

## Antioxidative and pigment response of Japanese barberry (*Berberis thunbergii*) to Zinc oxide and Cerium dioxide nano elicitors

Hadiseh Sadeghi<sup>1</sup> , Jafar Ahmadi<sup>2\*</sup> , Farhad Habibzadeh<sup>3</sup> , Sedigheh Fabriki Ourang<sup>4</sup> 

1. M.Sc. Graduated, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
2. Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3. Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
4. Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

**Citation:** Sadeghi, H., Ahmadi, J., Habibzadeh, F., Fabriki Ourang, S. (2024) Antioxidative and pigment response of Japanese barberry (*Berberis thunbergii*) to Zinc oxide and Cerium dioxide nano elicitors. *Plant Productions*, 47(1), 131-146

### Abstract

#### Introduction

Japanese barberry (*Berberis thunbergii*) is a perennial and woody shrub that grows in different regions of Iran and the world. The Berberidaceae family has a high potential in food and pharmaceutical industries due to its antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. Elicitors are biotic or abiotic stimulators that can induce responses in plants. Abiotic elicitors are used to increase secondary metabolites in plants. Nanoparticles have minimum dimensions between one and 100 nanometers, which have specific physical and chemical properties. Like many nanoparticles, zinc oxide and cerium dioxide nanoparticles are toxic to living organisms. The mechanism of toxicity of nanoparticles is generally contributed to the induction of oxidative stress which lead to the formation of free radicals. Nanoparticles of zinc oxide and cerium dioxide can increase the antioxidant capacity of plants by stimulating oxidative stress.

#### Material and methods

In order to study the changes in the physiological and biochemical characteristics of Japanese barberry under the influence of abiotic elicitors, an experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in the greenhouse and laboratory of the Faculty of Agriculture and Natural Resources of Imam Khomeini International University in 2019. Treatments were included zinc oxide elicitors (0.1 g/L) and cerium dioxide nanoparticles (0.0002

---

\* **Corresponding Author:** Jafar Ahmadi  
**E-mail:** j.ahmadi@eng.ikiu.ac.ir



g/L) and control (no elicitor). In this research, the amounts of protein, antioxidant enzymes and photosynthetic pigments in tissues of Japanese barberry were measured. Data analysis was done with SAS 9.1.3 statistical software. Comparison of means was done with Duncan's multiple range test and graphs were drawn using Excel software.

### Results and Discussion

The results of the data analysis of variance showed that the effect of treatment with cerium dioxide and zinc oxide nanoparticle elicitors on the amount of leaf protein, antioxidant activity and also the amount of photosynthetic pigments was significant. Comparison of the means showed that these two elicitors increased the leaf protein content by 26.2% and 12.4%, respectively, compared to the control, but they did not have a significant effect on the root protein content. Cerium dioxide decreased the activity of guaiacol peroxidase enzyme by 77.1% in the root; But in leaves, the activity of this enzyme increased by 134.8% due to treatment with zinc oxide. The highest activity of leaf superoxide dismutase enzyme (25.2% increase compared to control) was related to zinc oxide treatment. The lowest content of catalase enzyme in leaves and roots was obtained with cerium dioxide and zinc oxide. Zinc oxide increased the activity of leaf ascorbate peroxidase enzyme by 111.8%; In the root, the highest and lowest activity levels of this enzyme were obtained in the control and cerium dioxide treatments, respectively. Both elicitors significantly increased the leaf peroxidase enzyme activity compared to the control (128.6% and 157.1%, respectively); However, only the treatment with zinc oxide caused a significant increase of 25.5% in the activity of this enzyme in the root. The highest activity of glutathione reductase enzyme in leaf and root was observed in zinc oxide treatment (23.3% and 12.5% increase compared to control). Nano zinc oxide increased the amount of total chlorophyll and carotenoid in the leaves compared to the control by 93.4 and 67.5%, respectively.

### Conclusion

It was concluded that zinc oxide nanoparticles elicitor had the greatest effect in increasing the amount of photosynthetic pigments and enzyme activity. By using this elicitor in Japanese barberry culture, the amount of antioxidant enzymes can be increased and the extract can be used as a strong antioxidant in pharmaceutical products.

**Keywords:** Antioxidant, Enzyme, Nanoparticles, Photosynthetic pigments, Physiological traits

## پاسخ آنتی اکسیداتیو و رنگدانه‌ای گیاه زرشک ژاپنی (*Berberis thunbergii*) به نانو الیستورهای اکسید روی و دی اکسید سریم

حدیثه صادقی<sup>۱</sup>، جعفر احمدی<sup>۲\*</sup>، فرهاد حبیب‌زاده<sup>۳</sup>، صدیقه فابریکی اورنگ<sup>۴</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
- ۲- استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
- ۳- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران
- ۴- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

### چکیده

زرشک ژاپنی (*Berberis thunbergii*)، درختچه‌ای چندساله و چوبی است که در مناطق مختلفی از ایران و جهان می‌روید. به منظور مطالعه تغییرات صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی زرشک ژاپنی تحت تأثیر الیستورهای غیرزنده، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه و آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد. در این پژوهش، سه تیمار شامل الیستورهای نانو اکسید روی (ZnO) با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر و نانو ذره دی اکسید سریم (CeO<sub>2</sub>) با غلظت ۰/۰۰۰۲ گرم در لیتر و شاهد (بدون الیستور)، در سه تکرار بررسی و میزان پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین رنگیزه‌های فتوسنتزی مورد استخراج و اندازه‌گیری قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار با الیستورهای نانو ذرات دی اکسید سریم و اکسید روی بر میزان پروتئین برگ، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که این دو الیستور محتوای پروتئین برگ را نسبت به شاهد به ترتیب به میزان ۲۶/۲ و ۱۲/۴ درصد افزایش دادند ولی بر محتوای پروتئین ریشه تأثیر معنی‌داری نداشته‌اند. دی اکسید سریم باعث کاهش ۷۷/۱ درصدی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه گردید؛ ولی در برگ، فعالیت این آنزیم بر اثر تیمار با اکسید روی ۱۳۴/۸ درصد افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ (افزایش ۲۵/۲ درصدی نسبت به شاهد) به تیمار اکسید روی مرتبط بود. کم‌ترین محتوای آنزیم کاتالاز برگ و ریشه با دی اکسید سریم و اکسید روی به دست آمد. اکسید روی باعث افزایش ۱۱۱/۸ درصدی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ گردید؛ در ریشه، بیشترین و کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب از تیمار شاهد و دی اکسید سریم به دست آمد. هر دو الیستور، فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ را نسبت به شاهد بطور معنی‌داری افزایش دادند (به ترتیب ۱۲۸/۶ و ۱۵۷/۱ درصد)؛ ولی، تنها

تیمار با اکسید روی موجب افزایش معنی‌دار و ۲۵/۵ درصدی فعالیت این آنزیم در ریشه گردید. بیشترین فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز برگ و ریشه در تیمار با اکسید روی مشاهده شد (افزایش ۲۳/۳ و ۱۲/۵ درصدی نسبت به شاهد). نانو اکسید روی میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ را نسبت به شاهد به ترتیب ۹۳/۴ و ۶۷/۵ درصد افزایش داد. از این تحقیق چنین نتیجه‌گیری شد که الیستور نانوذرات اکسید روی بیشترین تأثیر را در افزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌ها داشته است. با استفاده از این الیستور در کشت زرشک ژاپنی می‌توان میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را افزایش داد و از عصاره گیاه به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی در تولیدات دارویی بهره‌مند شد.

### کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنزیم، رنگدانه فتوسنتزی، صفات فیزیولوژیکی، نانوذرات

#### مقدمه

نانوذرات، مجموعه‌های اتمی یا مولکولی با حداقل ابعاد بین یک تا ۱۰۰ نانومتر هستند که خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی در مقایسه با مجموعه‌های بزرگتر خود دارند. نانوذرات اکسیدهای فلزی دارای خواص فیزیکی و شیمیایی خاصی (حرارتی، سطحی، الکتریکی و نوری) می‌باشند. از میان نانوذرات اکسید فلزی پرکاربرد در صنایع مختلف، می‌توان به اکسید روی، دی‌اکسید تیتانیوم، اکسید نقره، دی‌اکسید سرب و نانوذرات اکسید مس اشاره کرد (Santás-Miguel *et al.*, 2023). جذب، جابه‌جایی و تجمع نانوذرات بسته به گونه گیاهی و نوع، اندازه، ترکیب شیمیایی، ساختمان و استحکام نانوذرات متفاوت می‌باشد (Rivero-Montejo *et al.*, 2021).

عنصر روی، یک ریزمغذی ضروری برای گیاه و جزء مهم بسیاری از آنزیم‌ها بوده، سنتز هورمون‌ها و کلروفیل را تنظیم نموده و برای متابولیسم کربوهیدرات‌ها ضروری است؛ اما معمولاً در قالب کود سولفات روی استفاده می‌شود. گیاهان می‌توانند نانوذرات ZnO را جذب و روی را انباشته کنند (Prasad *et al.*, 2021; Ghanbari *et al.*, 2021). گزارش شده که تیمار نانوذرات اکسید روی باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت پراکسیداز گردید و اینکه نانوذرات اکسید روی، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را تحریک می‌کنند که اولین اثری است که هنگام ورود نانوذرات به گیاهان شناسایی می‌شود (García-López *et al.*, 2019).

زرشک ژاپنی (*Berberis thunbergii*) یا زرشک زینتی، به خانواده بربریداسه تعلق دارد. تعداد ۵۰۰ گونه درختچه برگریز و همیشه سبز در این جنس وجود داشته که در آسیای جنوبی، ایالات متحده، اروپا و مناطق شمالی ایران و پاکستان استقرار دارند. این گیاه، درختچه‌ای چندساله و چوبی بوده، از طریق بذور و رویشی تکثیر می‌شود و خواص دارویی نیز دارد (Rahimi *et al.*, 2017; Vojodimehrabani, *et al.*, 2019). آلکالوئیدها (از جمله بربرین)، تانن‌ها و ترکیبات فنلی، ترکیب شیمیایی زرشک می‌باشند (Khan *et al.*, 2016). عصاره متانولی برگ زرشک ژاپنی، بالاترین ارزش آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌ها را نشان داده است؛ از این رو، برگ این گیاه کاندید مناسبی برای تهیه محصولات دارویی است (Fernández-Poyatos *et al.*, 2019; Och, *et al.*, 2023).

محرک‌های زیستی و غیرزیستی (به عنوان الیستور)، موجب القای پاسخ‌هایی در گیاه و سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در سلول‌ها می‌شوند. این ترکیبات با ارسال پیام‌های شیمیایی، پاسخ‌های فیزیولوژیک را ایجاد نموده که به دنبال آن، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شوند. الیستورها با فعال ساختن ژن جدید، آنزیم‌ها و مسیرهای مختلف بیوسنتزی و تشکیل متابولیت‌های ثانویه را موجب می‌گردند (Kumari *et al.*, 2020).

دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) نگهداری شدند. آبیاری به فاصله دو روز انجام شد. این پژوهش در دو مرحله اجرا گردید. در اردیبهشت ۱۳۹۹، گلدان‌های زرشک ژاپنی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار شامل شاهد (بدون الیستور)، نانوذره اکسید روی (ZnO) با غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر (Zinc oxide nanopowder, <25 nm) و نانوذره دی‌اکسید سریم (CeO<sub>2</sub>) با غلظت ۰/۰۰۰۲ گرم بر لیتر (Cerium (IV) oxide nanopowder, <25 nm) (particle size (Sigma Aldrich) در سه تکرار بررسی شدند (Rivero-Montejo *et al.*, 2021; Mazaheri-Tirani and Dayani, 2020). گلدان‌ها با قطر و ارتفاع ۲۰ و ۱۸ سانتی‌متر بود و از خاک گلخانه مخصوص کشت نهال درختی استفاده شد. قبل از اعمال تیمار، آبیاری گلدان‌ها انجام گردید و پس از گذشت پنج روز و اطمینان از خروج آب اضافی، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از ترکیبات نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید سریم در دو نوبت و به فاصله دو روز از هم به گلدان‌های حاوی گیاهان اعمال گردید. سه گلدان هم به عنوان شاهد و بدون دریافت تیمار در گلخانه نگهداری شد و به جای تیمار، از آب مقطر به همان مقدار استفاده گردید. برداشت نمونه‌های برگي و ریشه برای انجام مطالعات صفات فیزیولوژیکی - بیوشیمیایی، سه روز بعد از اعمال تیمار انجام شد؛ سپس در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند (Farahi *et al.*, 2023).

