

## پاسخ‌های مورفولوژی، فیزیولوژی و بیان ژن‌های بیوسنتز منتول در گیاه نعناع فلفلی (*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 نعناع فلفلی و خواص ضد میکروبی و ضد التهابی منتول و همچنین با عنایت به توانایی الیستورهای 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 نعناع فلفلی 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 نعناع فلفلی 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: الیستور، اسانس، گیاهان دارویی، متابولیت ثانویه

### مقدمه

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

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

\* نویسنده مسئول، رایانامه: [hamid.sobhanian@pnu.ac.ir](mailto: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/>

*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 ضد میکروبی، ضد التهابی و مسکن است (Mahendran and Rahman, 2020).

منتول از طریق مسیر بیوستنز ترپنوئیدها تولید می‌شود که با تشکیل ایزوپنتیل دی‌فسفات و دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات، به عنوان بلوک‌های سازنده ترین‌ها، 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-ایزوپیریتنول 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 بیوستنزی 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 ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) به خاطر خصوصیات منحصر به فرد و اثربخشی خود، توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند. نانوذرات اکسید مس به

عنوان الیستورهای 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 بیوستنز 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 الیستورهای 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 کربوهیدرات‌ها 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 (۲۰۲۴) 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 (۲۰۲۴) در آزمایش خود بر روی اثر نانوذرات اکسید مس (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی و تیمار آزمایشی:** این آزمایش در دانشگاه پیام‌نور تهران در سال ۱۴۰۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ 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 ۷۹/۵۴ گرم بر مول؛ خلوص نانوپودر: ۹۹/۹۹ درصد؛ اندازه ذرات نانوذرات: ۴۰ 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 طول موج 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

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 (۲۰۲۴) 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 لیمون ستنز و منتوفوران ستنز مسیر بیوسنتز منتول در گیاه دارویی نعناع‌فلغلی مورد بررسی قرار نگرفته است.

با توجه به اهمیت گیاه دارویی *M. piperita* و خواص ترکیب منتول و همچنین با عنایت به توانایی الیستورهای 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.

فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (با pH برابر ۶/۸)، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم، و ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳/۴ مولار) باهم ترکیب شدند. سپس، جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر اسپکتروفتومتری خوانده شد (Chance and Maehly, 1955).

**فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD):** ۳۰۰ میکرولیتر بافر واکنش حاوی تریتون 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 ریپوفلاوین 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 ۶۴۴ 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 طول موج 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 برگ‌ها 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 (Veleshkolai et al., 2024).

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

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 ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند تا وزن خشک آنها تعیین شود.

**رنگدانه‌های فتوسنتزی:** برای اندازه‌گیری محتوای برگ‌های رنگیزه‌های کاروتنوئید و کلروفیل، نخست ۰/۵ گرم برگ‌ها به همراه ۳۰ میلی‌لیتر استون ۸۵ درصد توسط هاون چینی به خوبی ساییده شد. سپس، عصاره برگ‌ها در ۲۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه، جذب فازهای بالایی نمونه‌ها از طریق اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ 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).

$Chl\ a = (12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8})$   
 $Chl\ b = (21.50 \times A_{646.8} - 5.1 \times A_{663.2})$   
 $Total\ chl = (7.15 \times A_{663.2} + 18.71 \times A_{646.8})$   
 $Car = (1000 \times A_{470} - 1.82 \times Chl\ a - 85.02 \times Chl\ b) / 198$   
 آنتوسیانین: ابتدا ۰/۱ گرم از وزن تر برگ‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی حل و خرد شد. بعد از سانتریفوژ عصاره به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور، فاز بالای آن جداسازی و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از ضریب خاموشی  $33000\ mM^{-1}cm^{-1}$  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 برگ‌ها استفاده می‌شود (Bradford, 1976).

**فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** ابتدا، ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر

جدول ۱- آغازگرهای ژنهای مورد استفاده در این پژوهش

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

با دستورالعمل شرکت دنایست، 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 دنایست، سنتز cDNA انجام شد. اجزا واکنش هم عبارتند از: آنزیم M-MLV Reverse Transcriptase، بافر واکنش x5، محلول ۰/۱ مولار DTT، مخلوط NTPها (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 دنایست) 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ :

$$\Delta Ct = Ct \text{ مورد نظر} - Ct \text{ ژن مرجع}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct\Delta \text{ نمونه تیمار} - \Delta Ct \text{ نمونه شاهد}$$

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

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.

## نتایج

یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیرگذاری نانوذرات اکسید مس بر صفات نعناع‌فلغلی 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 نعناع‌فلغلی در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۲).

**ارتفاع:** در شکل ۱، تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس ( $\text{CuO}$ ) بر ارتفاع گیاه نعناع‌فلغلی 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  $\text{CuO}$  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 (۲۰۲۴) 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  $\text{Cu}^{2+}$ ، 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  $\text{CuO}$ ، تعادل فیتوهورمون‌ها را برهم زده و با افزایش سطح اسید ABA و اتیلن و همزمان مهار اکسین‌ها و جیبرلین‌ها، تقسیم و طول‌شدن سلول‌ها را محدود می‌سازد. همچنین، غلظت بالای یون‌های  $\text{Cu}^{2+}$  سبب تنش یونی و اختلالات متابولیک مؤثر بر رشد گیاه می‌شود (Faraz et al., 2022).

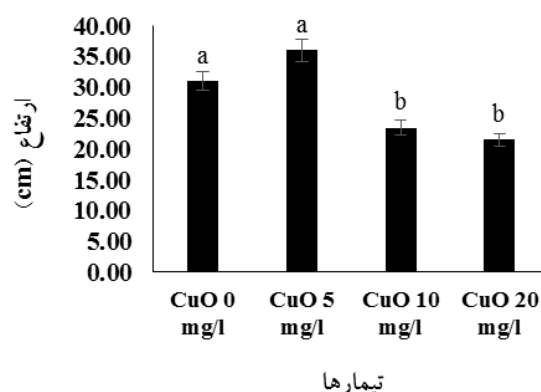
**وزن تر و خشک اندام هوایی:** بر اساس تغییرات روند وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه نعناع‌فلغلی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس ( $\text{CuO}$ )، با افزایش غلظت نانوذره از صفر به ۵ میلی‌گرم بر لیتر، وزن تر گیاه

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات نعناع فلفلی تحت تأثیر نانوذرات اکسید مس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					ارتفاع	وزن تر	وزن خشک	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید
		کارتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	وزن خشک							
نانوذرات	۳	۱۳۷/۰۷**	۲/۷۷**	۰/۰۳۷**	۵/۵۴**	۱/۰۹**	۸/۱۷**	۱/۰۱**					
خطا	۸	۱۰/۲۴	۰/۲۸	۰/۰۰۲۶	۰/۱۸	۰/۰۸	۰/۶۲	۰/۰۷					
ضریب تغییرات	-	۱۱/۴۲	۱۳/۶۶	۱۰/۷۱	۹/۵۳	۱۴/۱۵	۱۳/۳۸	۱۴/۱۹					

