



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 15, Issue, No. 1, Spring 2023
Document Type: Research Paper
Received: 15/12/2023 Accepted: 29/01/2024

Improvement of production of alkaloid and flavonoid compounds in *Narcissus tazetta* L. callus under iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4 -NPs) and *trans*-cinnamic acid and L-phenylalanine treatments

Ladan Bayat¹, Azra saboora^{1*} 

¹Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

Abstract

The medicinal properties of the *Narcissus* genus are due to the presence of alkaloids known as Amaryllidaceae Alkaloids (AA). The presence of nanoparticles causes oxidative stress and stimulates production of secondary metabolites. Using specific precursors in AA biosynthetic pathways can be effective on cumulative production of these compounds. In this study, the effect of iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4 -NPs), *trans*-cinnamic acid (*t*CA), and L-phenylalanine (L-Phe) as precursors has been investigated on changes in some biochemical parameters of *Narcissus tazetta* L. callus, especially alkaloid content. Treatment of calli generated from bulb explants in Morashig-Skoog (MS) media containing 2,4-D and BAP and Fe_3O_4 -NPs, increased alkaloids, flavonoids, and phenolic compounds. Also, the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and POD), and activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) increased under Fe_3O_4 -NPs treatments alone and in combination with *t*CA or L-Phe precursors. The evaluation of the studied parameter changes showed that both *t*CA and L-Phe treatment can change the plant's metabolism to improve the production of secondary metabolites. This was especially evident with the simultaneous application of Fe_3O_4 -NPs and these precursors. Application of precursors in the culture medium increased H_2O_2 content under *t*CA treatment and decreased it under L-Phe treatment. Increased activity of the antioxidant enzymes caused by nanoparticle treatments along with the nutritional effect of *t*CA and L-Phe precursors, progressed signaling pathway of antioxidant responses by affecting the activity of biosynthetic enzymes and increases production of some secondary metabolites including alkaloids and phenolic compounds. Considering various properties of Amaryllidaceae alkaloids, optimizing, and increasing the production of these alkaloids is important from a commercial and medical point of view.

* Corresponding Author: saboora@alzahra.ac.ir



Introduction

The incomparable feature of narcissus plants, especially in bulbs, is the production of Amaryllidaceae Alkaloids with worthwhile medicinal properties. These alkaloids have a wide range of biological activities, such as anti-Alzheimer properties, antiviral and antitumor activities and antioxidant and anticancer properties. The content of these alkaloids in different *Narcissus* species is small, and the chemical synthesis of these compounds is challenging due to their complex structure. Therefore, the extraction and industrial production of these alkaloids on a large scale is not economical. Meanwhile, the use of alternative and low-cost methods to increase these valuable medicinal compounds has been considered. Among these methods, tissue culture and use of elicitors can help to this goal. Iron nanoparticles can be mentioned among these stimulants. Fe₃O₄-NPs are one of the most important forms of iron oxide nanoparticles that are widely used in biomedicine and agriculture researchs as elicitor. These nanoparticles cause various biochemical and physiological changes in plants. Also, some compounds such as phenylalanine and tyrosine, are specific precursors in the biosynthetic pathway. The effect of exogenous phenylalanine and tyrosine was studied on the secondary metabolism of wheat (Feduraev et al., 2020). The results showed that along with the increase in phenylalanine and tyrosine, the content of phenolic compounds and the activity of PAL, TAL, and POD increased. Also, Marconi et al. (2007) were investigated the effect of exogenous *trans*-cinnamic acid on the changes of alkaloid content in *Datura* (*Brugmansia candida* Pres.). Cinnamic acid harmed plant growth and caused an increase in plant alkaloids, especially scopolamine.

Aim of this study was investigation on (i) the effects of Fe₃O₄-NPs, *t*CA and Lphe on the changes in phenolic, flavonoid and alkaloid contents and (ii) investigation of the effect of oxidative stress due to nanoparticle treatment on the production of secondary metabolites.

Materials and Methods

The prepared bulbs of *Narcissus tazetta* L. var. Shahla was disinfected and transferred to the MS culture media containing 1 mg/L of 2,4-D and BAP to induce callus. Iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄ -NPs) were purchased from Mashhad Nanosadra company and were homogenized for 30 minutes with ultrasonic waves (60 W power) to prepare a mother solution of 500 mg/L. Also, two precursors of *trans*-cinnamic acid and L-phenylalanine were prepared and sterilized at a concentration of 200 mg/L. Thirty-five days old calluses were transferred to 1/2 MS liquid medium containing nanoparticles (0 and 500 mg/L) and precursors (0 and 200 mg/L) alone or together and put on a shaker with a speed of 100 rpm at 25 °C. The calli were harvested at two-time stages, 2 and 15 days after treatments, and stored in a freezer at -80°C for biochemical tests. Total phenolic compounds, flavonoids, alkaloid, and hydrogen peroxide, MDA content, enzyme activities of SOD, POD, CAT, TAL, and PAL were assayed.

Results and Discussion

The finding of this study revealed that Fe₃O₄-NPs, *t*CA, and L-Phe improved productions of the secondary metabolites in *Narcissus tazetta* L. callus. The results showed that Fe₃O₄-NPs and L-Phe decreased H₂O₂ content, but *t*CA increased hydrogen peroxide content in calli. Treatments by Fe₃O₄-NPs alone and combined with *t*CA or L-Phe increased the activity of antioxidant enzymes including CAT, POD, and SOD. The content of total phenolic, flavonoid, and alkaloid compounds in *N. tazetta* calli

increased under the treatments of Fe₃O₄-NPs and both precursors. The activity of PAL and TAL enzymes increased significantly under all the treatments. Iron oxide nanoparticles, as a compound that provides a vital nutrient, are involved in several metabolic processes in plants (Hu et al., 2017). Phenylalanine is a precursor of many secondary metabolites such as phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, lignin, and alkaloids. *trans*-cinnamic acid, as the first chemical substance which produce in the phenylpropanoids pathway, is the precursor of many hydroxycinnamic acid derivatives and plays a key role in the formation of other complex phenolic compounds (Swanson, 2003). Thus, treatment of the calli by Fe₃O₄-NPs, *t*CA, and L-Phe can be active metabolism of the *N. tazetta* to ward production of the important phenolic and alkaloid compounds.

Conclusion

Treatment of the *N. tazetta* calli with Fe₃O₄-NPs, *t*CA, and L-Phe increased their ability to produce secondary metabolites by increasing H₂O₂ and changes in MDA levels. Fe₃O₄-NPs act through signaling pathways of ROS and induction of antioxidant enzyme activities. On the other hand, these treatments increased PAL and TAL activities and improved phenolic and alkaloid biosynthetic pathways.

Keywords: Amaryllidaceae Alkaloids, Fe₃O₄-NPs, *Narcissus tazetta* L., phenylalanine, *trans*- cinnamic acid

افزایش تولید آلکالوئیدها و ترکیبات فلاونوئیدی کالوس نرگس شهلا (*Narcissus tazetta* L.) تحت تیمار نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4 -NPs) و پیش ماده‌های ترانس سینامیک اسید و L- فنیل آلانین

لادن بیات^۱، عذرا صبور^{۱*} ID

^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

چکیده

خواص دارویی گیاه نرگس به علت وجود آلکالوئیدهای معروف به آلکالوئیدهای آماریلیداسه به ویژه در پیازهای آن است. تنش اکسیداتیو ناشی از حضور نانوذرات، تولید متابولیت‌های ثانوی را با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و فعال کردن مسیرهای علامت‌دهی تحریک می‌کند. استفاده از پیش ماده‌های خاص مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها می‌تواند در افزایش تولید این ترکیبات مؤثر باشد. در این پژوهش، اثر نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4 -NPs) و پیش ماده‌های ترانس سینامیک اسید (*tCA*) و L- فنیل آلانین (L-Phe) بر تغییر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی کالوس‌های *Narcissus tazetta* L. به ویژه محتوای آلکالوئیدها بررسی شد. نتایج نشان داد هنگامی که کالوس‌های القاء شده در محیط کشت موراشیگ-اسکوگ (MS) حاوی هورمون‌های 2,4-D و BAP با Fe_3O_4 -NPs تیمار شدند، متابولیت‌های ثانوی مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD)، آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) و تیروزین آمونیلیاز (TAL) تحت تأثیر تیمارهای Fe_3O_4 -NPs به تنهایی و در ترکیب با هر یک از دو پیش ماده‌ی ذکر شده افزایش نشان داد. ارزیابی تغییر فاکتورهای مورد بررسی نشان داد کاربرد *tCA* و L-Phe متابولیسم گیاه را در جهت بهبود تولید متابولیت‌های ثانوی تغییر دادند. برای مثال در ۱۵ روز تیمار با فنیل آلانین، فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و POD به ترتیب ۵۷/۲۱، ۷۷/۷۲ و ۷۸/۵ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. این امر به ویژه با کاربرد همزمان Fe_3O_4 -NPs و پیش ماده‌ها شاخص تر بود. با افزودن این پیش ماده‌ها به محیط کشت، محتوای H_2O_2 تحت تیمار *tCA* افزایش و تحت تیمار L-Phe کاهش یافت. افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی ناشی از تیمارهای نانوذرات همراه با اثر تغذیه‌ای پیش سازهای *tCA* و L-Phe، ضمن فعال کردن مسیر علامت‌دهی پاسخ‌های پاداکسایشی، فعالیت آنزیم‌های درگیر تولید برخی متابولیت‌های ثانوی از جمله مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها و ترکیبات فنولی را القا کرد و محتوای این متابولیت‌ها را در کالوس افزایش داد. بهینه‌سازی و افزایش تولید آلکالوئیدهای آماریلیداسه با توجه به خواص ضد آلزایمری، ضد ویروسی، ضد سرطانی و پاداکسایشی از لحاظ تجاری و پزشکی حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدهای آماریلیداسه، ترانس سینامیک اسید، فنیل آلانین، نانوذرات Fe_3O_4 ، نرگس شهلا

