افزایش صفات رشد مثل وزن تر و خشک ذرت درحالی‌که غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید مس باعث کاهش این صفات شد. همچنین، Ameri و همکاران (۲۰۲۵) متوجه شدند که محلول‌پاشی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر وزن تر (a) و خشک (b) اندام هوایی گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ > P است.

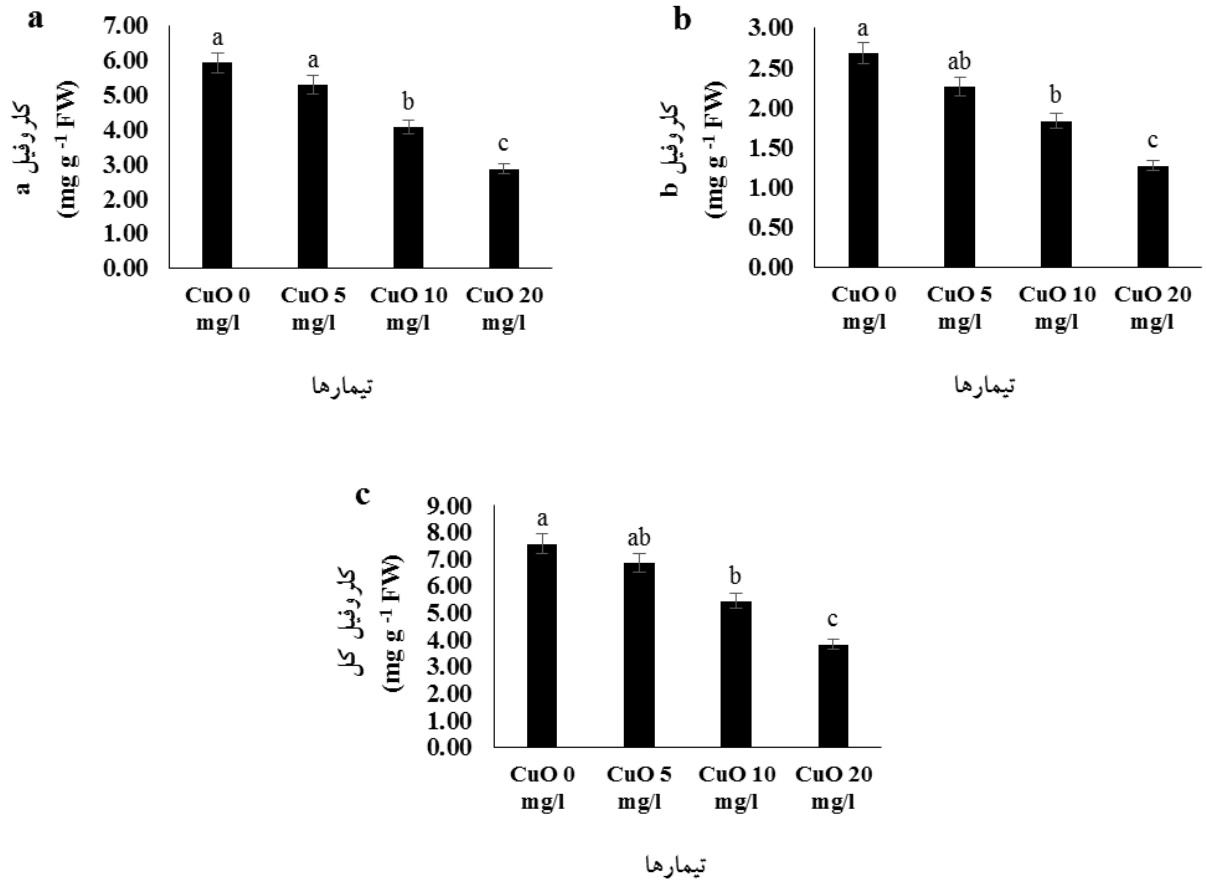
نانومس سبب افزایش وزن تر اندام هوایی در گیاه مورینگا به شیوه‌ای وابسته به غلظت می‌شود. به عبارتی دیگر، تأثیر نانوذره مس بر صفات گیاه مورینگا وابسته به غلظت بود به نحوی‌که غلظت‌های پایین نانوذره مؤثر اما غلظت‌های بالا دارای اثر سمی بودند.

در توضیح مشاهدات ما می‌توان این‌گونه استنباط کرد که پاسخ دوگانه وزن گیاه به محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس (افزایش جزئی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر و کاهش در غلظت‌های بالاتر) ناشی از تغییرات وابسته به غلظت در مکانیسم‌های مولکولی تنظیم‌کننده تنش اکسیداتیو، هموستاز مواد مغذی و سیگنالینگ هورمونی است. در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، رهایش متوسط یون‌های Cu^{2+} از نانوذرات به عنوان کوفاکتور ریزمغذی عمل کرده، فرآیندهای متابولیک را به‌طور گذرا بهبود بخشیده که به‌طور بالقوه رشد را تقویت می‌نماید (Shafiq *et al.*, 2024). با این حال، در غلظت‌های بالاتر، تجمع بیش‌ازحد مس ظرفیت سم‌زدایی سلولی را تحت‌الشعاع قرار داده، تولید بی‌رویه ROS را تحریک می‌کند و باعث اختلال در یکپارچگی غشا، آسیب به پروتئین‌ها/DNA و نارسایی متابولیک و انحراف انرژی به سمت ترمیم به‌جای رشد می‌گردد (Faraz *et al.*, 2022). همزمان، نانوذرات CuO در غلظت‌های بالا با تنظیم کاهشی ژن‌های کلیدی، سنتز کلروفیل را سرکوب کرده و جذب کربن را مختل می‌کنند و در نتیجه ذخایر کربوهیدرات ضروری برای تجمع زیست‌توده را تخلیه می‌نمایند. علاوه‌براین، غلظت بالای نانوذرات جذب مواد مغذی را مختل کرده و عدم تعادل هورمونی ایجاد می‌کنند و منابع را به سمت پاسخ‌های تنش به‌جای تولید زیست‌توده بازتخصیص می‌دهند (Yang *et al.*, 2020). این مکانیسم‌ها به‌طور هم‌افزایی کاهش رشد در غلظت‌های بالا را تبیین می‌کنند.