ادامه جدول ۲ -

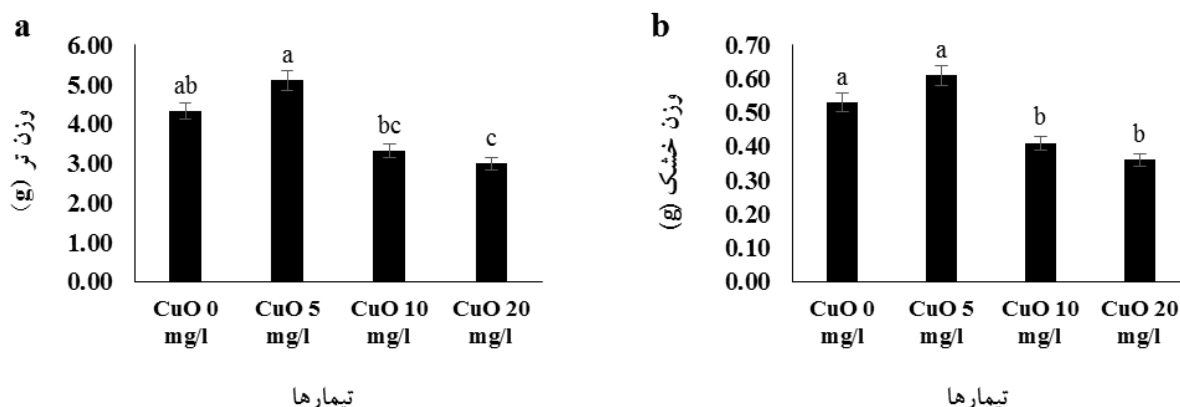
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		آنتوسیانین	پروتئین	CAT	SOD	APX	بیان LS	بیان MFS	درصد اسانس
نانوذرات	۳	۰/۰۰۱۴**	۸۷/۶۷**	۲۸۰/۲۹**	۸/۱۴**	۰/۱۹**	۳/۶۹**	۲/۶۱**	۰/۷۱**
خطا	۸	۰/۰۰۰۰۵	۸/۲۳	۱۸/۴۲	۰/۳۸	۰/۰۰۵	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۰۶۸
ضریب تغییرات	-	۱۱/۴۵	۱۵/۱۴	۱۶/۲۲	۱۴/۰۳	۱۳/۵۷	۱۳/۹۳	۱۶/۶۲	۱۵/۰۴



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر ارتفاع گیاه نعناع فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0/05$  است.

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 (۲۰۲۴) 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

به‌طور غیرمعماداری افزایش یافت که نشان‌دهنده اثر تحریک‌کننده ضعیف نانوذرات در غلظت پایین است. با این حال، با تداوم 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).



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر وزن تر (a) و خشک (b) اندام هوایی گیاه نعناع‌فلغلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0/05$  است.