#### اندازه‌گیری رنگدانه‌های فتوستتزی

به منظور اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید، ۰/۲ گرم نمونه برگ را با نیتروژن مایع، در هاون چینی کاملاً ساییده و پس از قرار دادن نمونه گیاهی در لوله سانتریفیوژ محتوی ۰/۵ میلی‌لیتر

سریم، به عنوان فراوان‌ترین عنصر کمیاب در پوسته زمین، به طور وسیعی در صنایع مختلف استفاده می‌شود. دی‌اکسید سریم (سریا)، یکی از اکسیدهای فلزی لانتانید است که به داشتن پتانسیل اکسایش-کاهش معروف است (Mishra and Ahmaruzzaman, 2021). مطالعات اندکی در ارتباط با تأثیر نانواکسید سریم بر متابولیت ثانویه گیاهان دارویی انجام شده است. نانوذرات اکسید سریم می‌تواند تنش اکسیداتیو را تحریک یا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کند. مطالعات نشان داده است که توانایی مهار رادیکال آنتی‌اکسیدان آنزیمی ممکن است تحت تأثیر نانوذرات CeO<sub>2</sub> قرار گیرد (Wu *et al.*, 2014). در ریشه‌های برنج، نانوذرات CeO<sub>2</sub> تولید پراکسید هیدروژن را افزایش داده است (Rico *et al.*, 2013).

با توجه به اینکه عصاره زرشک ژاپنی اثرات بیولوژیکی مثبتی، از جمله بدلیل دارا بودن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی داشته و مطالعات اندکی نیز در مورد ترکیب فیتوشیمیایی این گیاه انجام شده است (Fernández-Poyatos *et al.*, 2019; Och, *et al.*, 2023)؛ لذا، این آزمایش به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه زرشک ژاپنی و امکان افزایش این فعالیت‌ها در اثر کاربرد نانو الیستورهای غیر زیستی اکسید روی و دی‌اکسید سریم طراحی گردید. نتایج این تحقیق می‌تواند مسیرهای بیشتری را برای ارزش‌گذاری این گونه به عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی به منظور ارائه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جدید و ایمن‌تر برای توسعه محصولات کاربردی در صنایع دارویی یا غذایی هموار نماید.

#### مواد و روش‌ها

##### اجرای آزمایش و اعمال تیمارها: گلدان‌های

حاوی درختچه‌های دوساله زرشک ژاپنی از گونه *Berberis thunbergii* که از طریق قلمه تکثیر شده بودند، در پاییز سال ۱۳۹۸ از شهرداری قزوین تهیه و در

۰/۰۲ گرم بر میلی‌لیتر بود. نمونه شاهد و نمونه حاوی عصاره آنزیمی به مدت ۲۴ ساعت، به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی محلول داخل تیوب ریخته شد، سپس ۲۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه گردید، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۵ و ۶۴۹ نانومتر برای کلروفیل a و کلروفیل کل و ۴۷۰ نانومتر برای تعیین میزان کاروتنوئیدها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Gitelson and Merzlyak, 1997).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۴) و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه با یکدیگر مخلوط شدند. با افزودن آب اکسیژنه واکنش آغاز و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان آب اکسیژنه تجزیه شده توسط آنزیم محاسبه گردید (Aebi, 1984).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ را با ۰/۳۴ میکرولیتر آب اکسیژنه ۰/۵ میلی‌مولار مخلوط کرده، بلافاصله به آن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید. در نهایت با اضافه کردن ۸۰ میکرولیتر آسکوربات ۱ میلی‌مولار، منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. عدد حاصل میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه نشان می‌دهد (Nakano and Asada, 1981).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی را با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۳ میکرولیتر مایع گایاکول خالص و سپس یک میکرولیتر آب اکسیژنه مخلوط شده و بلافاصله تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید (Gulen and Eris, 2004).

اتانول ۹۶ درصد، همگن شد. نمونه‌ها پس از نگهداری در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت، به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی محلول داخل تیوب ریخته شد، سپس ۲۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه گردید، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۵ و ۶۴۹ نانومتر برای کلروفیل a و کلروفیل کل و ۴۷۰ نانومتر برای تعیین میزان کاروتنوئیدها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Gitelson and Merzlyak, 1997).

#### اندازه‌گیری محتوای پروتئین محلول کل

۰/۲ گرم بافت برگ و ریشه در حضور ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (شامل بافر پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و یک گرم پلی‌وینیل پیرولیدون، همگن و بعد از سانتریفیوژ (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) مقادیر مشخصی از مایع رویی با معرف برادفورد مخلوط و جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین گردید. با رسم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی، مقادیر نهایی پروتئین‌های محلول کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید (Bradford, 1976).

#### تعیین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: ۲۰

میکرولیتر از عصاره استخراج شده با ۱۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۶/۱) به همراه ۵۰۰ میکرولیتر گایاکول و ۵۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن مخلوط و شدت جذب نمونه در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در فواصل زمانی ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید (Upadhyaya et al., 1985).

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

از طریق توانایی در مهار کاهش فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم مورد سنجش قرار گرفت. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸)، متیونین ۰/۴۴۷ گرم بر میلی‌لیتر، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار (pH=8)، نیتروبلوتترازولیوم (NBT)

نانوذرات، بسته به مدت زمان قرارگرفتن در معرض و شرایط محیطی، متفاوت است. گزارش شده است که حضور نانوذرات در سلولهای گیاهی ممکن است رفتاری مشابه یونهای فلزی داشته باشد و با گروههای سولفیدریل، کربوکسیل واکنش داده و در نهایت، میزان پروتئین را تغییر دهد (Hossain *et al.*, 2015). قرار گرفتن در معرض نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های پایین، به طور قابل توجهی محتوای پروتئین محلول کل برگ‌ها را در نخود سبز (فرنگی) افزایش داد (Mukherjee *et al.*, 2014). گزارش گردیده که نانوذرات دی‌اکسید سریم منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین دانه گندم نسبت به شاهد شده است (Wenchao *et al.*, 2015). روند الگوی افزایش و سپس کاهش در محتوای پروتئین در گیاه همیشه‌بهار نیز مشاهده شد. افزایش محتوای پروتئین این گیاه در غلظت‌های پایین نانوذرات دی‌اکسید سریم، احتمالاً به دلیل افزایش سنتز پروتئین‌ها، به ویژه پروتئین‌های مربوط به سیستم دفاعی بود. کاهش محتوای پروتئین در غلظت‌های بالاتر دی‌اکسید سریم به دلیل تولید بیش از حد ROS، تنش اکسیداتیو شدید و آسیب ساختار پروتئین‌ها ایجاد شد (Jahani *et al.*, 2019).

در این پژوهش، تیمار نانو دی‌اکسید سریم و نانو اکسید روی به ترتیب موجب کاهش ۷۷/۱ و ۱۳/۲ درصدی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه گیاه زرشک ژاپنی نسبت به شاهد گردیدند. در برگ، بیشترین فعالیت این آنزیم بر اثر تیمار با الیستور اکسید روی بود (افزایش ۱۳۴/۸ درصد نسبت به شاهد) و الیستور دی‌اکسید سریم نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری در فعالیت آن ایجاد نکرد (شکل 2a). تنش‌های مختلف محیطی منجر به تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند. نانوذرات  $\text{CeO}_2$  بسته به بار سطحی، pH اطراف و مکان‌یابی درون سلولی می‌توانند تنش اکسیداتیو را القاء یا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل نمایند (Asati *et al.*, 2010).

## اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز

به روش Malan *et al.*, (1990) بر اساس احیاء گلوکاتایون اکسید شده (GSSG) توسط آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز با مصرف NADPH بود. مخلوط واکنش شامل بافر ۵۰ میلی‌مولار، ۵۰۰ میکرولیتر (pH=۷) که شامل ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۴۰ میکرولیتر EDTA (۰/۲ میلی‌مولار) و ۹۹/۵۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد، به علاوه ۵۰ میکرولیتر گلوکاتایون اکسید شده (GSSG) ۲۰ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر NADPH ۲ میلی‌مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۲/۵ میکرولیتر عصاره استخراج شده بود. سپس کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه به مدت ۶۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

## آنالیز داده‌ها

آنالیز داده‌ها با نرم افزار آماری SAS 9.1.3 انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری پنج و یک درصد انجام و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار با الیستورهای نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید سریم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ و ریشه و همچنین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ (به استثنای گلوکاتایون ردوکتاز ریشه که در سطح احتمال خطای پنج درصد معنی‌دار گردید)، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱، ۲ و ۳). تاثیر تیمارها بر پروتئین برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی بر میزان پروتئین ریشه معنی‌دار نگردید.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید سریم و اکسید روی تاثیر معنی‌داری بر محتوای پروتئین ریشه نسبت به شاهد نداشته‌اند. اما در برگ، افزایش محتوای پروتئین به ترتیب به میزان ۲۶/۲ و ۱۲/۴ درصد نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۱). پاسخ گیاهان به

**Table 1. Analysis of variance (mean squares) of the effect of Zinc oxide (ZnO) and Cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) nano elicitors on the content of antioxidant enzymes in Japanese barberry leaf**

S.O.V	df	Leaf Protein	Leaf Guaiacol peroxidase (GP)	Leaf Superoxide dismutase (SOD)	Leaf Catalase (CAT)	Leaf Ascorbate peroxidase (APX)	Leaf Peroxidase (POX)	Leaf Glutathione reductase (GR)
Elicitor	2	4.960**	0.102**	6.074**	4.003**	29.02**	0.000**	0.017**
Experimental error	9	0.853	0.002	0.113	0.004	0.685	0.000	0.000
C.V.(%)		9.66	11.28	7.54	7.28	17.29	14.18	3.06

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

**Table 2. Analysis of variance (mean squares) of the effect of Zinc oxide (ZnO) and Cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) nano elicitors on the content of antioxidant enzymes in Japanese barberry Root**

S.O.V	df	Root Protein	Root Guaiacol peroxidase (GPX)	Root Superoxide dismutase (SOD)	Root Catalase (CAT)	Root Ascorbate peroxidase (APX)	Root Peroxidase (POX)	Root Glutathione reductase (GR)
Elicitor	2	0.170 <sup>ns</sup>	3.550**	45.705**	0.077**	6.846**	0.053**	0.002*
Experimental error	9	0.288	0.012	0.153	0.000	0.037	0.005	0.000
C.V.(%)		4.81	6.79	6.00	4.52	5.59	7.71	6.92

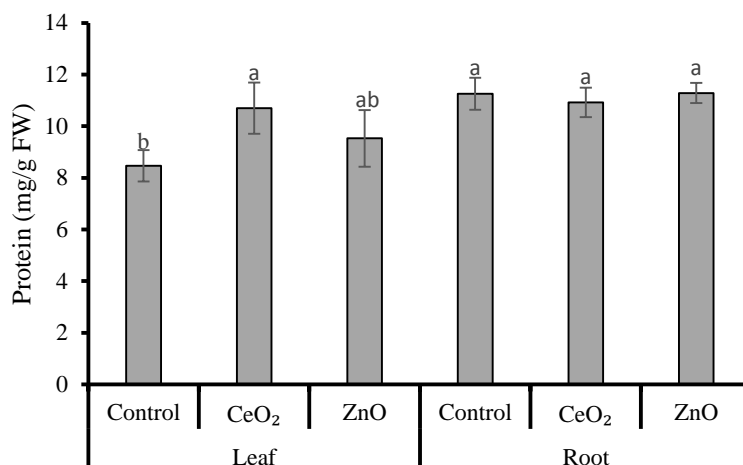
ns, \*, and \*\*: non-significant, significant at 5%, and 1% probability levels, respectively.

**Table 3. Analysis of variance (mean squares) of the effect of Zinc oxide (ZnO) and Cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) nano elicitors on chlorophyll a, total chlorophyll and carotenoid content in leaf of Japanese barberry plant**

S.O.V	df	Leaf Chl. a	Leaf Chl. Total	Leaf Car.
Elicitor	2	22.56**	276.137**	1.461**
Experimental error	9	0.134	0.340	0.008
C.V.(%)		6.41	4.72	12.54

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





**Figure 1. Effect of Zinc oxide (ZnO) and Cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) nano elicitors on protein content in leaf and root of Japanese barberry plant (Means followed by the same letter, are not significantly different at the 1% probability level)**

غلظت‌های بالاتر (۲۰۰۰-۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را به طور قابل توجهی کاهش داد (Cui *et al.*, 2014). این یافته‌ها حاکی از آن است که تولید ROS اضافی در غلظت‌های بالاتر ممکن است به موقع از بین نرفته و منجر به رشد ضعیف ریشه شود (Cui *et al.*, 2014). نانو دی‌اکسید سریم، فعالیت SOD گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی را نیز افزایش داد (Singh *et al.*, 2019). نانو اکسیدهای سریم و روی، فعالیت آنزیم کاتالاز را به ترتیب ۹۰/۵ و ۷۶/۵ درصد در برگ و ۴۸/۸ و ۵/۷ درصد در ریشه (در مقایسه با شاهد) کاهش دادند (شکل 2c). تأثیر تجمع نانوذرات بر متابولیسم و نمو گیاهان به اندازه، غلظت و شیمی آن‌ها و همچنین محیط شیمیایی مکان‌های درون سلولی که نانوذرات در آنها رسوب می‌کنند، بستگی دارد. نانو ذرات باعث افزایش سطوح H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می‌شوند که می‌تواند فعالیت‌های کاتالاز را کاهش دهد (Dietz and Herth, 2011). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز به ترتیب در اندام هوایی و ریشه در مواجهه گیاهان گشنیز با نانو دی‌اکسید سریم افزایش یافت (Morales *et al.*, 2013). در گیاه *Arabidopsis thaliana* نیز نشان داده شد که نانوذرات

مطالعات نشان داده که با افزایش غلظت روی، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در بسیاری از گونه‌های گیاهی افزایش می‌یابد. در آزمایش انجام شده بر گیاه ماش سیاه مشاهده گردید که با کاربرد نانو روی، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز افزایش می‌یابد (Pavani *et al.*, 2020). نتایج مطالعه Amirjani *et al.*, 2014 نشان داد که در گیاه دارویی پریوش، کاربرد نانو اکسید روی سبب افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاهش تنش اکسیداتیو گردید.