غلظت کلروفیل: نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات اکسید مس تا ۵ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت کلروفیل a، b و کل نعناع‌فلفلی به طور غیرمعنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. اما با افزایش غلظت به ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت کروفیل آ، ب و کل به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافتند. به عبارتی دیگر، پاسخ محتوای کلروفیل برگی گیاه نعناع‌فلفلی به محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس به شیوه‌ای وابسته به غلظت بود. بیشترین کاهش کلروفیل با محلول‌پاشی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس بدست آمد به‌طوری‌که غلظت کلروفیل a، b و کل به طور میانگین حدود ۵۰ درصد کاهش نسبت به شاهد داشتند (شکل ۳ a، b و c).

همسو با یافته‌های ما، Shafiq و همکاران (۲۰۲٤) گزارش کردند که غلظت بالای نانوذرات اکسید مس سبب کاهش محتوای کلروفیل شد. همچنین، Naderi و همکاران (۲۰۲۳)

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



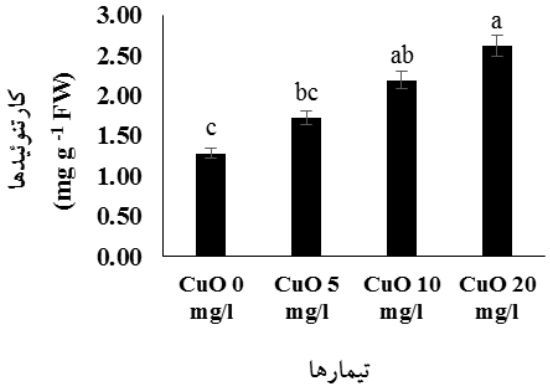
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر غلظت کلروفیل a (a)، b (b) و کل (c) (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.

گزارش کردند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش غلظت کلروفیل a و اما غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر سمیت سلولی نشان داد. به علاوه، Faraz و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که نانوذرات اکسید مس منجر به کاهش سطح کلروفیل در گیاه خردل هندی (*Brassica juncea*) می‌شوند.

کاهش محتوای کلروفیل نعناع‌فلفلی که به صورت وابسته به دوز تحت تأثیر نانوذرات اکسید مس اتفاق افتاد عمدتاً ناشی از تنش اکسیداتیو و اختلال مولکولی در مسیر بیوسنتز کلروفیل است. در غلظت‌های بالا، نانوذرات اکسید مس سبب تولید بیش از حد آنیون‌های سوپراکسید پراکسید هیدروژن می‌کنند که به غشاهای لیپیدی کلروپلاست‌ها آسیب زده و موجب پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند. این آسیب اکسیداتیو، ساختار کلروپلاست‌ها و یکپارچگی غشاهای تیلاکوئیدی را مختل کرده، کارایی فتوسنتز را کاهش داده و تجزیه کلروفیل را تسریع می‌کند (Li *et al.*, 2024). همزمان، غلظت بالای نانوذرات اکسید مس، بیان ژن‌های حیاتی بیوسنتز کلروفیل از جمله کلروفیل سنتاز را سرکوب می‌کنند. کاهش بیان این ژن‌ها مسیرهای سنتز کلروفیل را مختل می‌کند. اثر تجمعی این دو عامل (یعنی آسیب اکسیداتیو به کلروپلاست‌ها همراه با سرکوب مولکولی مسیر بیوسنتزی مربوطه) دلیل اصلی کاهش چشمگیر کلروفیل در غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید مس است (Graciano *et al.*, 2024).

غلظت کارتنوئید: روند تغییر محتوای کارتوئنوئیدهای برگی گیاه نعناع‌فلفلی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) در شکل ٤ نشان داده شده است. روند کلی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ٤- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر غلظت کارتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.

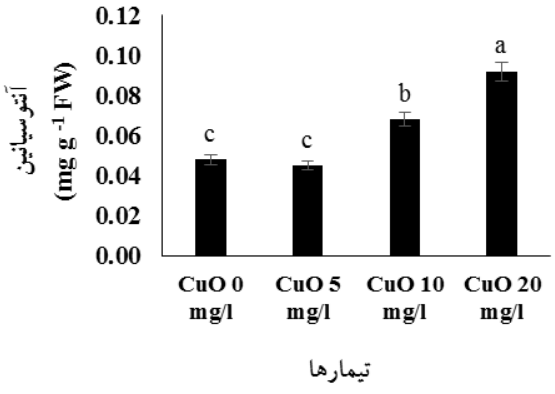
تغییرات با افزایش غلظت نانوذره، افزایشی است؛ به‌طوری‌که کمترین مقدار کاروتنوئید در تیمار شاهد (صفر میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد و با افزایش غلظت CuO به ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، این مقدار به طور معنی‌داری افزایش یافت. مقدار تغییرات محتوای کاروتنوئیدها نسبت به تیمار شاهد، در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌ترتیب حدود ۱/٤ و ۱/۹ برابر افزایش را نسبت به شاهد نشان می‌دهند. با توجه به داده‌ها، بهترین غلظت CuO برای افزایش محتوای کاروتنوئیدهای برگی، تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره است که بالاترین مقدار کارتوئنوئیدهای برگی را رقم زد (شکل ٤).