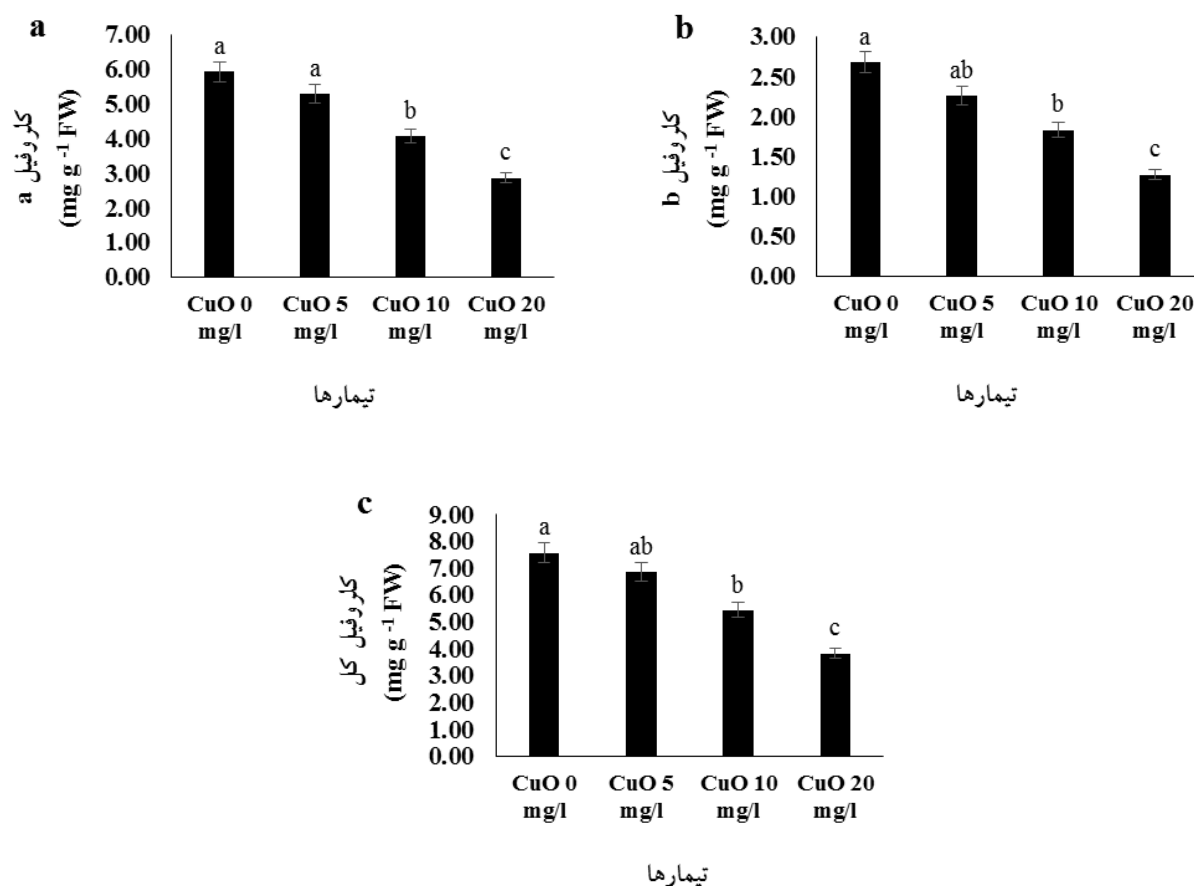
ذخایر کربوهیدرات ضروری برای تجمع زیست‌توده را تخلیه می‌نمایند. علاوه‌براین، غلظت بالای نانوذرات جذب مواد مغذی را مختل کرده و عدم تعادل هورمونی ایجاد می‌کنند و منابع را به سمت پاسخ‌های تنش به‌جای تولید زیست‌توده بازتخصیص می‌دهند (Yang et al., 2020). این مکانیسم‌ها به‌طور هم‌افزایی کاهش رشد در غلظت‌های 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 نعناع‌فلغلی به‌طور غیرمعنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. اما با افزایش غلظت به ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت کلروفیل آ، ب و کل به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافتند. به عبارتی دیگر، پاسخ محتوای کلروفیل برگی گیاه نعناع‌فلغلی به محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس به شیوه‌ای وابسته به غلظت بود. بیشترین کاهش کلروفیل محلول‌پاشی ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید مس بدست آمد به‌طوری‌که غلظت کلروفیل a، b و کل به‌طور میانگین حدود ۵۰ درصد کاهش نسبت به شاهد داشتند (شکل ۳ a، b و c).

همسو با یافته‌های ما، Shafiq و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که غلظت بالای نانوذرات اکسید مس سبب کاهش محتوای کلروفیل شد. همچنین، Naderi و همکاران (۲۰۲۳)

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



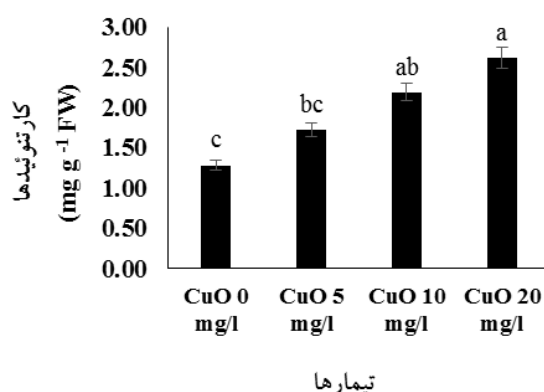
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر غلظت کلروفیل a (a)، b (b) و کل (c) (میلی گرم بر گرم وزن تر) گیاه نعناع فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