* نگارنده مسؤل: نشانی پست الکترونیک: saboora@alzahra.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲



مقدمه

نرگس متعلق به خانواده‌ی تک‌لپه‌ای آماریلیداسه (Amaryllidaceae)، دارای حداقل ۸۵ جنس است و ۱۶۰۰ گونه‌ی آن به‌طور طبیعی در مناطق استوایی و نیمه‌استوایی سراسر جهان شامل آفریقای جنوبی، مناطق معتدل آسیا و مدیترانه پراکنده شده‌اند (Christenhusz & Byng, 2016). یکی از گونه‌های معروف آن گونه‌ی *Narcissus tazetta* در اسپانیا، شمال آفریقا و در مناطق معتدل آسیا یافت می‌شود (Hanks, 2002). ویژگی منحصر به فرد گیاه نرگس به ویژه در اندام پیاز، تولید آلکالوئیدهای آماریلیداسه (Amaryllidacea Alkaloids, AA) با خواص دارویی بسیار ارزشمند است (Desgagné-Penix, 2020). این آلکالوئیدها دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی مانند خواص ضد آلزایمری گالانتامین (Hotchandani et al., 2019)، فعالیت‌های ضد ویروسی و ضد توموری لیکورین (Bastida et al., 2011) و خواص پاداکسایشی و ضد سرطانی همانتامین (Van Goietsenoven et Bastida et al., 2011) ; (al., 2010) هستند. محتوای این آلکالوئیدها در گونه‌های مختلف نرگس بسیار کم است، همچنین سنتز شیمیایی این ترکیبات به علت ساختار پیچیده‌ی آن‌ها دشوار است. بنابراین استخراج و تولید صنعتی این آلکالوئیدها در مقیاس بزرگ مقرون به صرفه نیست (Hotchandani et al., 2019). در این میان استفاده از روش‌های جایگزین و کم هزینه برای افزایش این ترکیبات دارویی ارزشمند همواره مورد توجه بوده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به استفاده از روش‌هایی مانند کشت بافت و همچنین استفاده از محرک‌ها (elicitors) اشاره نمود. یکی

از روش‌های کشت بافت جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی القاء کالوس و انتخاب نژادهای سلولی با قابلیت تولید بالا است. القاء کالوس یک مرحله اساسی برای ریز ازدیادی است و با توجه به ساختار ساده‌ی کالوس‌ها می‌توان از آن‌ها به عنوان یک بافت آزمایشی مناسب جهت مطالعه بهبود تولید آلکالوئیدها در گیاه استفاده کرد (Ramachandra & Ravishankar, 2002). مولکول‌هایی که یکی از ابعاد آن‌ها بین ۱۰۰-۱ نانومتر باشد به عنوان نانوذرات نامیده می‌شوند. بیشتر از یک دهه است که فناوری‌های نانو به لطف ویژگی‌های قابل توجهی که دارند توسط صنایع و محققان به صورت جهانی مورد استفاده قرار گرفته است (Vance et al., 2015). نانوذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالا به راحتی جذب گیاهان می‌شوند (Elemike et al., 2019; Kumari et al., 2023). جذب نانوذرات توسط گیاهان از راه‌های مختلفی از جمله از طریق کوتیکول برگ، روزنه‌های برگ و ریشه انجام می‌شود (Wang et al., 2023). در سطح لایه کوتیکول دو نوع کانال مختلف شامل کانال‌های آب‌دوست و کانال‌های چربی‌دوست وجود دارد (Avellan et al., 2019). قطر این کانال‌ها از ۰/۶ تا ۴/۸ نانومتر متغیر است. کانال‌های آب‌دوست به نانوذرات آب‌دوست با قطر کمتر از ۴/۸ نانومتر اجازه انتشار می‌دهند. کانال‌های چربی‌دوست در سطح کوتیکول به نانوذرات چربی‌دوست اجازه عبور می‌دهند تا از طریق انتشار و نفوذ در برگ‌ها جذب شوند (Wang et al., 2023). تماس بین نانوذرات و ریشه گیاه با جذب سطحی ریشه صورت می‌گیرد. از آنجایی که تارهای کشنده می‌توانند مواد شیمیایی مانند

نشان دادند (Serpoush et al., 2022). همچنین در زیست فناوری گیاهی استفاده از نانوذرات به عنوان محرک‌های غیر زیستی، پتانسیل زیادی برای القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی از جمله آلکالوئیدها دارد (Rivero-Montejo et al., 2021). بنابراین در این پژوهش از نانوذرات اکسید آهن استفاده شد. نانوذرات Fe₃O₄ یا مگنتیت در حال حاضر یکی از اشکال مهم و قابل قبول اکسید آهن است که یک اکسید آهن سخت، سیاه، فری مغناطیس و براق می‌باشد (DeArmitt, 2017) و بیشترین کاربرد را در زیست پزشکی در میان سایر اشکال اکسیدهای آهن دارد (Hein et al., 2013). برهمکنش نانوذرات با گیاهان به برخی از ویژگی‌های آن‌ها مانند غلظت، اندازه، خواص فیزیکی و نوع گونه‌ی گیاهی بستگی دارد. این نانوذرات سبب تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و ریخت شناسی مختلفی در گیاهان می‌شوند (Alkhatib et al., 2019). در پژوهش‌های Moharrami و همکاران (۲۰۱۷) غلظت‌های مختلف نانواکسید آهن (۰ تا ۳۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر گیاه بذرا بلنج تأثیر داده شد. بیشترین مقدار تولید آلکالوئیدهای هیوسامین و اسکوپولامین تحت تیمار غلظت‌های ۹۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات آهن پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت (حدود پنج برابر گیاه شاهد) بدست آمد.

یکی دیگر از راه‌های افزایش متابولیت‌های ثانوی در گیاهان، افزودن پیش ماده‌های خاص مسیر بیوسنتزی این ترکیبات است (Hussain et al., 2012). اگر افزودن مواد مغذی و هورمون‌ها در محیط کشت سبب افزایش تولید متابولیت‌های

موکوس یا اسیدهای آلی را آزاد کنند، سطح ریشه دارای بارهای منفی است، بنابراین نانوذرات با بار مثبت بیشتر در ریشه تجمع می‌یابند و به راحتی در سطح ریشه جذب می‌شوند (Lv et al., 2019). تشکیل ریشه‌های جانبی می‌تواند یک رابط جذب جدید برای نانوذرات ایجاد و امکان ورود آن‌ها را به ریشه اصلی فراهم کنند (Wang et al., 2023). هنگامی که نانوذرات وارد بافت گیاهی می‌شوند، می‌توانند از طریق مسیرهای متعددی مانند کانال‌های یونی، اندوسیتوز، اتصال به پروتئین‌های غشای سلولی یا از طریق آسیب فیزیکی وارد سلول‌ها شوند (Lv et al., 2019). از آنجایی که مواد مغذی در مقیاس نانو هستند، غنی‌سازی محیط کشت گیاه با چنین موادی گزینه جالبی به نظر می‌رسد. گیاهان در این محیط‌ها نه تنها رشد می‌کنند، بلکه با انباشتگی نانومغذی کمبود مواد غذایی را نیز جبران می‌کنند (Elemike et al., 2019). در کشت بافت گیاهی برای افزایش میزان جوانه‌زنی و رشد گیاه و بهبود تولید متابولیت‌های فعال از نانوذرات استفاده می‌شود (Wang et al., 2016). نتایج پژوهش Feng و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد غلظت‌های بالای نانوذرات اکسید آهن (۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) سبب افزایش رشد گیاهان گندم شد. نانوذرات نقره، جوانه‌زنی گیاهان عدس قرار گرفته تحت تنش خشکی را افزایش دادند. نتایج پژوهش دیگری نشان داد غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات نقره بیشترین تأثیر را بر جوانه‌زنی داشتند (Hojjat, 2016). دانه‌های گندم و جو تیمار شده با نانوذرات اکسید آهن (Fe₃O₄) نرخ جوانه‌زنی بالاتری را نسبت به دانه‌های تیمار نشده (شاهد)