همسو با یافته‌های ما، Nasiri و همکاران (۲۰۲۲) تأثیر نانوذرات مس (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) را بر صفات گیاه دارویی پنیرک (*Malva sylvestris*) مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات منجر به بالاترین میزان کارتنوئید می‌شود. همچنین، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که محلول‌پاشی با نانوذرات سبب افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی مثل کارتنوئیدها شد. در مطالعه‌ای دیگر، Amooaghaie و Naderi (۲۰۲۳) گزارش کردند که محلول‌پاشی برگی با نانوذرات تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، باعث افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در رازیانه می‌شود. بنابراین، آنها پیشنهاد کردند که غلظت کم و متوسط نانوذرات اکسید مس سبب تقویت محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود.

افزایش محتوای کاروتنوئید در نعناع‌فلفلی تحت تیمار نانوذرات اکسید مس عمدتاً ناشی از القای تنش اکسیداتیو وابسته به غلظت و پاسخ‌های جبرانی مولکولی در بافت‌های گیاهی است. در غلظت‌های پایین (۵ میلی‌گرم بر لیتر)، نانوذرات CuO با ایجاد تنش اکسیداتیو خفیف، مسیرهای دفاع آنتی‌اکسیدانی از جمله زیست‌ساخت کاروتنوئیدها را به‌عنوان مکانیسم محافظتی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی فعال می‌کنند. با این حال، در غلظت‌های بالاتر (۲۰-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، افزایش سطح ROS را تشدید کرده و با فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش (که به پروموتر ژن‌های بیوسنتز کاروتنوئید مانند فیتوئن سنتاز متصل می‌شوند)، منجر به تقویت رونویسی این مسیر می‌گردد (Naz *et al.*, 2025). اثر نانوذرات که در آن دوزهای پایین سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی را آماده‌سازی کرده و دوزهای بالاتر پاسخ‌های انطباقی قوی‌تری ایجاد می‌کنند، الگوی انباشت غیرخطی کاروتنوئیدها را تبیین می‌نماید (Li *et al.*, 2024).

مقدار آنتوسیانین: بر اساس نتایج این مطالعه، همگام با افزایش غلظت نانوذره، محتوای آنتوسیانین افزایش چشمگیری یافت. با افزایش غلظت به ۵ میلی‌گرم بر لیتر، محتوای آنتوسیانین با تغییر همراه نبود. اما افزایش غلظت به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، محتوای آنتوسیانین را تا ۱/٤ برابر افزایش داد،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر مقدار آنتوسیانین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ > P است.

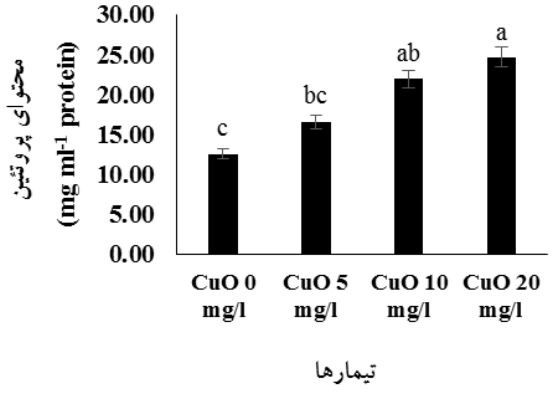
در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز مقدار آنتوسیانین تا ۱/۹ برابر افزایش یافت. بنابراین، بهترین غلظت برای افزایش محتوای آنتوسیانین برگی، تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات CuO است که منجر به بیشترین محتوای آنتوسیانین در بین تیمارها شد (شکل ۵).

در پژوهش مشابهی، Mahawar و همکاران (۲۰۲٤) در مطالعه خود بر روی اثر نانوذرات اکسید مس (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات گیاه تربچه گزارش کردند که نانوذرات اکسید مس سبب افزایش محتوای آنتوسیانین برگی می‌شوند. به علاوه، Nasiri و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی تأثیر نانوذرات مس (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات گیاه دارویی پنیرک نشان دادند که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات منجر به بالاترین میزان آنتوسیانین شد. در تحقیقی دیگر بر روی ارزیابی اثر نانوذره مس (۲۵، ۵۰، ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*)، Haddadian و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند که سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات مس سبب افزایش مقدار آنتوسیانین می‌شود.

افزایش وابسته به دوز در محتوای آنتوسیانین گیاهان تحت تیمار نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های بالا (۲۰-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، عمدتاً ناشی از فعال‌سازی مسیرهای پاسخ به تنش است. در غلظت‌های زیر آستانه، نانوذرات تنش اکسیداتیو سطح پایینی ایجاد می‌کنند که توسط سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی ذاتی گیاه به‌طور مؤثر خنثی می‌شود بدون آنکه سنتز قابل‌توجهی از آنتوسیانین را القا کند (Naz *et al.*, 2025). با این حال، در غلظت‌های بالاتر، مقادیر بیش از حد ROS تولید می‌شود. این بار اضافی ROS به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده عمل می‌کند و آبشارهای کیناز پروتئین فعال‌شده با میتوژن (MAPK) را فعال می‌کند و منجر به افزایش بیان فاکتورهای رونویسی کلیدی مانند MYB75 و bHLH می‌شود که به پروموترهای ژن‌های بیوسنتزی آنتوسیانین متصل می‌شوند. در نتیجه، آنزیم‌هایی مانند کالکون سنتاز بیشتر تولید می‌شوند که تبدیل پیش‌سازهای فنیل‌پروپانوئیدی به آنتوسیانین‌ها را تسریع می‌کنند (Roy *et al.*, 2022).