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 کارتنوئیدهای برگ گیاه نعناع فلفلی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) در شکل ۴ نشان داده شده است. روند کلی

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 نعناع فلفلی 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



شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر غلظت کارتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گیاه نعنای فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

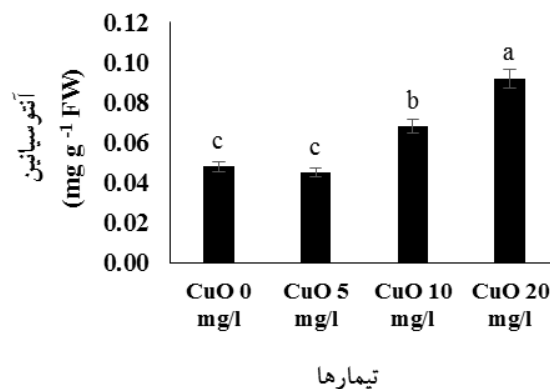
رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود.

افزایش محتوای کارتنوئید در نعنای فلفلی 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 کارتنوئیدها 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 پروموتور ژن‌های بیوسنتز کارتنوئید 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 کارتنوئیدها 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 ۱/۴ برابر افزایش داد،

تغییرات با افزایش غلظت نانوذره، افزایشی است؛ به‌طوری‌که کمترین مقدار کارتنوئید 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 کارتنوئیدها نسبت به تیمار شاهد، در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب حدود ۱/۴ و ۱/۹ برابر افزایش را نسبت به شاهد نشان می‌دهند. با توجه به داده‌ها، بهترین غلظت CuO برای افزایش محتوای کارتنوئیدهای برگ، تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره است که بالاترین مقدار کارتنوئیدهای برگ را رقم زد (شکل ۴).

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 برگ 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



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر مقدار آنتوسیانین (میلی گرم بر گرم وزن تر) گیاه نعناع فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0/05$  است.

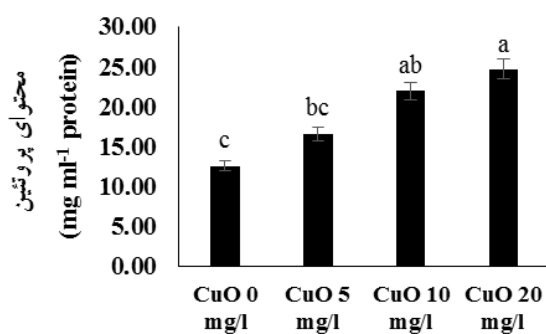
سطح پایینی ایجاد می‌کنند که توسط سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی ذاتی گیاه به‌طور مؤثر خنثی می‌شود بدون آنکه سنتز قابل توجهی از آنتوسیانین را القا کند (Naz et al., 2025). با این حال، در غلظت‌های بالاتر، مقادیر بیش از حد ROS تولید می‌شود. این بار اضافی ROS به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده عمل می‌کند و آبشارهای کیناز پروتئین فعال شده با میتوزن (MAPK) را فعال می‌کند و منجر به افزایش بیان فاکتورهای رونویسی کلیدی مانند MYB75 و bHLH می‌شود که به پروموتورهای ژن‌های بیوسنتزی آنتوسیانین متصل می‌شوند. در نتیجه، آنزیم‌هایی مانند کالکون سنتاز بیشتر تولید می‌شوند که تبدیل پیش‌سازهای فنیل پروپانوییدی به آنتوسیانین‌ها را تسریع می‌کند (Roy et al., 2022).

**غلظت پروتئین:** یافته‌های ما مؤید این مطلب است که پاسخ غلظت پروتئین گیاه نعناع فلفلی 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 نعناع فلفلی 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

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 (۲۰۲۴) 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



تیمارها

شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر غلظت پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گیاه نعنای فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0/05$  است.