الیستورهای دی‌اکسید سریم و اکسید روی، به ترتیب افزایش ۲۴۵/۶ و ۲۴۱/۹ درصدی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ریشه را موجب گردیدند؛ ولی در برگ، بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مربوط به تیمار اکسید روی و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به دی‌اکسید سریم (به ترتیب افزایش ۲۵/۲ و کاهش ۲۹/۴ درصدی نسبت به شاهد) مرتبط بود (شکل 2b). قرار گرفتن گیاه برنج در معرض نانوذرات دی‌اکسید سریم در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به طور قابل توجهی محتوای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را افزایش داد (Rico *et al.*, 2013). همچنین گزارش شده است که قرار گرفتن در معرض نانو دی‌اکسید سریم در

اکسید روی باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت پراکسیداز گردید و اثبات نمود که نانوذرات اکسید روی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را تحریک می‌کنند که اولین اثری است که هنگام ورود نانوذرات به گیاهان شناسایی می‌شود (García-López et al., 2019). پژوهش Faizan et al., 2021 نیز نشان داد که فعالیت پراکسیداز با کاربرد نانوذرات روی افزایش یافته است.

در برگ، تیمار نانو اکسید روی فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز را ۲۳/۳ درصد نسبت به شاهد افزایش داده ولی دی‌اکسید سریم فعالیت آن را ۱۱/۱ درصد کاهش داد. در ریشه، فقط اکسید روی فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز را بطور معنی‌داری نسبت به شاهد (۱۲/۵ درصد) افزایش داد (شکل 2f). در گیاه *Arabidopsis thaliana* تیمار نانوذره دی‌اکسید سریم فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز را افزایش داد (Ma et al., 2016). در مطالعه Jahani et al., 2019، فعالیت GR در گیاه همیشه بهار پس از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات  $\text{CeO}_2$  کاهش یافت. احتمالاً کاهش فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز تحت غلظت‌های بالای نانوذرات  $\text{CeO}_2$  منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سیستم دفاعی شده و گیاه را مستعد اکسیداسیون ناشی از سمیت نانوذرات می‌کند. نشان داده شده است که فعالیت GR در برنج تیمار شده با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نانوذرات  $\text{CeO}_2$ ، کاهش یافته است (Rico et al., 2013). فعالیت GR در گیاه *Ochradenus arabicus*، به صورت وابسته به غلظت با ۵۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسیدروی افزایش یافت (Al-Qurainy et al., 2021). افزایش سطح آنزیم‌ها در غلظت بالای اکسید روی ممکن است با تنش اکسیداتیو مقابله کند (Chanu and Upadhyaya, 2019). کاربرد نانوذره ZnO در گیاه سویا باعث افزایش گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و بهبود رشد گیاهان شد (Ahmad et al., 2020).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که الیستور ZnO باعث افزایش ۴۴/۱ درصدی میزان کلروفیل a نسبت به شاهد گردید، اما الیستور  $\text{CeO}_2$  تغییر معنی‌داری در

$\text{CeO}_2$  (به ویژه در ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) فعالیت کاتالاز را افزایش داد (Ma et al., 2016).

در برگ گیاه زرشک ژاپنی، اکسید روی باعث افزایش ۱۱۱/۸ درصدی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به شاهد گردید؛ ولی، دی‌اکسید سریم نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم ایجاد نکرد. در ریشه، نانو اکسیدهای سریم و روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در مقایسه با شاهد به ترتیب ۵۳/۲ و ۳۳/۶ درصد کاهش دادند (شکل 2d). آسکوربات پراکسیداز، برای کاهش  $\text{H}_2\text{O}_2$  نقش دارد که در گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با نانوذرات روی فعال‌تر شد؛ همچنین، نانو اکسید روی تنها در غلظت‌های بالا (۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برای گیاهان گوجه‌فرنگی سمی بود (Wang et al., 2018). نتایج یک تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه *Ochradenus arabicus* به صورت وابسته به غلظت، با تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی افزایش یافت (Al-Qurainy et al., 2021). افزایش سطح آنزیم‌ها در غلظت بالای نانوذرات روی ممکن است با تنش اکسیداتیو مقابله کند (Chanu et al., 2019). کاربرد نانوذرات اکسید روی در گیاه سویا نیز باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و بهبود رشد گیاهان شد (Ahmad et al., 2020). گزارش گردیده که دی‌اکسید سریم موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاه بادرشبو گردید (Mohammadi et al., 2021). نتایج مطالعات انجام شده در گشنیز، بیانگر افزایش آنزیم APX در اثر کاربرد  $\text{CeO}_2$  در غلظت‌های مختلف می‌باشد (Morales et al., 2013).

دی‌اکسید سریم و اکسید روی، فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ را نسبت به شاهد به ترتیب ۱۲۸/۶ و ۱۵۷/۱ درصد افزایش دادند. در ریشه، فقط دی‌اکسید روی فعالیت آنزیم پراکسیداز را نسبت به شاهد بطور معنی‌داری (۲۵/۷ درصد) افزایش داد (شکل 2e). برای تعیین اثرات فیتوتوکسیک احتمالی نانوذرات اکسید روی در مطالعه‌ای که بر روی گیاه فلفل دلمه‌ای چینی انجام شد، نشان داد که تیمار نانوذرات

افزایش داد. تیمار با  $\text{CeO}_2$  تغییر معنی داری در میزان کاروتنوئید برگ به دنبال نداشت (شکل 3b).