غلظت پروتئین: یافته‌های ما مؤید این مطلب است که پاسخ غلظت پروتئین گیاه نعناع‌فلفلی به تیمار اثر نانوذرات اکسید مس وابسته به غلظت است به‌طوری‌که غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به تغییر معنی‌داری در صفت غلظت پروتئین نشد درحالی‌که غلظت‌های بالاتر سبب ایجاد تغییرات معنی‌داری شدند. غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب منجر به افزایش ۱/۷ و ۲ برابری محتوای پروتئین برگی نعناع‌فلفلی نسبت به شاهد شدند. در این بین، تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر با ایجاد بیشترین افزایش در مقدار پروتئین، به عنوان تیمار مطلوب القاکننده تولید پروتئین محلول سلولی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ٦- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر غلظت پروتئین (میلی‌گرم بر میلی لیتر) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ > P است.

شناخته شد (شکل ٦).

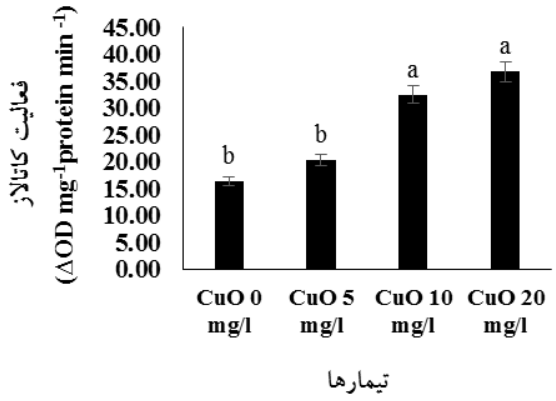
در توافق با یافته‌های ما، Nasiri و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مس به شیوه‌ای وابسته به غلظت، سبب افزایش مقدار پروتئین محلولی سلولی در گیاه دارویی پنیرک می‌شوند. همچنین، Haddadian و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات مس سبب افزایش میزان پروتئین محلول برگی بادرشبو می‌شوند. در مطالعه مشابه دیگر، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش پروتئین محلول برگی رازیانه می‌شود.

افزایش محتوای پروتئین گیاهی وابسته به غلظت پس از مواجهه با نانوذرات اکسید مس عموماً ناشی از مکانیسم‌های دفاع مولکولی و تغییر در هموستازی پروتئین است. در غلظت‌های پایین (۵ میلی‌گرم بر لیتر)، نانوذرات CuO به‌صورت جزئی ROS تولید می‌نمایند؛ این امر موجب تنظیم افزایشی متعادل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش به‌عنوان یک پاسخ انطباقی می‌شود. با این حال، غلظت‌های بالاتر (۲۰-۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) تولید ROS را تشدید کرده و موجب آسیب اکسیداتیو شدید به غشاها و اندامک‌ها می‌گردد. این امر سنتز پروتئین‌های مرتبط با دفاع از جمله آنزیم‌های دخیل در مسیرهای سم‌زدایی (مانند گلوتاتیون اس-ترانسفرازها) را تشدید می‌کند (Graciano *et al.*, 2024).

فعالیت آنزیم کاتالاز: مطالعه ما نشان داد که محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس سبب ایجاد تغییرات محسوسی در فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود که البته این تغییرات وابسته به غظت نانوذرات اکسید مس بود. هر چند غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد اما این افزایش معنی‌دار نبود و به عبارتی غلظت نانوذره برای تحریک فعالیت کاتالاز کافی نبود. در مقابل، غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز شدند به‌طوری‌که به ترتیب سبب افزایش ۱/۹ و ۲/۲ برابری فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد شدند. در این میان، غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس به عنوان بهترین تیمار برای افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز شناخته شد (شکل ۷).

در پژوهشی مشابه بر روی ارزیابی اثر نانوذرات اکسید مس (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات گیاه تربچه، Mahawar و همکاران (۲۰۲٤) دریافتند که نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. علاوه‌براین، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز می‌شود. همچنین، Faraz و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی تأثیر نانوذرات اکسید مس (۲، ٤، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر خصوصیات رشدی گیاه خردل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ۷- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر فعالیت کاتالاز (اختلاف جذب میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.

هندی دریافتند که نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش چشمگیر فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود.

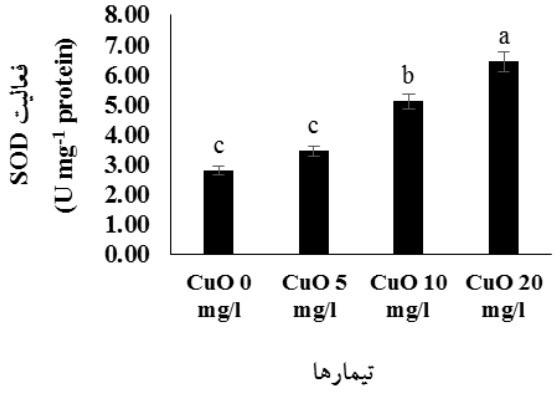
افزایش وابسته به دوز در فعالیت کاتالاز مشاهده‌شده در نعناع‌فلفلی تیمارشده با نانوذرات اکسید مس عموماً به دلیل تنش اکسیداتیو است. در غلظت پایین، نانوذرات سبب تنش اکسیداتیو خفیفی می‌شوند که در نتیجه فعالیت کاتالاز را به‌عنوان بخشی از دفاع آنتی‌اکسیدانی اولیه به‌نسبت بالا می‌برد. با این حال، در غلظت‌های بالاتر (۲۰–۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، تجمع گسترده ROS رخ می‌دهد که مسیرهای سیگنالینگ تنش (مانند آبشارهای MAPK) را فعال کرده و منجر به افزایش رونویسی ژن‌های کاتالاز می‌شود (Naz *et al.*, 2025). به طور کلی، افزایش سنتز کاتالاز برای کاهش سمیت H_2O_2 رویکردی است که گیاه برای مواجه با غلظت بالای نانوذرات در پیش می‌گیرد (Mahawar *et al.*, 2024).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز: نتایج حاصل از مقایسه میانگین تیمارها گویای این موضوع است که نانوذرات اکسید مس به شیوه‌ای وابسته به غلظت سبب افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز می‌شوند. به عبارتی دیگر، هر چند غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر برای تحریک‌کنندگی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کافی نبود، اما غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شدند. غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب سبب افزایش ۱/۸ و ۲/۳ برابری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گیاه نعناع‌فلفلی شدند. به ویژه، غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر توانست بیشترین القاکنندگی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتازرا به ارمغان آورد (شکل ۸).