اس-ترانسفرازها) را تشدید می‌کند (Graciano *et al.*, 2024).

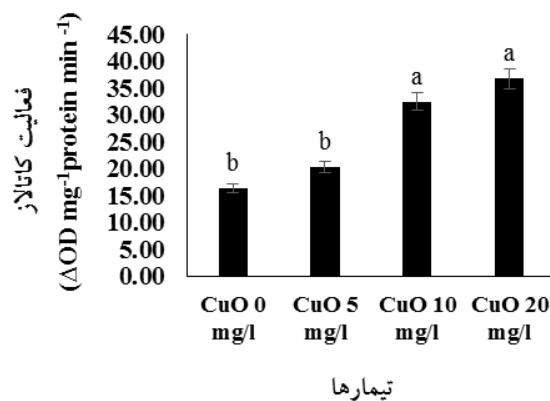
**فعالیت آنزیم کاتالاز:** مطالعه ما نشان داد که محلول‌پاشی نانوذرات اکسید مس سبب ایجاد تغییرات محسوسی در فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود که البته این تغییرات وابسته به غلظت نانوذرات اکسید مس بود. هر چند غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد اما این افزایش معنی‌دار نبود و به عبارتی غلظت نانوذره برای تحریک فعالیت کاتالاز کافی نبود. در مقابل، غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز شدند به طوری که 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 (۲۰۲۴) دریافتند که نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. علاوه بر این، 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، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر خصوصیات رشدی گیاه خردل

شناخته شد (شکل ۶).

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 (۲۰-۱۰۰ 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 گلوکوتایون



شکل ۷- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر فعالیت کاتالاز (اختلاف جذب میلی گرم پروتئین بر دقیقه) گیاه نعناع فلفلی. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلافات معنی دار در سطح  $P < 0/05$  است.

ترتیب سبب افزایش ۱/۸ و ۲/۳ برابری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در گیاه نعناع فلفلی شدند. به ویژه، غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر توانست بیشترین القاکنندگی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به ارمغان آورد (شکل ۸).

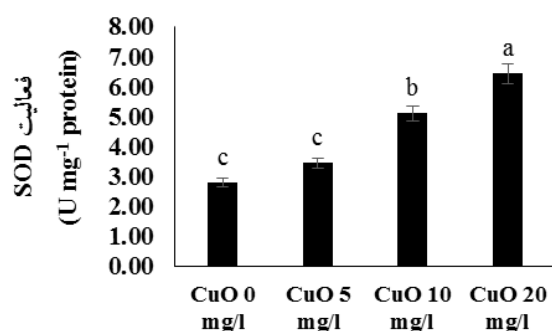
همسو با یافته‌های ما، Amooaghaie و Naderi (۲۰۲۳) گزارش کردند که محلول پاشی برگی با نانوذرات تا غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر، باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز می‌شود. همچنین، Naderi و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که محلول پاشی با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی رازیانه می‌شود. به علاوه، Mahawar و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند که غلظت ۱۰۰ میلی گرم 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 فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ MAPK و فیتوهورمون‌ها است. انفجار ROS، کینازهای پروتئین فعال‌شده با میتوزن (MAPKs) را فعال می‌کند که به نوبه خود فاکتورهای رونویسی (مانند NAC و ZAT) را فسفریله کرده و به عناصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی (AREs) در پروموتورهای SOD متصل می‌شوند. همزمان، نانوذرات منجر به افزایش جاسمونات می‌شوند که بیان SOD را از طریق مسیرهای وابسته به MYC2

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

افزایش وابسته به دوز در فعالیت کاتالاز مشاهده شده در نعناع فلفلی تیمار شده 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 (۲۰-۱۰۰ میلی گرم 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 مواجهه 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 میلی گرم بر لیتر برای تحریک‌کنندگی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کافی نبود، اما غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر منجر به افزایش معنی دار فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شدند. غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر به



تیمارها

شکل ۸- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (واحد میلی‌گرم پروتئین) گیاه نعنای فلفلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

می‌شوند. همچنین در آزمایشی بر روی اثر نانوذرات اکسید مس (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر صفات گیاه تربچه، Mahawar و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که نانوذرات اکسید مس سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز می‌شود.