کلروفیل a برگ ایجاد نکرد. نانو اکسید روی میزان کلروفیل کل را به میزان ۹۳/۴ درصد در برگ نسبت به شاهد افزایش داد (شکل 3a). بیشترین میزان کاروتنوئید در برگ، به الیسیتور ZnO مرتبط بود که نسبت به شاهد ۶۷/۵ درصد

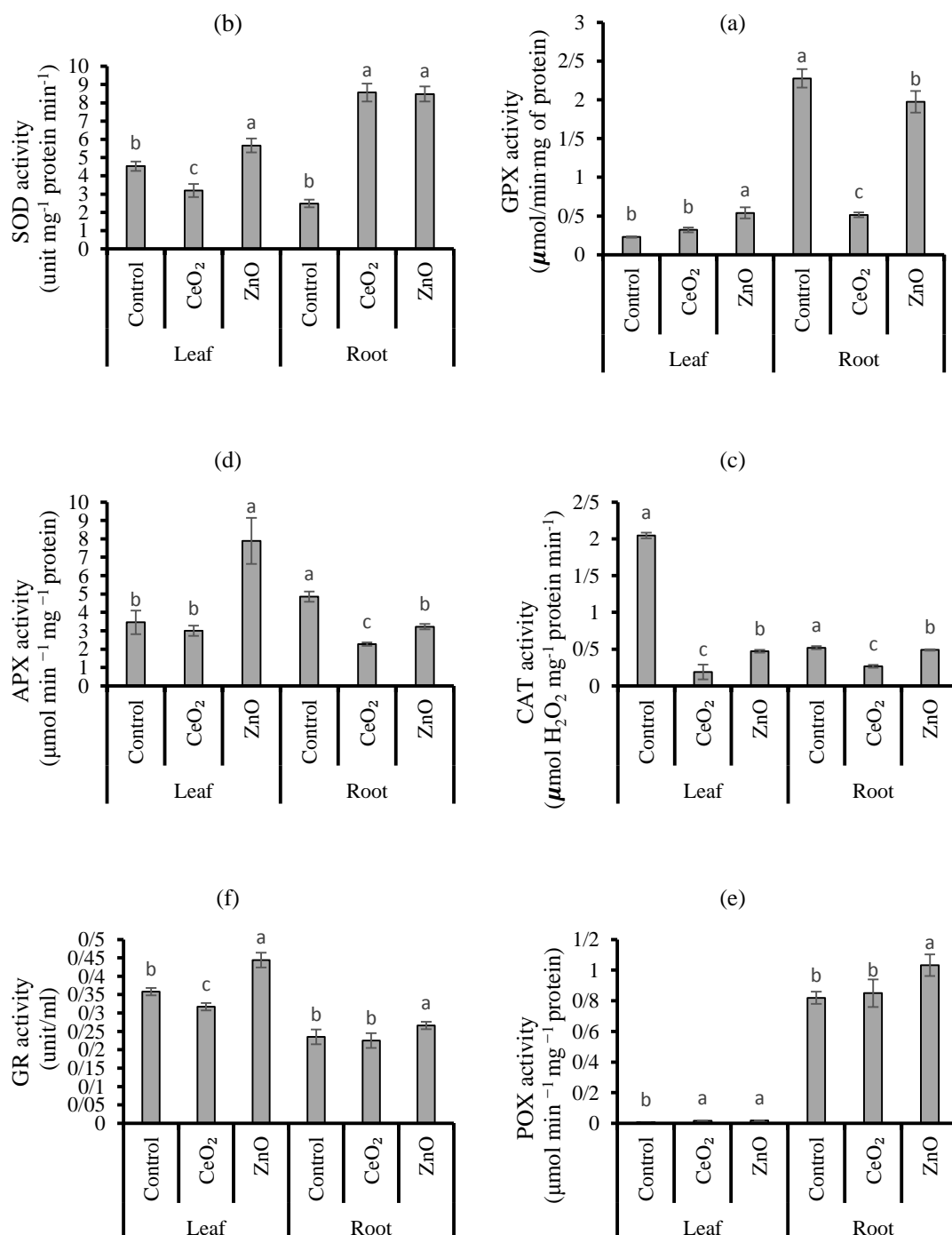
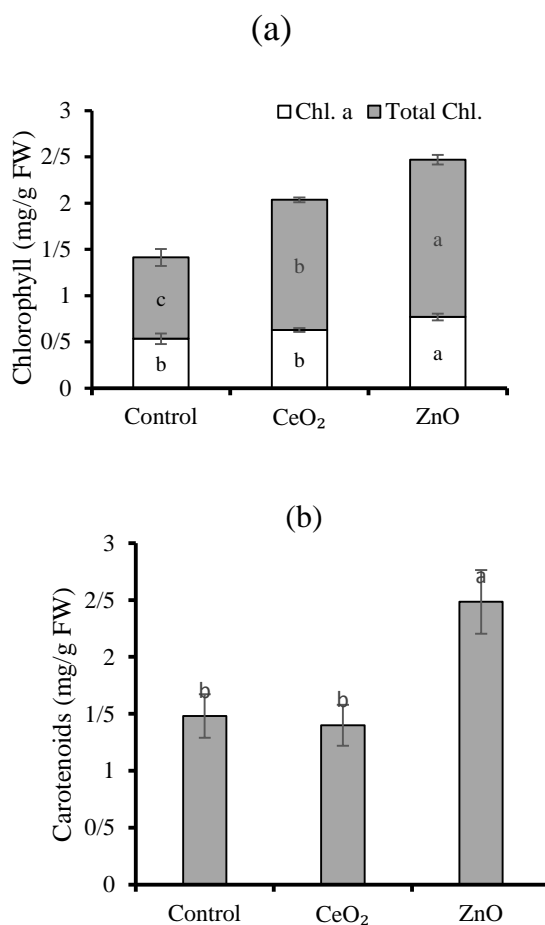


Figure 2. Effect of Zinc oxide (ZnO) and Cerium dioxide ( $\text{CeO}_2$ ) nano elicitors on the activity of antioxidant enzymes: (a) guaiacol peroxidase, (b) superoxide dismutase, (c) catalase, (d) ascorbate peroxidase, (e) peroxidase and (f) glutathione reductase in leaf and root of Japanese barberry plant (Means followed by the same letter, are not significantly different at the 1% probability level)



**Figure 3. Effect of Zinc oxide (ZnO) and Cerium dioxide (CeO<sub>2</sub>) nano elicitors on (a) chlorophyll a and total chlorophyll and (b) carotenoid content in leaf of Japanese barberry plant (Means followed by the same letter, are not significantly different at the 1% probability level)**

گوآر، ارزن، نخودسبز و پنبه افزایش داده است (Venkatachalam *et al.*, 2017). تأثیر مثبت عنصر روی به فرم معمولی و نانو بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش و بدون تنش در گیاهان مختلف ارائه شده است (Babaei *et al.*, 2017; Yadghari *et al.*, 2014)

### نتیجه‌گیری

الیستور نانوذرات اکسید روی بیشترین تأثیر را در افزایش میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز در ریشه و برگ موجب گردید؛ همچنین، باعث افزایش