همسو با یافته‌های ما، Amooaghaie و Naderi (۲۰۲۳) گزارش کردند که محلول‌پاشی برگی با نانوذرات تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. همچنین، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی رازیانه می‌شود. به علاوه، Mahawar و همکاران (۲۰۲٤) نشان دادند که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود.

از نظر مولکولی، پاسخ آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به نانوذرات در گیاه شامل فعال‌سازیِ مسیر سیگنالینگ MAPK و فیتوهورمون‌ها است. انفجار ROS، کینازهای پروتئین فعال‌شده با میتوژن (MAPKs) را فعال می‌کند که به نوبه خود فاکتورهای رونویسی (مانند NAC و ZAT) را فسفریله کرده و به عناصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی (AREs) در پروموترهای SOD متصل می‌شوند. همزمان، نانوذرات منجر به افزایش جاسمونات می‌شوند که بیان SOD را از طریق مسیرهای وابسته به MYC2

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (واحد میلی‌گرم پروتئین) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ > P است.

تقویت می‌کند (Faraz *et al.*, 2022). بنابراین، افزایش فعالیت در غلظت‌های بالاتر، بازتابِ اختلال در تعادل استوکیومتری بین تولید ROS و ظرفیت سم‌زدایی اولیه است که القای حداکثری SOD را به‌عنوان پاسخ بقای سلولی تحمیل می‌کند.

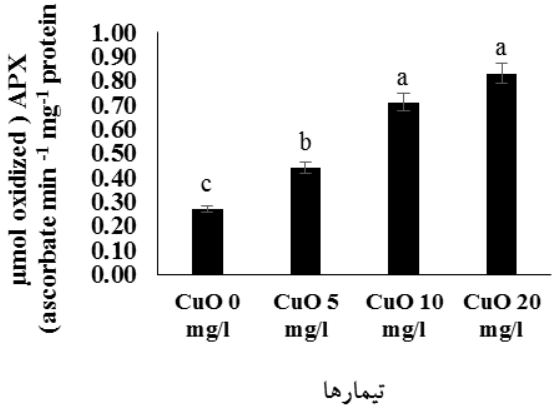
فعالیت آسکوربات پراکسیداز: بررسی پاسخ فعالیت آسکوربات پراکسیداز به تیمار نعناع‌فلفلی با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس نشان داد که پاسخ این صفت به تیمار نانوذره‌ای وابسته به غلظت است. افزایش غلظت نانوذرات به ۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به تغییر معنی‌داری در فعالیت آسکوربات پراکسیداز نشد درحالی‌که غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی شدند. غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس به ترتیب موجبات افزایش ۲/٦ و ۳ برابری را در فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاه نعناع‌فلفلی را فراهم کردند (شکل ۹).

به طور مشابهی، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) دریافتند که محلول‌پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر آسکوربات پراکسیداز می‌شود. به علاوه، Faraz و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی تأثیر نانوذرات اکسید مس (۲، ٤، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر خصوصیات رشدی گیاه خردل هندی متوجه شدند که نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش فعالیت پراکسیدازها می‌شوند. همچنین در آزمایشی بر روی اثر نانوذرات اکسید مس (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات گیاه تربچه، Mahawar و همکاران (۲۰۲٤) گزارش کردند که نانوذرات اکسید مس سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌شود.

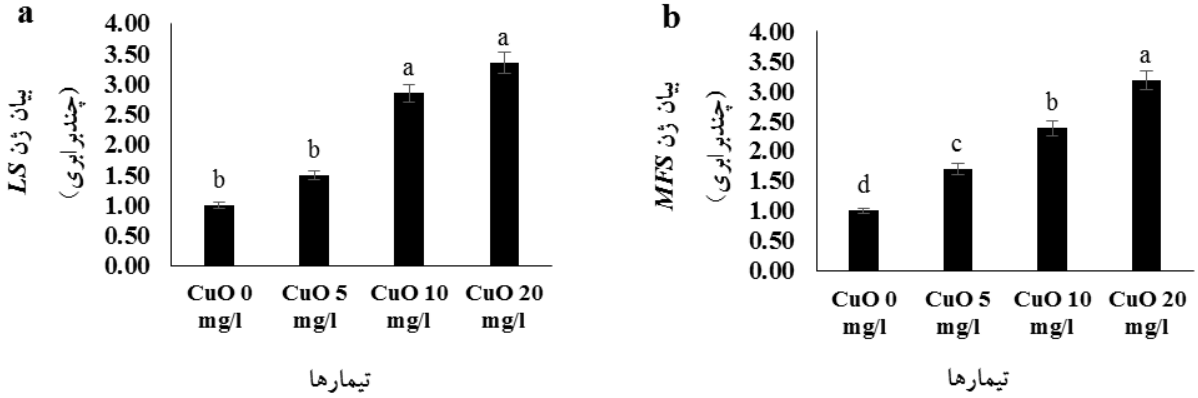
افزایش وابسته به غلظت در فعالیت آنزیم APX در گیاهان تیمارشده با نانوذرات اکسید مس عموماً ناشی از تنش اکسیداتیو است. افزایش ROS، فاکتورهای رونویسی حساس به ردوکس را فعال کرده که بیان ژن‌های APX و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش می‌دهد. همزمان، سیگنالینگ فیتوهورمون‌ها (به‌ویژه جاسمونیک) توسط نانوذرات CuO تنظیم شده و از طریق آبشارهای کینازی، رونویسی ژن‌های رمزگردان APX را تقویت می‌کند (Yang *et al.*, 2020).