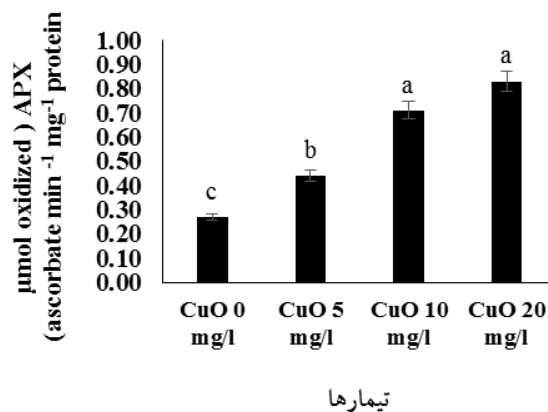
افزایش وابسته به غلظت در فعالیت آنزیم APX در گیاهان تیمار شده با نانوذرات اکسید مس عموماً ناشی از تنش اکسیداتیو است. افزایش ROS، فاکتورهای رونویسی حساس به ردوکس را فعال کرده که بیان ژن‌های APX و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را افزایش می‌دهد. همزمان، سیگنالینگ فیتوهورمون‌ها (به‌ویژه جاسمونیک) توسط نانوذرات CuO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

**یان ژن‌های LS و MFS:** به عنوان یکی از ترکیبات مهم گیاه نعنای فلفلی، لیمون توسط یک مسیر بیوستزی متشکل از چندین آنزیم به ویژه لیمون سنتاز و متوفوران 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 ۱/۴، ۲/۸ و ۳/۵ برابری بیان ژن LS شدند. با این تفاوت که غلظت‌های ۱۰ و ۲۰

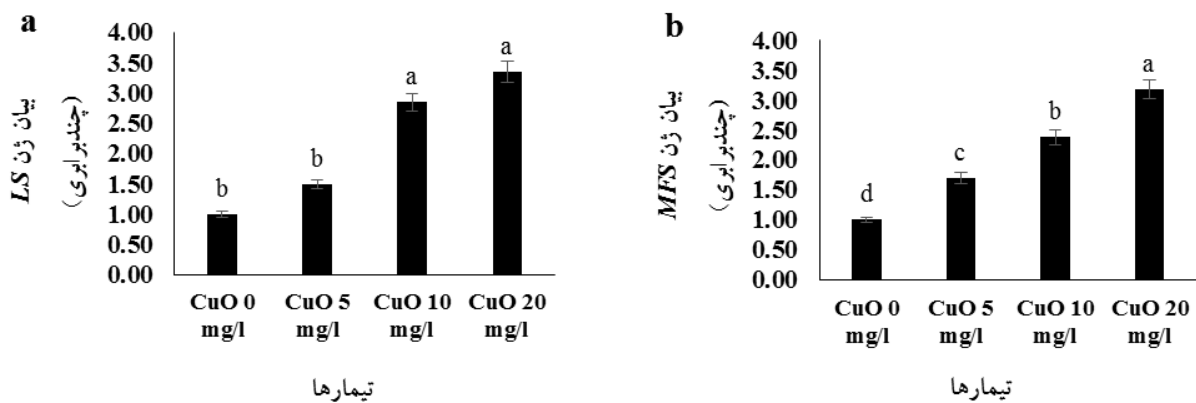
تقویت می‌کند (Faraz et al., 2022). بنابراین، افزایش فعالیت در غلظت‌های بالاتر، بازتاب اختلال در تعادل استوکیومتری بین تولید ROS و ظرفیت سم‌زدایی اولیه است که القای حداکثری SOD را به‌عنوان پاسخ بقای سلولی تحمیل می‌کند.