سینامیک اسید بر رشد گیاه اثر منفی داشت، اما سبب افزایش آلکالوئیدهای آن به ویژه اسکوپولامین شد. سینامیک اسید یکی از فنیل پروپانویدهای اصلی با فعالیت پاداکسایشی است که توسط گیاهان در پاسخ به تنش تولید می‌شود. کاربرد سینامیک اسید برونزا در کشت ذرت در شرایط شوری، آسیب-های اکسیداتیو را از طریق القای فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده مانند سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز کاهش داد. همچنین محتوای مالون دی‌آلدئید نیز بطور معنی‌داری کاهش یافت (Singh et al., 2013). در این پژوهش برای افزایش تولید آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی آماریلیداسه در گیاه نرگس، کالوس‌های حاصل از پیاز گیاه *N. tazetta* به عنوان مدلی از بافت‌های تولید کننده AA در کشت مایع تحت تیمارهای Fe_3O_4 -NPs و پیش‌ماده‌های ترانس سینامیک اسید (tCA) و L-فنیل آلانین (L-Phe) قرار گرفت و در دو بازه زمانی تغییر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی کالوس‌ها به ویژه محتوای آلکالوئیدها، ترکیبات فلاونوئیدی و فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی آن به منظور فهم سازوکار مؤثر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

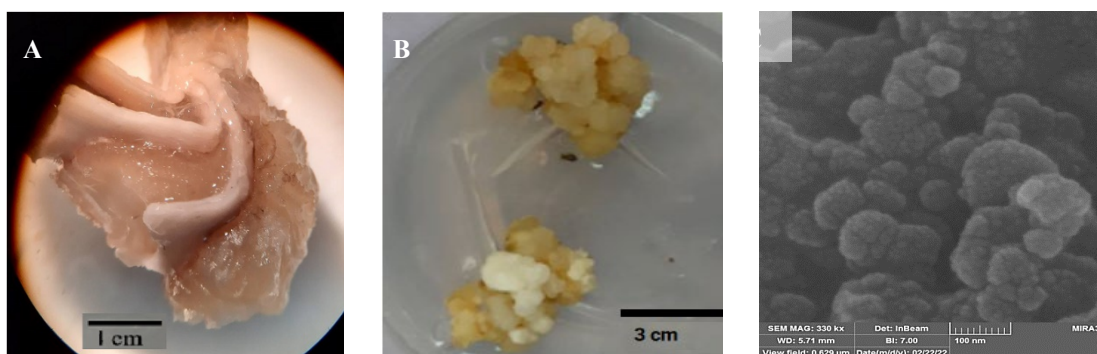
کشت بافت ریزنمونه پیاز و تیماردهی

در این پژوهش از پیازهای گیاه نرگس گونه‌ی *N. tazetta* L. واریته شهلا که از مزارع بهبهان تهیه شده بود، استفاده شد. به منظور ضد عفونی پیازها، ابتدا پیازهای یک اندازه (با قطر متوسط ۳ تا ۴ سانتی متر) جهت کشت بافت انتخاب و فلس‌های خشک رویی جدا و فلس‌های میانی برش داده شدند. ضد عفونی پیازها به روش

ثانوی شود، افزودن پیش‌ماده‌ها نیز مسیرهای بیوستتری را فعال می‌کند. از جمله این پیش‌ماده‌های مهم می‌توان به اسیدهای آمینه مانند فنیل آلانین و تیروزین اشاره کرد. پژوهش‌های Karyagina و همکاران (۲۰۰۷) روی بیوستتر آلکالوئیدهای پروتوبربرین در کشت سلول گیاه برگ سداب (*Thalictrum minus* L.) نشان داد افزودن فنیل آلانین ۷ میلی‌مولار به محیط کشت سلول طی ۷ یا ۸ روز منجر به دو برابر شدن ترشح بربرین شد. همچنین محتوای ترکیبات فنولی در سلول‌ها و محیط کشت افزایش پیدا کرد. کاربرد فنیل آلانین خارجی فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و تیروزین آمونیلایز (TAL) را به ترتیب ۲۰ و ۳۵ درصد افزایش داد. در بررسی Feduraev و همکاران (۲۰۲۰)، اثر کاربرد خارجی فنیل آلانین و تیروزین بر متابولیسم ثانویه گندم (*Triticum aestivum* L.) بررسی شد. نتایج نشان داد همزمان با افزایش غلظت فنیل آلانین و تیروزین، محتوای ترکیبات فنولی و فعالیت آنزیم‌های PAL، TAL و پراکسیداز (POD) افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان دادند. پژوهش Teixeira و همکاران (۲۰۱۷) روی تغییر فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی پس از اسپری محلول فنیل آلانین روی برگ‌ها و دانه‌های سویا متمرکز شده است. نتایج آن‌ها نشان دادند، فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافت، اما فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) و پراکسیداسیون لیپیدها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. اثر تیمار برونزای ترانس سینامیک اسید بر محتوای آلکالوئیدی گیاه داتوره (*Brugmansia candida* Pres.) توسط Marconi و همکاران (۲۰۰۷) بررسی شد. هرچند

۱C) و جهت تهیه محلول مادر ۵۰۰ میلی گرم در لیتر یکنواخت به مدت ۳۰ دقیقه با امواج فراصوت (قدرت ۶۰ وات) همگن شدند. همچنین دو پیش ماده‌ی ترانس سینامیک اسید و L-فنیل آلانین (Sigma-Aldrich, UK) در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر (۱/۳۵ میلی مولار tCA، ۱/۲۱ میلی مولار L-Phe) تهیه و سترون شدند. کالوس‌های هفت روزه به محیط مایع MS $\frac{1}{2}$ حاوی نانوذرات و پیش ماده‌ها به تنهایی یا به صورت توأم منتقل و روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند. تیمار با Fe₃O₄-NPs در غلظت‌های ۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و پیش ماده‌های tCA و L-Phe در غلظت‌های نهایی ۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر انجام شد. کالوس‌ها در دو مرحله زمانی ۲ و ۱۵ روز بعد از شروع تیمار برداشت و برای انجام سنجش‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

Alviridi-Pourganjelo و همکاران (2019) انجام شد. مراحل ضد عفونی شامل غوطه‌ور کردن قطعات فلس‌های پیاز نرگس در آب گرم ۵۴ درجه سانتی گراد (۲ ساعت)، قارچ کش بنومیل ۰/۵ درصد (۳۰ دقیقه)، هیپو کلریت سدیم ۲۰ درصد (۱۵ دقیقه)، اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه) و کلرید جیوه ۰/۱۵ درصد (۷ دقیقه) بود. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت‌های MS حاوی غلظت‌های یک میلی-گرم در لیتر از هریک از هورمون‌های 2,4-D و BAP (به ترتیب ۴/۵ و ۴/۴ میکرومولار) جهت القای کالوس منتقل و تحت دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی / ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۳ ± ۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (شکل ۱A). پس از ۳۵ روز، کالوس‌های هم‌اندازه برای تیمار با نانوذرات و پیش ماده‌ها در محیط کشت مایع انتخاب شدند (شکل ۱B). نانوذرات اکسید آهن (Fe₃O₄) با خلوص ۹۸٪، قطر ذرات ۳۰-۲۰ نانومتر، چگالی ۴/۸-۵/۱ گرم بر سانتی متر مکعب و کروی شکل از شرکت نانو صدرا ی مشهد خریداری شد (شکل



شکل ۱- تولید کالوس از جدا کشت‌های پیاز نرگس شهلا در محیط کشت موراشیگ اسکوگ حاوی یک میلی گرم در لیتر 2,4-D و BAP ۲۱ روز (A) و ۳۵ روز پس از کشت (B)، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FeSEM) از نانوذرات اکسید آهن (C).
 Figure 1- Callus induction from *N. tazetta* bulb explant on MS media containing 1 mg/L 2,4-D and BAP after 21 days (A) and 35 days (B), scanning electron microscope (FeSEM) image of iron oxide nanoparticles (C).