بیان ژن‌های *LS* و *MFS*: به عنوان یکی ار ترکیبات مهم گیاه نعناع‌فلفلی، لیمونن توسط یک مسیر بیوسنتزی متشکل از چندین آنزیم به ویژه لیمونن سنتاز و منتوفوران سنتز می‌شود. مطالعه ما نشان داد بیان ژن‌های *LS* و *MFS* به شیوه‌ای وابسته به غلظت به تیمار نانوذرات اکسید مس پاسخ می‌دهد. در خصوص بیان ژن *MFS*، غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب منجر به افزایش ۱/۷، ۲/۳ و ۳/۱ برابری بیان ژن شدند. شبیه به بیان ژن *MFS*، غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز به ترتیب منجر به افزایش ۱/٤، ۲/۸ و ۳/۵ برابری بیان ژن *LS* شدند. با این تفاوت که غلظت‌های ۱۰ و ۲۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ۹- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز (میکرومول آسکوربات اکسیدشده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.



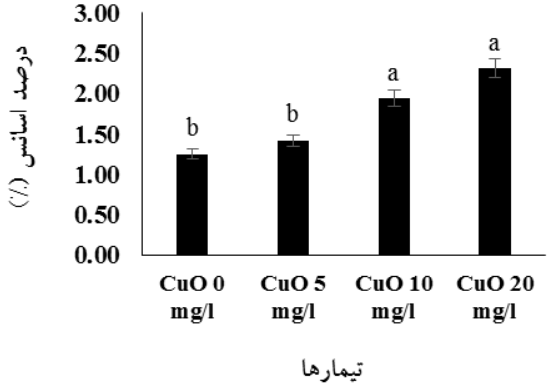
شکل ۱۰- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر بیان ژن‌های *LS* (a) و *MFS* (b) گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.

میلی‌گرم بر لیتر در اثرگذاری بر بیان ژن LS باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۱۰ a و b).

تاکنون، تأثیر نانوذرات اکسید مس بر بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز لیمونن در گیاهان مورد مطالعه قرار نگرفته است لذا شواهد اندکی برای مقایسه نتایج ما وجود دارد. از نظر مکانزیمی، نانوذرات CuO در غلظت‌های بالا همئوستازی یونی را مختل کرده و تنش فلزات سنگین را تقلید می‌کنند، که آبشارهای سیگنالینگ کلسیم را فعال کرده و موجب فسفریلاسیون کینازهای MAP می‌شوند. این کینازها مسیرهای هورمونی را فعال می‌کنند که به نوبه خود بیان ژن‌های متابولیت‌های ثانویه را تقویت می‌نمایند. علاوه‌براین، نانوذرات CuO سبب آزادسازی یون‌های Cu^{2+} می‌شوند که به هسته نفوذ کرده و مستقیماً مارک‌های اپی‌ژنتیک (مانند استیل‌اسیون هیستون) را تعدیل می‌کنند و متعاقباً خوشه‌های ژنی بیوسنتزی را متأثر می‌نمایند (Naz *et al.*, 2025).

درصد اسانس: نتایج مطالعه ما نشان داد که پاسخ درصد اسانس نعناع‌فلفلی به تیمار نانوذرات اکسید مس وابسته به غلظت است. تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر در غلظت پایین نتوانست درصد اسانس را به طور معنی‌داری افزایش دهد. این درحالی بود که تیمار ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر توانستند درصد اسانس را به طور معنی‌داری افزایش دهند. غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب موجبات افزایش ۱/۵ و ۱/۸ برابری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]



شکل ۱۱- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر درصد اسانس گیاه نعناع‌فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح P < ۰/۰۵ است.

درصد اسانس را فراهم کردند هر چند تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب القا بیشترین افزایش در درصد اسانس شد اما به واسطه مهار صفات رشدی باید با احتیاط برای افزایش اسانس نعنافلفلی استفاده شود (شکل ۱۱).

در مطالعه‌ای مشابه بر روی تأثیر نانوذرات مس (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات گیاه دارویی پنیرک، Nasiri و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که درصد اسانس پنیرک همگام با افزایش غلظت نانوذره، افزایش می‌یابد. همچنین در پژوهشی بر روی تأثیر محلول‌پاشی برگی نانوذرات اکسید مس (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر رازیانه، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که محلول‌پاشی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب بیشترین درصد اسانس گیاه رازیانه می‌شود.