محتوای کلروفیل، یک شاخص معمول نشان‌دهنده کارآمدی فتوسنتزی و یکی از عوامل تعیین‌کننده رشد گیاه محسوب می‌شود. عنصر روی یک ریزمغذی برای رشد گیاه و برای بیوسنتز کلروفیل مورد نیاز است؛ اما، مقدار اضافی آن ممکن است با سنتز رنگیزه‌های فتوسنتز تداخل ایجاد نموده و در نتیجه، بر فرآیندهای فتوسنتزی اثر بگذارد (Li *et al.*, 2013). اثرات مثبت کاربرد روی ممکن است به تأثیر مطلوب این عنصر بر متابولیسم و تأثیر تحریک‌کنندگی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیمی و رشد گیاه نسبت داده شود (Azam *et al.*, 2022). نانوذرات اکسید روی، سطح رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئید) را در بادام زمینی،

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به نانو ذرات دی‌اکسید سریم داشته است. یکی از اهمیت‌های اصلی گیاه زرشک ژاپنی، بالا بودن آنتی‌اکسیدان‌های آن می‌باشد؛ لذا نتایج این پژوهش نشان داد که مخصوصاً با نانو ذره اکسید روی، آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش معنی‌داری داشته است. با استفاده از این الیستور در کشت زرشک ژاپنی می‌توان میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد و از عصاره استخراج شده گیاه به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی در تولیدات دارویی بهره‌مند شد.

### سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد. بدینوسیله از حمایت‌های ارزنده‌ی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز برگ شد. الیستور دی‌اکسید سریم فقط در افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ریشه نقش داشت. الیستورهای اکسید روی و دی‌اکسید سریم هیچ تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ و ریشه نداشتند. الیستور دی‌اکسید سریم و اکسید روی باعث کاهش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ریشه شده است که دی‌اکسید سریم کاهش چشمگیری در فعالیت این آنزیم داشته است. نانو ذرات فلزی به دلیل اندازه کوچک، دارای خواص متغیری نسبت به ذرات غیر نانو هستند و اثر آنها نیز بر خصوصیات رشدی و بیوشیمیایی گیاه متفاوت است. در این تحقیق مشاهده گردید که نانو ذرات اکسید روی تأثیر بیشتری در خصوصیات مثبت رنگدانه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید و افزایش فعالیت

### References

- Aebi, H., (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. 105, pp. 121-126. Academic press.
- Ahmad, P., Alyemeni, M.N., Al-Huqail, A.A., Alqahtani, M.A., Wijaya, L., Ashraf, M., & Bajguz, A. (2020). Zinc oxide nanoparticles application alleviates arsenic (As) toxicity in soybean plants by restricting the uptake of as and modulating key biochemical attributes, antioxidant enzymes, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system. *Plants*, 9(7), 825.
- Al-Qurainy, F., Khan, S., Alansi, S., Nadeem, M., Alshameri, A., Gaafar, A. R., & Alfarraj, N.S. (2021). Impact of Phytomediated Zinc Oxide Nanoparticles on Growth and Oxidative Stress Response of In Vitro Raised Shoots of *Ochradenus arabicus*. *BioMed Research International*.
- Amirjani, M.R., Askari, M., & Askari, F. (2014). Effect of nano zinc oxide on alkaloids, enzymatic and antienzymatic antioxidant contents and some physiological parameters of *Catharantus roseus*. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 5(2), 173-83.
- Asati, A., Santra, S., Kaitanis, C., & Perez, J.M. (2010). Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles. *ACS nano*, 4(9), 5321-5331.
- Azam, M., Bhatti, H.N., Khan, A., Zafar, L., & Iqbal, M. (2022). Zinc oxide nano-fertilizer application (foliar and soil) effect on the growth, photosynthetic pigments and antioxidant system of maize cultivar. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102343.
- Babaei, K., Seyed Sharifi, R., Pirzad, A., & Khalilzadeh, R. (2017). Effects of bio fertilizer and nano Zn-Fe oxide on physiological traits, antioxidant enzymes activity and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 381-389.
- 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(1-2), 248-254.

- Chanu, T.T., & Upadhyaya, H. (2019). Zinc oxide nanoparticle-induced responses on plants: a physiological perspective. In *Nanomaterials in plants, algae and microorganisms* (pp. 43-64). Academic Press.
- Cui, W., Fang, P., Zhu, K., Mao, Y., Gao, C., Xie, Y., & Shen, W. (2014). Hydrogen-rich water confers plant tolerance to mercury toxicity in alfalfa seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 105, 103-111.
- Dietz, K.J., & Herth, S. (2011). Plant nanotoxicology. *Trends in plant science*, 16(11), 582-589.
- Faizan, M., Bhat, J.A., Hessini, K., Yu, F., & Ahmad, P. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviates the adverse effects of cadmium stress on *Oryza sativa* via modulation of the photosynthesis and antioxidant defense system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112401.
- Farahi, S.M.M., Yazdi, M.E.T., Einafshar, E., Akhondi, M., Ebadi, M., Azimipour, S., & Iranbakhsh, A. (2023). The effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on physiological, biochemical, and antioxidant properties of Vitex plant (*Vitex agnus-Castus* L). *Heliyon*, 9(11).
- Fernández-Poyatos, M.D.P., Ruiz-Medina, A., Zengin, G., & Llorent-Martínez, E.J. (2019). Phenolic characterization, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Berberis thunbergii* DC. leaves: A valuable source of phenolic acids. *Molecules*, 24(22), 4171.
- García-López, J.I., Niño-Medina, G., Olivares-Sáenz, E., Lira-Saldivar, R.H., Barriga-Castro, E.D., Vázquez-Alvarado, R., & Zavala-García, F. (2019). Foliar application of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate boosts the content of bioactive compounds in habanero peppers. *Plants*, 8(8), 254.
- Ghanbari, M., Mokhtassi-Bidgoli, A., Mansour Ghanaei-Pashaki, K., & Talebi-Siah Saran, P. (2021). Evaluation of Morpho-Physiological and Biochemical Characteristics of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Response to Different Irrigation Regimes and Spraying of Zn and Mn Nano-Fertilizers. *Plant Productions*, 44(4), 475-488. [In Persian]
- Gitelson, A.A., & Merzlyak, M.N. (1997). Remote estimation of chlorophyll content in higher plant leaves. *International Journal of Remote Sensing*, 18(12): 2691-2697.
- Gulen, H., & Eris, A. (2004). Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*, 166(3): 739-744.
- Hossain, Z., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26644-26653.
- Jahani, S., Saadatmand, S., Mahmoodzadeh, H. & Khavari-Nejad, R.A. (2019). Effect of foliar application of cerium oxide nanoparticles on growth, photosynthetic pigments, electrolyte leakage, compatible osmolytes and antioxidant enzymes activities of *Calendula officinalis* L. *Biologia*, 74(9): 1063-1075.
- Khan, I., Najeebullah, S., Ali, M. & Shinwari, Z.K., (2016). Phytopharmacological and ethnomedicinal uses of the Genus *Berberis* (Berberidaceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(9): 2047-2057.
- Kumari, N., Varghese, B.A., Khan, M.A., Jangra, S. & Kumar, A. (2020). Abiotic elicitation: a tool for producing bioactive compounds. *Plant Archives*, 20: 2683-2689.
- Li, X., Yang, Y., Jia, L., Chen, H., & Wei, X. (2013). Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 89, 150-157.
- Ma, C., Liu, H., Guo, H., Musante, C., Coskun, S.H., Nelson, B.C., & Dhankher, O.P. (2016). Defense mechanisms and nutrient displacement in *Arabidopsis thaliana* upon exposure to CeO<sub>2</sub> and In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 3(6), 1369-1379.
- Malan, C., Greyling, M.M. & Gressel, J. (1990). Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Science*, 69(2): 157-166.
- Mazaheri-Tirani, M., & Dayani, S. (2020). In vitro effect of zinc oxide nanoparticles on *Nicotiana tabacum* callus compared to ZnO micro particles and zinc sulfate (ZnSO<sub>4</sub>). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(2), 279-289.