سنجش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل

برای سنجش‌های بیوشیمیایی، ریزنمونه‌ها در روز دوم و پانزدهم واکشت در محیط مایع حاوی پیش ماده‌ها و نانوذرات برداشت شدند. برای سنجش ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، ۰/۱ گرم کالوس خشک و پودر شد و با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفوژ شد و مایع رویی برای سنجش‌های بعدی استفاده شد. محتوای ترکیبات فنولی کل با معرف فولین-سیکالتو (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شد (Ozdemir et al., 2009). به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره، ۰/۲ میلی‌لیتر معرف (۰/۲ مولار) و ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ($7 \text{ Na}_2\text{CO}_3$ درصد) اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده و به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شد. سپس جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و محتوای ترکیبات فنولی کل بر حسب معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم وزن خشک کالوس محاسبه شد. محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل با کلرید آلومینیوم سنجیده شد (Zhishen et al., 1999). به ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره، ۴/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۰٪، ۰/۲ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪، ۰/۱ میلی‌لیتر اسید استیک آبی ۳۳٪ اضافه و به خوبی مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه، جذب در ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری و محتوای فلاونوئید کل بر حسب معادل میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک کالوس محاسبه شد.

سنجش محتوای آلکالوئید کل

برای اندازه‌گیری محتوای آلکالوئید کل از روش اصلاح شده Renaudin (۱۹۸۴) استفاده شد. یک گرم کالوس با ازت مایع پودر و با ۲۵ میلی‌لیتر متانول مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی تحت تأثیر امواج فراصوت و مدت ۲۴ ساعت با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. فرآیند سونیکاسیون به مدت ۲۰ دقیقه تکرار شد و نمونه‌ها در $10000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، مایع رویی جدا و رسوب با ۵ میلی‌لیتر متانول شسته شد. سپس عصاره‌ها تحت خلأ تبخیر شدند. عصاره خشک در ۴ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۳ درصد حل و با ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر (در ۳ مرحله) در یک قیف جداکننده چربی‌زدایی شد. سپس pH محلول با آمونیاک ۲۵ درصد روی ۹-۱۰ تنظیم و ترکیبات آلکالوئیدی با ۲۱ میلی‌لیتر کلروفرم (در ۳ مرحله) استخراج شد. برای آب‌زدایی مقدار کمی سولفات سدیم بی‌آب به عصاره کلروفرمی اضافه و پس از ۱۰ دقیقه مخلوط فوق سانتریفیوژ و مایع رویی تا خشک شدن کامل هوادهی شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق به رسوب خشک‌شده برای سنجش آلکالوئیدها اضافه و جذب نمونه‌ها در ۲۵۹ نانومتر اندازه‌گیری شد. از گالاتامین بروماید (Sigma-Aldrich, UK) به عنوان استاندارد برای سنجش محتوای آلکالوئید استفاده شد (Klosi et al., 2016).

سنجش محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای ارزیابی محتوای پراکسید هیدروژن در کالوس‌ها، ۰/۴ گرم از نمونه تازه در ۴ میلی‌لیتر تری

تعیین فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی

برای استخراج پروتئین محلول کل، ۱ گرم نمونه تر کالوس با نیتروژن مایع سائیده و در ۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار، pH ۷/۲) همگن شد. سپس نمونه‌ها در $15000 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جهت تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. مخلوط واکنش سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۲ مولار، pH ۷) حاوی ۰/۱۹۴ گرم متیونین، ۰/۰۰۲۱ گرم نیترو بلو تترازولیوم (NBT) و ۰/۰۰۲۸ گرم ریوفلاوین بود. به ۱/۵ میلی لیتر از مخلوط واکنش، ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی اضافه شد و مخلوط به مدت ۱۸ دقیقه در معرض لامپ فلورسنت قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر تعیین شد. یک واحد SOD به عنوان مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که باعث بازدارندگی پنجاه درصدی احیاء نوری NBT شود (Beauchamp & Fridovich, 1971).
سنجش فعالیت پراکسیداز (POD) بر اساس روش توصیف شده توسط Liu و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. مخلوط واکنش آنزیم حاوی ۰/۹۵ میلی لیتر بافر سترات سدیم (۰/۱ مولار، pH ۶)، ۱ میلی لیتر گایاکول ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی بود. واکنش با افزودن ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳۲ میلی مولار آغاز و تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر تا ۳ دقیقه ثبت شد. فعالیت POD با ضریب خاموشی گایاکول محاسبه و به عنوان واحد در هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (TCA) همگن و در $13000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر از مایع رویی به ۱ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۱ مولار، pH ۷) و ۲ میلی لیتر یدید پتاسیم (۱ مولار) اضافه و جذب مخلوط واکنش در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. محتوای H₂O₂ بر اساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) برآورد شد.

سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

از روش پراکسیداسیون لیپیدی برای ارزیابی آسیب اکسیداتیو و تعیین بهره‌وری سیستم پاداکسایشی استفاده می‌شود. ۰/۵ گرم از بافت تازه کالوس با ۲/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد (TCA) استخراج و در $4000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به یک میلی لیتر از مایع رویی، ۴ میلی لیتر محلول TCA ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید (TBA) اضافه و ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد، سپس بلافاصله در یک حمام یخ خنک شد. پس از سانتریفیوژ مخلوط واکنش در $10000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه، جذب مایع رویی در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. در این روش تولید مالون‌دی‌آلدئید و واکنش آن با تیوباربتوریک اسید سبب تشکیل کمپلکس رنگی MDA-TBA می‌شود که با روش رنگ‌سنجی قابل اندازه‌گیری است. محتوای مالون‌دی‌آلدئید با ضریب خاموشی ۱۵۵ بر مولار بر سانتی متر محاسبه شده جذب غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر کم می‌شود (Heath & Packer, 1986).

شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین است. غلظت سینامیک اسید با ضریب خاموشی سینامیک اسید معادل ۹۵۰۰ بر مولار بر سانتی متر به دست آمد (Kyndt et al., 2002). فعالیت تیروزین آمونیا لیا ز (TAL) مشابه روش سنجش PAL با کمی تغییر اندازه گیری شد. مخلوط سنجش حاوی ۱ میلی لیتر بافر استخراج، ۰/۵ میلی لیتر محلول تیروزین ۵/۵ میلی مولار، ۳۵۰ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر و در نهایت ۱۵۰ میکرو لیتر عصاره ی آنزیمی بود. ادامه واکنش در شرایطی شبیه روش سنجش فعالیت PAL انجام و فعالیت TAL با اندازه گیری جذب در ۳۱۰ نانومتر ارزیابی شد (Kyndt et al., 2002). یک واحد از فعالیت آنزیم TAL معادل ۱ میکرومول از کوماریک اسید تولید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. غلظت کوماریک اسید با استفاده از ضریب خاموشی کوماریک اسید معادل ۱۰۰۰ بر مولار بر سانتی متر به دست آمد (Kyndt et al., 2002).

تجزیه تحلیل آماری

تمام آزمایشها حداقل در سه تکرار مستقل و در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تیمارهای مربوط به کشت بافت حداقل در ۹ تکرار توسط ریزنمونه های جدا شده از پیازهای مختلف نمونه نرگس تهیه شده اجرا شد، سپس ریزنمونه ها در زمان معین برداشت شدند. فعالیت آنزیم های مورد بررسی و محتوای متابولیت های ثانوی موجود در ریزنمونه ها به صورت میانگین سه تکرار \pm SE (خطای استاندارد) محاسبه شد، سپس تجزیه و تحلیل واریانس دوطرفه داده ها با نرم افزار SPSS version 26 انجام و معنی دار بودن اختلاف

برای تعیین فعالیت کاتالاز (CAT) از روش Dazy و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. به ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۰/۰۵ مولار، pH ۷)، ۰/۲ میلی لیتر عصاره پروتئینی اضافه شد، سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۰/۳ میلی لیتر H_2O_2 ۳ درصد آغاز شد. فعالیت کاتالاز در ۲۴۰ نانومتر با تجزیه H_2O_2 اندازه گیری و فعالیت CAT به عنوان واحد در هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم های PAL و TAL

برای تهیه ی عصاره آنزیمی، ۰/۱ گرم بافت تر کالوس در نیتروژن مایع پودر و با ۲ میلی لیتر بافر Tris-HCl (pH ۸/۸)، حاوی ۱۵ میلی مولار β -مرکاپتواتانول) در دمای ۴ درجه سانتی گراد سائیده و در $15000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی برای اندازه گیری فعالیت آنزیم ها استفاده شد. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) و واکنش تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید (tCA) را کاتالیز می کند. در این روش از L-فنیل آلانین به عنوان گهرمایه استفاده می شود. مخلوط واکنش حاوی ۱ میلی لیتر بافر استخراج، ۰/۵ میلی لیتر L-فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۳۵۰ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر و ۱۵۰ میکرو لیتر عصاره بود. نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید (۶ مولار) متوقف و محصول با ۱۰ میلی لیتر اتیل استات استخراج شد. نمونه ها تحت جریان هوا تبخیر شدند و رسوب جامد در ۳ میلی لیتر NaOH (۰/۰۵ مولار) حل و جذب در ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد از فعالیت آنزیم PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید

در حالی که بیشترین محتوای این ترکیبات (۲/۹۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک معادل حدود ۲/۵۷ برابر افزایش) پس از تیمار کالوس‌ها با ۲۰۰ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین همراه با ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات اکسید آهن مشاهده شد. میانگین محتوای ترکیبات فنولی کالوس‌ها پس از تیمار با Fe₃O₄-NPs، tCA و L-Phe از مقدار ۱/۳-۲/۳۱ میلی گرم در گرم در روز دوم پس از تیمار به ۲/۰۵ - ۲/۹۶ میلی گرم در گرم وزن خشک کالوس در روز پانزدهم تیمار تغییر کرد (شکل ۲A). تمامی تیمارهای به کار برده شده اعم از پیش ماده‌ها و نانو ذرات اکسید آهن به صورت ساده و ترکیبی اثر فزاینده‌ای بر محتوای فلاونوئیدی کالوس گیاه نرگس داشتند. افزایش محتوای این ترکیبات در کالوس‌ها در روز پانزدهم پس از تیمار نسبت به روز دوم بیشتر بود. ۱۵ روز پس از تیمار، محتوای فلاونوئید کل کالوس‌ها نسبت به گیاهان شاهد از حدود ۱/۵ برابر تحت تیمارهای منفرد به حدود ۲ برابر در تیمارهای توأم نانوذرات و یکی از پیش ماده‌ها افزایش یافت. در واقع، افزودن نانوذرات اکسید آهن به تیمار پیش ماده‌ها سبب تشدید اثرات آن‌ها شد و محتوای ترکیبات فلاونوئیدی را از میانگین حدود ۰/۴۷ به ۰/۶۵ میلی گرم در گرم وزن خشک کالوس تغییر داد (شکل ۲B).

تیمار گیاه نرگس با نانوذرات اکسید آهن و پیش ماده‌ها (L-Phe و tCA) محتوای ترکیبات آلکالوئیدی کل را در بافت کالوس به طور قابل توجهی افزایش داد. تغییرات در محتوای آلکالوئیدها در تیمارهای ترکیبی شاخص تر از تیمارهای منفرد بود. دو روز پس از تیمار با NPs-

میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ تعیین شد. میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه و گروه‌بندی شدند.

نتایج

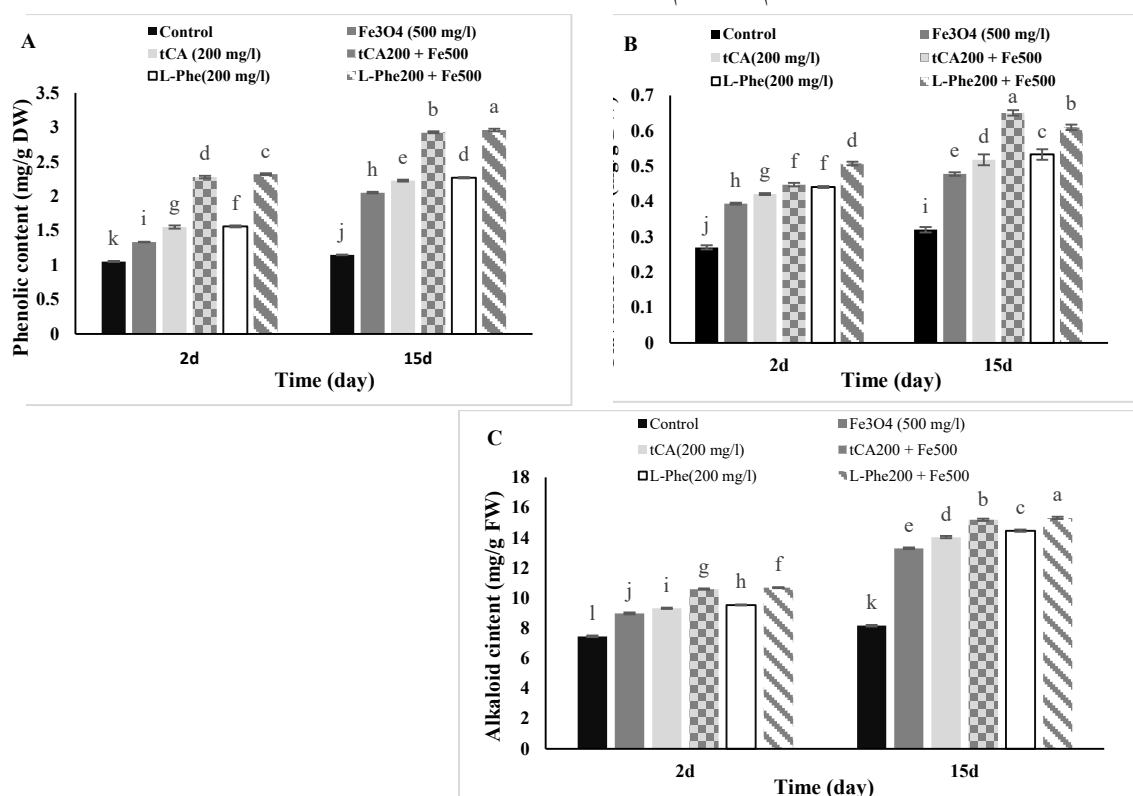
در ابتدا برای اطمینان از نفوذ نانوذرات در کالوس‌های تیمار شده با Fe₃O₄-NP، غلظت عنصر آهن در کالوس‌ها با روش ICP-OES (طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده القایی) بطور کمی بررسی شد که افزایش معنی‌داری را در بافت تیمار شده نسبت به شاهد نشان داد. در دو نمونه مورد بررسی ۱۵ روز پس از تیمار، غلظت یون آهن در کالوس‌های تحت تیمار ۵۰۰ میلی گرم در لیتر Fe₃O₄-NPs، برابر ۳/۵۸ پی‌پی‌ام و در نمونه شاهد برابر ۰/۰۱ پی‌پی‌ام برآورد شد. پس از آن سنجش‌های بیوشیمیایی انجام شد که نتایج آن به شرح زیر است:

تغییر محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی کل

محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی کل در کالوس‌های گیاه نرگس به طور قابل توجهی در طول تیمار افزایش یافت. به ویژه در تیمارهای ترکیبی پیش ماده‌ها که همراه با نانوذرات اکسید آهن بکار رفته بودند، بیشترین تأثیر در محتوای این ترکیبات بخوبی ۲ و ۱۵ روز پس از تیمار مشاهده شد. کمترین محتوای ترکیبات فنولی در کالوس‌های شاهد بدست آمد که از ۱/۰۵ میلی گرم در گرم وزن خشک در روز دوم پس از تیمار به ۱/۱۵ میلی گرم در گرم وزن خشک (۱/۱ برابر افزایش) در روز پانزدهم پس از تیمار تغییر یافت.

وزن خشک کالوس (۱/۶۲ برابر نسبت به شاهد) و در تیمارهای ترکیبی ۱۵/۱۸ تا ۱۵/۳۱ میلی گرم در گرم وزن خشک کالوس (تقریباً ۱/۸۷ برابر شاهد) اندازه گیری شد. از سوی دیگر، تغییر محتوای آلکالوئید نمونه شاهد در طول زمان معنی دار نبود، به طوری که از ۷/۴۵ به ۸/۱۶ میلی گرم در گرم وزن خشک کالوس افزایش نشان داد (شکل ۲C).

محتوای $tCA + Fe_3O_4$ -NPs و $L-Phe + Fe_3O_4$ -NPs، آلکالوئیدی در مقایسه با شاهد حدود ۱/۴۲ برابر افزایش یافت (۱۰/۵ در برابر ۷/۴۵ میلی گرم در گرم وزن خشک کالوس). با گذشت زمان، ۱۵ روز پس از استخراج، محتوای آلکالوئیدها در کالوس گیاه نرگس تیمار شده نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. برای مثال، محتوای آلکالوئید کل با تیمار Fe_3O_4 -NPs برابر ۱۳/۲۸ میلی گرم در گرم



شکل ۲- مقایسه محتوای ترکیبات فنولی (A)، فلاونوئیدی (B) و آلکالوئیدی کل (C) در کالوس های *N. tazetta* L. تیمار شده با tCA ، Fe_3O_4 -NPs و $L-Phe$ در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار. میانگین ها سه تکرار \pm SE (خطای استاندارد) هستند، مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شده و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم وجود تفاوت معنی دار بین میانگین ها است.

Figure 2- Comparison of the contents of total phenolics (A), flavonoids (B) and alkaloids (C) in the calli of *N. tazetta* L. treated with Fe_3O_4 -NPs, tCA , and $L-Phe$ on the second and 15th days after treatments. Values are mean of three replicates \pm SE (standard error), comparison of the means has been done using Duncan's multiple range test and same letters indicate no significant difference between means.