افزایش محتوای اسانس گیاهان تحت تأثیر نانوذرات اکسید مس به صورت وابسته به دوز، که در آن افزایش جزئی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر و افزایش چشمگیر در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد، عمدتاً ناشی از فعالیت مسیرهای بیوشیمیایی پاسخ‌دهنده به تنش است که بیوسنتز ترپنوئیدها را افزایش می‌دهد. نانوذرات سبب افزایش بیان ژن‌های ترپن سینتاز می‌شوند که جریان کربن را به سمت مسیر مشتقات ترپنوئیدی هدایت می‌کند. این نانوذرات همچنین پاسخ‌های دفاعی گیاه را تحریک کرده و با افزایش سطح جاسمونیک اسید، تولید ترپنوئیدها را به عنوان جزئی از اسانس تحریک می‌کنند (Abbasirad *et al.*, 2025)

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید مس (CuO) به عنوان یک الیسیتور مؤثر، پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاه نعناع‌فلفلی را به‌صورت وابسته به غلظت تعدیل می‌کنند. غلظت پایین (۵ میلی‌گرم بر لیتر) باعث افزایش صفات رشدی درحالی‌که غلظت‌های بالاتر (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) با القای تنش اکسیداتیو، سبب فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تجمع متابولیت‌های ثانویه شدند. نکته حائز اهمیت، افزایش چشمگیر بیان ژن‌های لیمونن سنتاز و منتوفوران سنتاز تحت تیمار نانوذرات بود که نشان‌دهنده تحریک مسیر بیوسنتز منتول در سطح رونویسی است. این مطالعه به‌وضوح نشان می‌دهد که علی‌رغم ایجاد اثرات بازدارنده بر رشد رویشی در غلظت‌های بالا، کاربرد هدفمند نانوذرات اکسید مس می‌تواند سبب افزایش اسانس شود.

تشکر و قدردانی

محققان از دانشگاه پیام‌نور واحد شرق تهران به خاطر مساعدت در اجرای این پروژه، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

منابع

Afkar, S, & Karimzadeh, G. (2024). Changes in physiological traits, gene expression and phytochemical profile of *Mentha piperita* in response to elicitor. *Biochemical Genetics*, 1-15. https://doi.org/10.1007/s10528-024-10805-6

Ameri, M., Shamili, M., Roshan Sarvestani, V., & Ghasemi, M. (2025). Studying the modulating effect of nano copper on the morphological characteristics and elements content of moringa (*Moringa oleifera* L.) under salt stress. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, *26*(1), 1-16.

Asle-Mohammadi, Z., Kharazmi, M., Sheikhi, H., Mohammadkhani, N., & Nicola, S. (2024). Foliar application of Fe, Zn, and Mn as a practical strategy to alleviate the soil Cu toxicity and stimulate the physiological and biochemical properties of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *24*(1), 371-388. https://doi.org/10.1007/s42729-023-01544-5

Beyer, W. F, & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, *161*(2), 559-66.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-54. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chakraborty, K., Chakravarti, A. R., & Bhattacharjee, S. (2022). Bioactive components of peppermint (*Mentha piperita* L.), their pharmacological and ameliorative potential and ethnomedicinal benefits: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *11*(1), 109-114.

Chance, B, & Maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, *11*, 764-755. https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14

Faraz, A., Faizan, M., Hayat, S., & Alam, P. (2022). Foliar application of copper oxide nanoparticles increases the photosynthetic efficiency and antioxidant activity in *Brassica juncea*. *Journal of Food Quality*, *2022*(1), 5535100. https://doi.org/10.1155/2022/5535100

Graciano, D. E., Pontes, M. S., Araujo, L. O., Lima, R. G., Grillo, R., Machulek Jr, A., ... & Caires, A. R. L. (2024). CuO nanoparticles' effect on the photosynthetic performance in seed tissues of *Inga laurina* (Fabaceae). *Environmental Science and Pollution Research*, *31*(38), 50722-50732.

Haddadian, K., Iranbakhsh, A., Khavari-Nejad, R. A., & Ghoranneviss, M. (2020). The effects of copper nanoparticles and cold atmospheric plasma on biochemical indices of *Dracocephalum moldavica*. *Nova Biologica Reperta*, *7*(4), 411-418.

Holghoomi, R, & Colagar, A. H. (2024). Applications of biocompatible nanoparticles in plant biotechnology for enhanced secondary metabolite biosynthesis. *Inorganic Chemistry Communications*, 112753. https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112753

Hudz, N., Kobylinska, L., Pokajewicz, K., Horcinova Sedlackova, V., Fedin, R., Voloshyn, M., ... & Lipok, J. (2023). *Mentha piperita*: Essential oil and extracts, their biological activities, and perspectives on the development of new medicinal and cosmetic products. *Molecules*, *28*(21), 7444.

Humbal, A, & Pathak, B. (2023). Harnessing nanoparticle-mediated elicitation in plant tissue culture: A promising approach for secondary metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *155*(2), 385-402. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02612-5

Inam, M., Attique, I., Zahra, M., Khan, A. K., Hahim, M., Hano, C., & Anjum, S. (2023). Metal oxide nanoparticles and plant secondary metabolism: unraveling the game-changer nano-elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *155*(2), 327-344. https://doi.org/10.1007/s11240-023-02587-3

Khaldari, I., Naghavi, M. R., Motamedi, E., & Zargar, M. (2024). The effects of green and chemically-synthesized copper oxide nanoparticles on the production and gene expression of morphinan alkaloids in *Oriental poppy*. *Scientific Reports*, *14*(1), 6000. https://doi.org/10.1038/s41598-024-56709-8

Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2023). Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, *96*, 15-25.

Li, P., Xia, Y., Song, K., & Liu, D. (2024). The impact of nanomaterials on photosynthesis and antioxidant mechanisms in gramineae plants: Research progress and future prospects. *Plants*, *13*(7), 984. https://doi.org/10.3390/plants13070984

Mahawar, L., Zivcak, M., Barboricova, M., Kovar, M., Filacek, A., Ferencova, J., ... & Brestic, M. (2024). Effect of copper oxide and zinc oxide nanoparticles on photosynthesis and physiology of *Raphanus sativus* L. under salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *206*, 108281. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108281

Mahendran, G, & Rahman, L. U. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha× piperita* L.)—A review. *Phytotherapy Research*, *34*(9), 2088-2139.