- Mishra, S. R., & Ahmaruzzaman, M. (2021). Cerium oxide and its nanocomposites: Structure, synthesis, and wastewater treatment applications. *Materials Today Communications*, 28, 102562.
- Misra, H.P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10): 3170-3175.
- Mohammadi, M.H.Z., Panahirad, S., Navai, A., Bahrami, M.K., Kulak, M., & Gohari, G. (2021). Cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub>-NPs) improve growth parameters and antioxidant defense system in Moldavian Balm (*Dracocephalum moldavica* L.) under salinity stress. *Plant Stress*, 1, 100006.
- Morales, M.I., Rico, C.M., Hernandez-Viezcas, J.A., Nunez, J.E., Barrios, A.C., Tafoya, A., Flores-Marges, J.P., Peralta-Videa, J.R., & Gardea-Torresdey, J.L. (2013). Toxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in cilantro (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in organic soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(26), 6224-6230.
- Mukherjee, A., Pokhrel, S., Bandyopadhyay, S., Mädler, L., Peralta-Videa, J.R., & Gardea-Torresdey, J.L. (2014). A soil mediated phyto-toxicological study of iron doped zinc oxide nanoparticles (Fe@ ZnO) in green peas (*Pisum sativum* L.). *Chemical Engineering Journal*, 258, 394-401.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5): 867-880.
- Och, A., Olech, M., Bąk, K., Kanak, S., Cwener, A., Cieśla, M., & Nowak, R. (2023). Evaluation of the antioxidant and anti-lipoxygenase activity of *Berberis vulgaris* L. leaves, fruits, and stem and their LC MS/MS polyphenolic profile. *Antioxidants*, 12(7), 1467.
- Pavani, K. V., Beulah, M., & Sai Poojitha, G. U. (2020). The effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) on *Vigna mungo* L. seedling growth and antioxidant activity. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, 10(2), 117-122.
- Prasad, A.R., Williams, L., Garvasis, J., Shamsheera, K.O., Basheer, S. M., Kuruvilla, M., & Joseph, A. (2021). Applications of phytogenic ZnO nanoparticles: A review on recent advancements. *Journal of Molecular Liquids*, 331, 115805.
- Rahimi-Madiseh, M., Lorigoini, Z., Zamani-Gharaghoshi, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). *Berberis vulgaris*: specifications and traditional uses. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(5), 569. [In Persian]
- Rico, C. M., Morales, M. I., McCreary, R., Castillo-Michel, H., Barrios, A. C., Hong, J., & Gardea-Torresdey, J.L. (2013). Cerium oxide nanoparticles modify the antioxidative stress enzyme activities and macromolecule composition in rice seedlings. *Environmental science & technology*, 47(24), 14110-14118.
- Rivero-Montejo, S.D.J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021). Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture*, 11(2), 134.
- Santás-Miguel, V., Arias-Estévez, M., Rodríguez-Seijo, A., & Arenas-Lago, D. (2023). Use of metal nanoparticles in agriculture. A review on the effects on plant germination. *Environmental Pollution*, 122222.
- Singh, A., Hussain, I., Singh, N.B., & Singh, H. (2019). Uptake, translocation and impact of green synthesized nanoceria on growth and antioxidant enzymes activity of *Solanum lycopersicum* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182: 109410.
- Upadhyaya, D., Sankhla, T.D., Davis, N., Sankhla, B.N., & Smith, J. (1985). Effect of Paclobutrazol on the Activities of Some Enzymes of Activated Oxygen Metabolism and Lipid Peroxidation in Senescing Soybean Leaves. *Plant Physiology*, 121: 453-461.
- Venkatachalam, P., Jayaraj, M., Manikandan, R., Geetha, N., Rene, E.R., Sharma, N.C., & Sahi, S.V. (2017). Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) alleviate heavy metal-induced toxicity in *Leucaena leucocephala* seedlings: a physiochemical analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110: 59-69.
- Vojodimehrabani, L., Valizadeh Kamran, R., & Hassanpour Aghdam, M.B. (2019). Evaluation of Some Phytochemical Characteristics of *Berberis integerrima* in Response to Nano-Zinc Foliar Application and Post-Harvest Drying Temperature. *Plant Productions*, 42(3), 345-358. [In Persian]

- Wang, X.P., Li, Q.Q., Pei, Z.M., & Wang, S.C. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits, and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia plantarum*, 62, 801-808.
- Wenchao, D., Rong, J., Ying, Y., Jianguo, Z., & Hongyan, G. (2015). Physiological and Biochemical Changes Imposed by CeO<sub>2</sub> Nanoparticles on Wheat: A Life Cycle Field Study.
- Wu, M., Wang, P.Y., Sun, L.G., Zhang, J.J., Yu, J., Wang, Y.W., & Chen, G.X. (2014). Alleviation of cadmium toxicity by cerium in rice seedlings is related to improved photosynthesis, elevated antioxidant enzymes and decreased oxidative stress. *Plant growth regulation*, 74, 251-260.
- Yadghari, R., Nyakan, M., & Mosavat, A. (2014). The effect of nano and non-nano forms chelate zinc on growth, chlorophyll content and soluble sugar pea plants (*Cicer arietinum* L.) in different levels of salinity. *Iranian Journal of Plant Ecophysiology Research*, 9, 137-150. [In Persian]