هیدروژن تحت تیمارهای مختلف نشان دادند

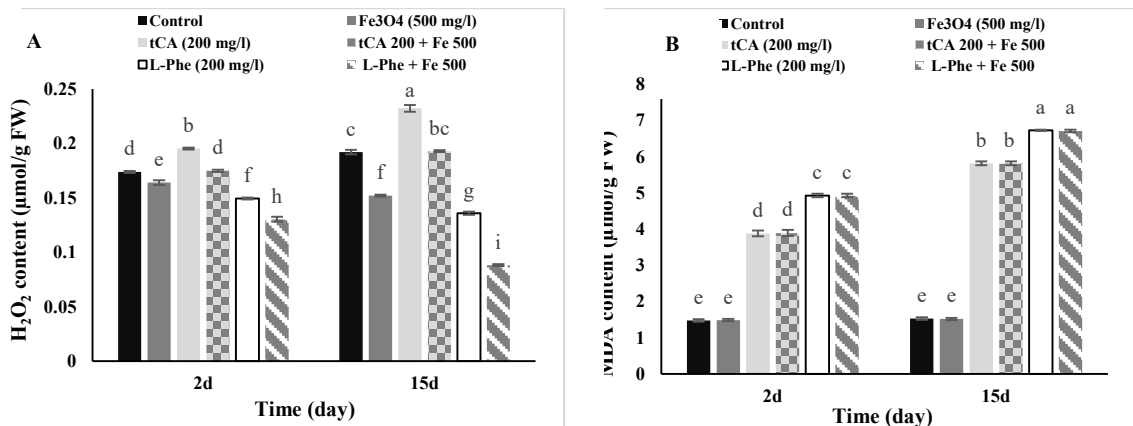
محتوای H_2O_2 کالوس ها در نتیجه تیمار با ۵۰۰

تغییر محتوای H_2O_2 و MDA

بررسی تغییرات میانگین محتوای پراکسید

میانگین محتوای MDA کالوس‌های گیاه نرگس تحت تیمار نانو ذرات اکسید آهن تفاوت معنی داری در دومین و پانزدهمین روز پس از تیمار نشان نداد (شکل ۳B). در حالی که محتوای این ترکیبات در کالوس‌های نرگس تحت تیمار پیش ماده‌ها، ۲ و ۱۵ روز پس از تیمار افزایش معنی داری را نشان داد. بالاترین میانگین محتوای MDA تحت تیمار کالوس‌ها در محیطی حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر هر یک از پیش ماده‌ها به تنهایی در پانزدهمین روز تیمار بدست آمد. همچنین افزایش ۲/۰۶ برابری تحت تیمار ترانس سینامیک اسید و ۲/۱۵ برابری تحت تیمار فنیل آلانین نسبت به شاهد مشاهده شد. گرچه تیمارهای توام نانو ذرات اکسید آهن و هر یک از پیش ماده‌ها سبب افزایش محتوای MDA کالوس‌ها شده بود، اما میانگین محتوای این ترکیبات اختلاف معنی داری با تأثیر تیمار هر یک از پیش ماده‌ها در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نشان نداد (شکل ۳B).

میلی گرم در لیتر نانو اکسید آهن کاهش معنی داری پیدا کرد و این امر در پانزدهمین روز تیمار مشخص تر بود، کاهش ۵/۲۰ و ۲۰/۸۳ درصدی به ترتیب در دومین و پانزدهمین روز پس از تیمار مشاهده شد (شکل ۳A). طی تیمار کالوس‌ها با دو پیش ماده ذکر شده، ترانس سینامیک اسید به طور معنی داری محتوای H₂O₂ را افزایش داد (۱/۲ برابر نسبت به شاهد ۱۵ روز پس از تیمار)، از سوی دیگر در تیمار با فنیل آلانین محتوای هیدروژن پراکسید نسبت به شاهد به طور معنی دار کاهش یافت (۲۹ درصد کاهش نسبت به شاهد، پانزدهمین روز پس از تیمار). همانطور که در شکل ۳A نشان داده شده است در تیمارهای توام (Fe₃O₄-NPs همراه با هر یک از پیش ماده‌ها) محتوای هیدروژن پراکسید کاهش یافت، بیشترین کاهش محتوای H₂O₂ کالوس تحت تیمار توام L-Phe+ Fe₃O₄-NPs حدود ۲۳/۵۲ درصد کمتر از میانگین محتوای پراکسید هیدروژن در نمونه به شاهد مشاهده شد.



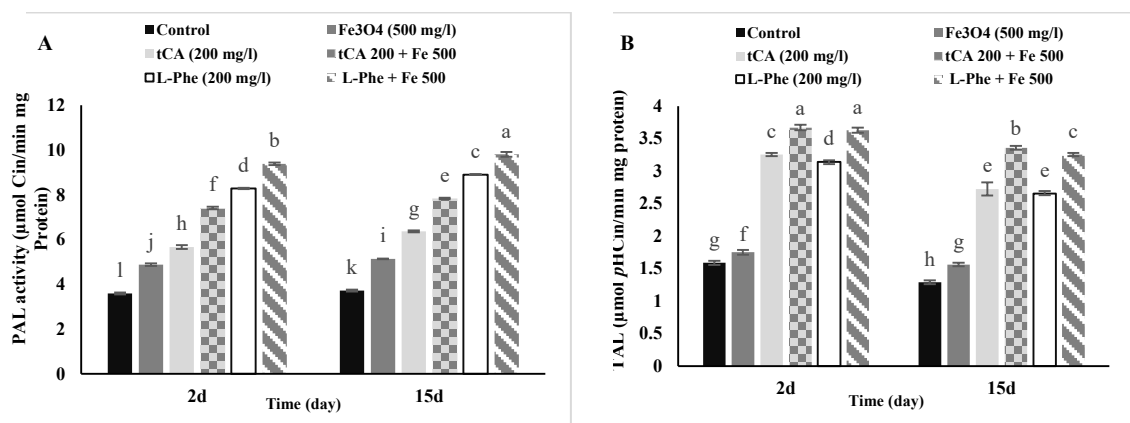
شکل ۳- مقایسه محتوای H₂O₂ (A) و MDA (B) در کالوس‌های *N. tazetta* L. تیمار شده با Fe₃O₄-NPs، tCA و L-Phe در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شده است. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE (خطای استاندارد) هستند و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها است.

Figure 3- Comparison of H₂O₂ (A) and MDA (B) contents in calli of *N. tazetta* L. treated with Fe₃O₄-NPs, tCA, and L-Phe on the second and 15th days after treatment. Comparison of the means has been done using Duncan's multiple range test. Values are mean of three replicates ± SE (standard error), and same letters indicate no significant difference between means.

تغییر فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL

نتایج نشان دادند پس از تیمار کالوس‌ها با محرک‌های مختلف، افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) و تیروزین آمونیلیاز (TAL) نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴)، در نتیجه تیمار کالوس‌ها با نانوذرات اکسید آهن فعالیت آنزیم PAL به میزان اندکی (۱/۱ برابر شاهد) افزایش نشان داد، در صورتی که پس از تیمار با Fe_3O_4 -NPs + L-Phe در روزهای دوم و پانزدهم تیمار به بالاترین حد خود یعنی حدود ۲/۶ برابر شاهد رسید. همچنین، اثر پیش‌ماده‌ی فنیل آلانین در افزایش سطح فعالیت PAL بیشتر از تأثیر ترانس سینامیک اسید بود (به ترتیب افزایش ۲/۳۹ برابر در مقابل ۱/۷۱ برابر فعالیت PAL در نمونه شاهد). مشابه اثر فنیل آلانین، تیمار توام $t\text{CA} + \text{Fe}_3\text{O}_4$ -NPs سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL در دومین و پانزدهمین روز پس از تیمار شد. همانطور که در شکل ۴A دیده می‌شود افزایش فعالیت PAL تحت تیمارهای مختلف الگوی مشابهی را در دو

زمان مورد بررسی نشان می‌دهد. فعالیت آنزیم TAL پس از تیمار کالوس‌ها با نانوذرات اکسید آهن افزایشی حدود ۲۷ درصد را نشان داد (شکل ۴B)، اما تیمار دو پیش‌ماده‌ی L-Phe و $t\text{CA}$ به تنهایی و در ترکیب با Fe_3O_4 -NPs فعالیت این آنزیم را به میزان قابل توجهی افزایش دادند (شکل ۴B). بیشترین فعالیت آنزیم TAL در تیمار $t\text{CA} + \text{Fe}_3\text{O}_4$ -NPs در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار (به ترتیب ۲/۶۱ و ۲/۳۱ برابر نمونه شاهد) و در تیمار L-Phe + Fe_3O_4 -NPs (به ترتیب ۲/۵۳ و ۲/۲۹ برابر نمونه شاهد) ثبت شد. کاربرد پیش‌ماده‌های $t\text{CA}$ و L-Phe به تنهایی نیز بطور معنی‌داری فعالیت آنزیم TAL در کالوس‌ها را افزایش داد که البته فعالیت نسبت به اثر تیمارهای ترکیبی کمتر بود. همچنین فعالیت آنزیم فوق در طول زمان از روز دوم نسبت به روز پانزدهم پس از تیمار کاهش نشان داد (شکل ۴B).