**فعالیت آسکوربات پراکسیداز:** بررسی پاسخ فعالیت آسکوربات پراکسیداز به تیمار نعنای فلفلی 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 در حالی که 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 ۲/۶ و ۳ برابری را در فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاه نعنای فلفلی 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، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر خصوصیات رشدی گیاه خردل هندی متوجه شدند که نانوذرات اکسید مس منجر به افزایش فعالیت پراکسیدازها



شکل ۹- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز (میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه بر میلی گرم پروتئین) نعنای فلفلی. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلافات معنی دار در سطح  $P < 0/05$  است.



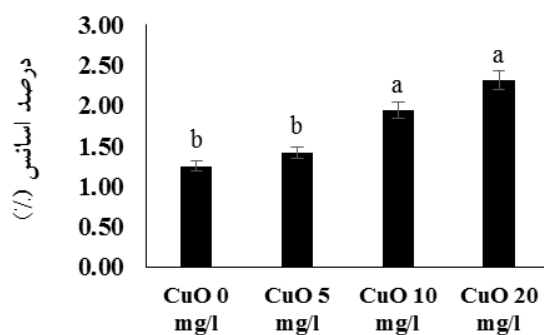
شکل ۱۰- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر بیان ژن های (a) *LS* و (b) *MFS* گیاه نعنای فلفلی. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلافات معنی دار در سطح  $P < 0/05$  است.

CuO سبب آزادسازی یون های  $\text{Cu}^{2+}$  می شوند که به هسته نفوذ کرده و مستقیماً مارک های اپی ژنتیک (مانند استیل اسیون هیستون) را تعدیل می کنند و متعاقباً خوشه های ژنی بیوستنزی را متأثر می نمایند (Naz et al., 2025).

درصد اسانس: نتایج مطالعه ما نشان داد که پاسخ درصد اسانس نعنای فلفلی به تیمار نانوذرات اکسید مس وابسته به غلظت است. تیمار ۵ میلی گرم بر لیتر در غلظت پایین نتوانست درصد اسانس را به طور معنی داری افزایش دهد. این در حالی بود که تیمار ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر توانستند درصد اسانس را به طور معنی داری افزایش دهند. غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب موجبات افزایش ۱/۵ و ۱/۸ برابری

میلی گرم بر لیتر در اثرگذاری بر بیان ژن *LS* باهم اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۱۰ a و b).

تاکنون، تأثیر نانوذرات اکسید مس بر بیان ژن های درگیر در بیوستنزی لیمون در گیاهان مورد مطالعه قرار نگرفته است لذا شواهد اندکی برای مقایسه نتایج ما وجود دارد. از نظر مکانزیمی، نانوذرات CuO در غلظت های بالا همئوستازی یونی را مختل کرده و تنش فلزات سنگین را تقلید می کنند، که آبشارهای سیگنالینگ کلسیم را فعال کرده و موجب فسفریلاسیون کینازهای MAP می شوند. این کینازها مسیرهای هورمونی را فعال می کنند که به نوبه خود بیان ژن های متابولیت های ثانویه را تقویت می نمایند. علاوه بر این، نانوذرات



تیمارها

شکل ۱۱- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات اکسید مس (CuO) بر درصد اسانس گیاه نعناع‌فلغلی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلافات معنی‌دار در سطح  $P < 0/05$  است.

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 نعناع‌فلغلی را به صورت 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 متوفوران سنتاز تحت تیمار نانوذرات بود که نشان‌دهنده تحریک مسیر بیوستز منتول در سطح رونویسی است. این مطالعه به وضوح 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.

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 نعناع‌فلغلی 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 بیوستز 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

## 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](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,

- 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](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>

## 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

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.