McKay, D. L, & Blumberg, J. B. (2024). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, *20*(8), 619-633. https://doi.org/10.1002/ptr.1936

Naderi, A, & Amooaghaie, R. (2023). The effect of CuO nanoparticles and irrigation intervals on antioxidant responses,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

yield components and essential oil content in *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Plant Process and Function*, *12*(56), 59-74.

Nasiri, M., Safari, H., & Pourhadian, H. (2022). An investigation the effect of copper nanoparticles on morphological, physiological, biochemical properties and yield of Mallow under drought stress conditions. *Journal of Plant Process and Function*, *11*(48), 35-47.

Naz, I., Maryam, Chahel, A. A., Ahmad, I., Raza, A., Haider, M. W., ... & Manoharadas, S. (2025). Investigating the use of green synthesized copper oxide nanoparticles from *Melia azedarach* to combat cadmium stress in wheat. *Scientific Reports*, *15*(1), 27111.

Parmigiani, G., Garrett, E. S., Irizarry, R. A., & Zeger, S. L. (2023). The analysis of gene expression data: an overview of methods and software. *The Analysis of Gene Expression Data: Methods and Software*, 1-45. https://doi.org/10.1007/0-387-21679-0_1

Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Sodi, A. M., & Soldatini, G. F. (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, *54*(392), 2529-2540. https://doi.org/10.1093/jxb/erg270

Roy, D., Adhikari, S., Adhikari, A., Ghosh, S., Azahar, I., Basuli, D., & Hossain, Z. (2022). Impact of CuO nanoparticles on maize: Comparison with CuO bulk particles with special reference to oxidative stress damages and antioxidant defense status. *Chemosphere*, *287*, 131911. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131911

Shafiq, H., Shani, M. Y., Ashraf, M. Y., De Mastro, F., Cocozza, C., Abbas, S., ... & Brunetti, G. (2024). Copper oxide nanoparticles induced growth and physio-biochemical changes in maize (*Zea mays* L.) in saline soil. *Plants*, *13*(8), 1080. https://doi.org/10.3390/plants13081080

Trevisan, S. C. C., Menezes, A. P. P., Barbalho, S. M., & Guiguer, E. L. (2017). Properties of *Mentha piperita*: A brief review. *An International Peer Reviewed Journal for Pharmaceutical and Medical Research and Technology*, *3*(1), 309-13.

Veleshkolaii, F. R., Gerami, M., Younesi-Melerdi, E., Moshaei, M. R., & Ghanbari Hassan Kiadeh, S. (2024). Studying the impact of titanium dioxide nanoparticles on the expression of pivotal genes related to menthol biosynthesis and certain biochemical parameters in peppermint plants (*Mentha Piperita* L.). *BMC Plant Biology*, *24*(1), 531. https://doi.org/10.1186/s12870-024-05228-9

Yang, Z., Xiao, Y., Jiao, T., Zhang, Y., Chen, J., & Gao, Y. (2020). Effects of copper oxide nanoparticles on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings and the relevant physiological responses. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(4), 1260. https://doi.org/10.3390/ijerph17041260

Zhang, Y., Qi, G., Yao, L., Huang, L., Wang, J., & Gao, W. (2022). Effects of metal nanoparticles and other preparative materials in the environment on plants: From the perspective of improving secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70*(4), 916-933. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05152

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

Morphological, physiological, and menthol biosynthesis genes' expression responses in peppermint (*Mentha piperita* L.) under the influence of copper oxide nanoparticles

Somayeh Jami, Hamid Sobhanian*, Enayatollah Yazdanpanah, Gholamreza Bakshi Khaniki

Department of Biology ،Payame Noor University (PNU), P.O. Box 19395-4697, Tehran, Iran

Abstract

Given the importance of the medicinal plant peppermint and the antimicrobial and anti-inflammatory properties of menthol, as well as considering the capability of copper oxide (CuO) nanoparticle elicitors in inducing physiobiological responses, this study was conducted at Payam Noor University, Tehran in 2025 to explore the effects of CuO nanoparticles (NPs) treatment on peppermint traits in a completely randomized design with 3 repeats in the greenhouse. The first foliar application of CuO NPs at concentrations of 5, 10, and 20 mg/L was performed on peppermint approximately four months after stolon planting, and the second foliar application was conducted one month after the first application. The concentration of 5 mg/L increased plant height, fresh weight, and dry weight, whereas 10 and 20 mg/L led to a decrease in these traits. All nanoparticle concentrations had a negative effect on chlorophyll, causing a reduction in this pigment. In contrast, carotenoid, protein, and ascorbate peroxidase (APX) enzyme activity increased with rising nanoparticle concentrations, exhibiting a concentration-dependent response. Regarding anthocyanin, catalase, and superoxide dismutase (SOD), the 5 mg/L concentration had no significant effect on these traits, while 10 and 20 mg/L concentrations increased them. Essential oil percentage and the expression of *LS* and *MFS* genes were also only affected at concentrations of 10 and 20 mg/L. Overall, the response of traits to CuO NPs was dependent on both nanoparticle concentration and the type of trait. Increasing the concentration of CuO NPs induced oxidative stress and activated both enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Concurrent with this response, the essential oil percentage and the expression of menthol biosynthesis genes increased as metabolites. Therefore, a concentration of 5 mg/L of CuO NPs is recommended for inducing positive growth responses in peppermint plants.

Keywords: Elicitor, Essential oil, Medicinal plants, Secondary metabolite

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOI: DOI: 10.22034/15.71.217]

Received: Sep. 01, 2025; Revised: Sep. 09, 2025; Accepted: Sep. 23, 2025; Published Online: May. 02, 2026
*Corresponding Author: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir

Copyright © 2025 Iranian Society of Plant Physiology, Published by Isfahan University of Technology press. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.