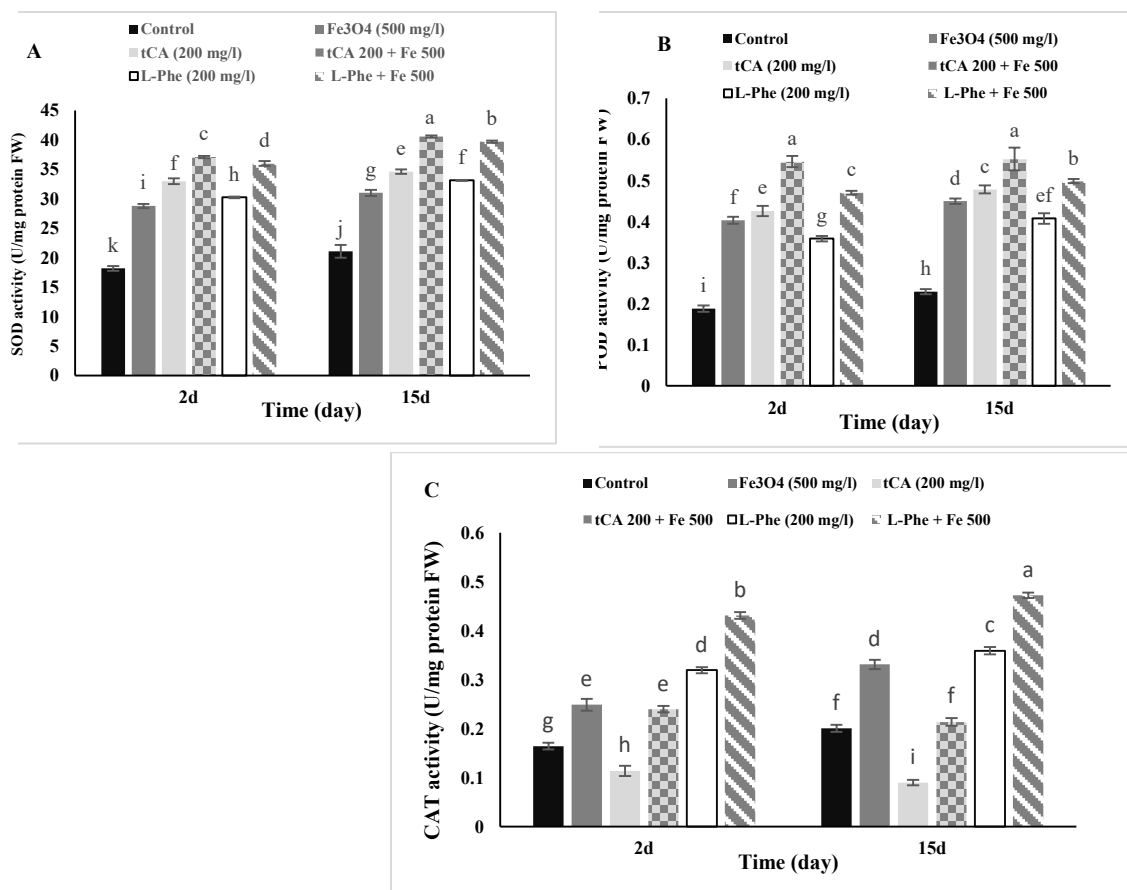
شکل ۴- مقایسه فعالیت آنزیم‌های PAL (A) و TAL (B) در کالوس‌های *N. tazetta* L. تیمار شده با نانوذرات Fe_3O_4 -NPs، $t\text{CA}$ و L-Phe در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار. مقادیر میانگین سه تکرار \pm SE (خطای استاندارد) هستند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شده و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Figure 4- Comparison of the PAL (A) and TAL (B) activities of the calli of *N. tazetta* L. treated with Fe_3O_4 -NPs, $t\text{CA}$, and L-Phe on the second and 15th days after treatment. Values are mean of 3 replicates \pm SE (standard error), comparison of means has been done using Duncan's multiple range test and same letters indicate no significant difference between means.

تغییرات در فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی

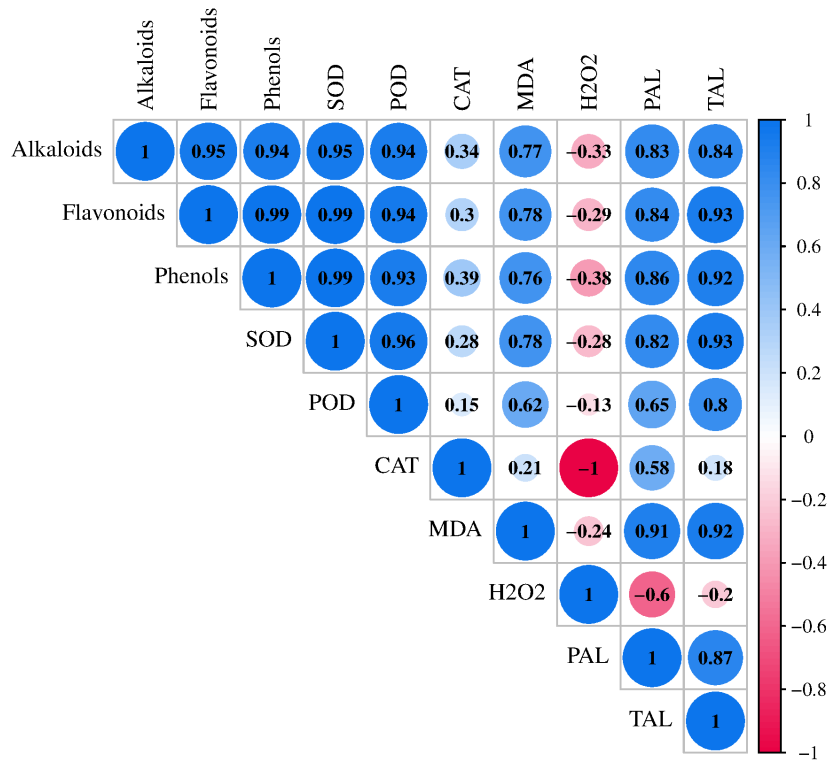
مقایسه تغییرات فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی کالوس گیاه نرگس تحت تیمار نانوذرات آهن و پیش ماده‌ها به تنهایی یا ترکیبی در شکل ۵ نشان داده شده است. میانگین فعالیت آنزیم‌های فوق در کالوس‌های تیمار شده و تیمار نشده تفاوت معنی داری را نشان دادند. تمامی تیمارها در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار به طور قابل توجهی فعالیت SOD، POD و CAT کالوس‌ها را افزایش دادند، به استثنای فعالیت CAT که با تیمار *tCA* کاهش یافت (۰/۱۱ واحد در میلی گرم پروتئین در برابر ۰/۱۶ واحد بر میلی گرم پروتئین در شاهد). اما این اثر کاهشی در تیمار ترکیبی با Fe₃O₄-NPs بهبود یافت، به طوری که فعالیت کاتالاز در تیمار Fe₃O₄-NPs + *tCA* برابر ۰/۲۳ واحد به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد (شکل ۵C). بیشترین میزان فعالیت کاتالاز پس از تیمار با L-Phe + Fe₃O₄-NPs در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار به ترتیب حدود ۰/۴۳ و ۰/۴۷ واحد به ازای هر میلی گرم پروتئین مشاهده شد. اگرچه تیمارهای *tCA* و L-Phe به تنهایی محرک‌های مؤثری برای افزایش فعالیت SOD و POD در کالوس‌های نرگس بودند، اما افزودن نانوذرات اکسید آهن باعث تشدید اثر این دو پیش ماده در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار شد. بر اساس نتایج تیمارهای

ترکیبی کالوس‌ها و بررسی میانگین فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی آن‌ها در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش ۱/۹۷-۱/۸۸ برابری فعالیت SOD (شکل ۵A)، افزایش ۲/۶۱-۲/۲۲ برابری فعالیت POD (شکل ۵B) و افزایش ۲/۶۸-۲/۳۵ برابری فعالیت CAT (شکل ۵C) مشاهده شد. شکل ۶ نتایج حاصل از آزمون همبستگی پیرسون بین متغیرهای اندازه گیری شده را ۱۵ روز پس از تیمار کالوس‌ها نشان می‌دهد. بر طبق این آزمون بین افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، POD، TAL، PAL و سطوح MDA با افزایش محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدهای موجود در کالوس‌های گیاه نرگس کشت شده در حضور Fe₃O₄-NPs، *tCA* و L-Phe همبستگی مثبت و قوی (بین ۰/۸ تا ۰/۹۹) وجود داشت، همبستگی بین محتوای این متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنزیم CAT، مثبت با شدت متوسط (بین ۰/۳۹ تا ۰/۱۵) بود. در حالی که تغییرات محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به انباشتگی متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی منفی بود (۰/۶- تا ۰/۱۳-). نتایج بررسی ضرایب همبستگی پیرسون بین پارامترهای ذکر شده در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار الگوی تقریباً مشابهی را نشان دادند.



شکل ۵- مقایسه فعالیت آنزیم‌های (A) SOD، (B) POD و (C) CAT در کالوس‌های *N. tazetta* L. تیمار شده با Fe₃O₄-NPs، tCA و L-Phe در روزهای دوم و پانزدهم پس از تیمار. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm SE (خطای استاندارد) هستند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شده و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها است.

Figure 5- Comparison of the SOD (A), POD (B) and CAT (C) activities of the calli of *Narcissus tazetta* L. treated with Fe₃O₄-NPs, tCA, and L-Phe on the second and 15th days after treatment. Values are the mean of three replicates \pm SE (standard error), comparison of means has been done using Duncan's multiple range test and same letters indicate no significant difference between means.



شکل ۶- ماتریس ضرایب همبستگی پیرسون، رابطه بین متغیرها را نشان می‌دهد. دایره‌های با رنگ آبی و قرمز به ترتیب نشانگر رابطه مثبت و منفی بین متغیرها است. شدت رنگ و قطر هر دایره شدت و بزرگی همبستگی بین متغیرها را نمایان می‌سازد.

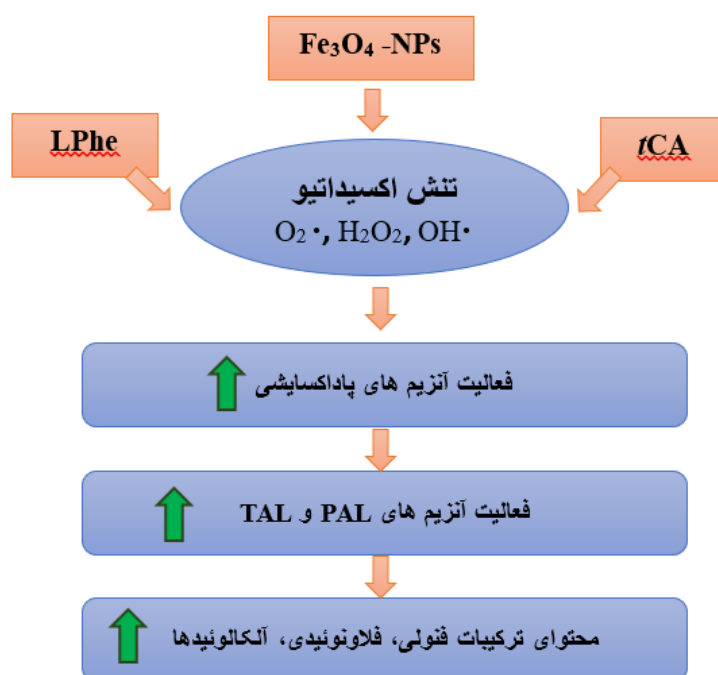
Figure 6- The matrix of Pearson correlation coefficients shows the relationship between the variables. Blue and red circles indicate positive and negative relationships between variables, respectively. The color intensity and diameter of each circle show the intensity and magnitude of correlation between variables.

(Zhang et al., 2012). در این پژوهش از سه

محرك برای بهبود تولید ترکیبات مؤثره در گیاه نرگس استفاده شد. از آنجایی که نانوذرات اکسید آهن همراه با tCA و L-Phe، سبب افزایش محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و همچنین فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و CAT شدند می‌توان نتیجه گرفت نانوذرات اکسید آهن سبب ایجاد تنش اکسیداتیو و سپس فعال شدن پاسخ‌های دفاعی در کالوس‌های نرگس شده است (شکل ۷).

بحث

استفاده از محرك‌ها یکی از مؤثرترین راهکارها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانوی مطلوب در گیاه است (Ramachandra & Srinivasa, 2008). محرك‌ها می‌توانند الگوی فعالیت گروهی از ژن‌ها و آنزیم‌های مسیره‌ای بیوسنتزی برخی متابولیت‌های ثانوی را تغییر دهند (Howlett, 2006). شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاهان باعث ایجاد یک شبکه انتقال علامت می‌شود که با شناسایی محرك توسط گیرنده‌های سطح یا درون سلول آغاز می‌شود



شکل ۷- سازوکار اثر تیمارهای Fe_3O_4 -NPs، tCA و L-Phe روی افزایش محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و آلکالوئیدهای کالوس نرگس شهلا

Figure 6. Mechanism of the treatment effects of Fe_3O_4 -NPs, tCA and L-Phe on increasing the content of phenolic, flavonoid and alkaloid compounds in *N. tazetta* callus

معطر، پیش ساز بسیاری از متابولیت‌های ثانوی مانند اسیدهای فنولی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، لیگنین و آلکالوئیدها می‌باشد (Feduraev et al., 2020). این ماده پیش ساز مهمی در مسیرهای مختلف بیوسنتزی، به ویژه پروتئین‌ها، ترکیبات فنولی و اسمولیت‌ها است که از طریق فرآیندهای علامت‌دهی، بر عملکرد گیاهان در پاسخ به تنش‌ها تأثیر قابل توجهی دارد (Moe, 2013). محرک دیگر یعنی ترانس سینامیک اسید نیز به عنوان اولین ماده شیمیایی تولید شده در مسیر فیل پروپانوئیدها پیش ساز بسیاری از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسیدها است و در تشکیل سایر ترکیبات فنولی پیچیده نقش کلیدی را ایفا می‌کند (Swanson, 2003). بررسی سازوکار برخی الیستورها و

نانوذرات اکسید آهن به عنوان ترکیبی که فراهم کننده یک ماده مغذی حیاتی است، در فرآیندهای متابولسمی متعددی در گیاهان دخالت دارد (Hu et al., 2017). آهن نقش اساسی در رشد و نمو گیاهان دارد و فرآیندهای سلولی مختلفی را مانند بیوسنتز کلروفیل، توسعه کلروپلاست، فتوسنتز، تنفس و سنتز RNA را تنظیم می‌کند (Feng et al., 2022). متابولیت‌های حد واسط تولید شده در واکنش‌های فتوسنتز و تنفس به عنوان محرک و پیش ساز در مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانوی وارد می‌شوند. همچنین، آهن یک کوفاکتور ضروری برای فعالیت برخی آنزیم‌های کلیدی در این مسیر است (Kolton et al., 2022). فیل آلانین، به عنوان یک اسید آمینه

ثبات غشاء یک ویژگی حیاتی مورد نیاز برای زنده ماندن گیاه تحت تنش‌های غیر زیستی می‌باشد (Shah et al., 2020). اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمول‌ترین و قابل قبول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء محسوب می‌شود. MDA به عنوان یک نشانگر ثبات غشاء و آسیب سلولی شناخته می‌شود (Shah et al., 2020). بر اساس یک گزارش سطوح MDA در گیاهان گندم تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن کاهش یافته بود (Feng et al., 2022). از سوی دیگر، گیاهان نخود تیمار شده با اسید سینامیک، افزایش محتوای MDA را نشان دادند که به علت بروز تنش اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد ROS بود (Kapoor et al., 2021). آنزیم‌های پاداکسایشی برای جلوگیری از واکنش‌های آبخاری و زنجیره اکسیداسیون‌های کنترل نشده در گیاهان عمل می‌کنند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اولین خط دفاعی است که رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل کرده و با حذف سوپراکسید نقش مهمی در عملکرد سیستم پاداکسایشی دارد. پراکسید هیدروژن می‌تواند توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون که در کلروپلاست عمل می‌کند یا توسط پراکسیداز در دیواره سلولی و سیتوپلاسم و یا توسط کاتالاز در پراکسی‌زوم و میتوکندری به آب و اکسیژن مولکولی تجزیه شود. همچنین آنزیم کاتالاز (CAT) که در تبدیل H₂O₂ به اکسیژن و آب نقش دارد، یک آنتی‌اکسیدان حیاتی است (Koleva et al., 2022). در این

محرک‌ها حاکی از آن است که پراکسید هیدروژن که به عنوان یک مولکول علامتی در تنش‌های مختلف غیرزیستی عمل می‌کند در اینجا نیز می‌تواند شروع کننده‌ی آبخارهای علامت‌دهی برای هدف‌گیری افزایش بیوستتز متابولیت‌های ثانوی باشد. این گونه فعال اکسیژن از طریق واکنش‌های انتقال الکترون در میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌ها و نیز توسط اکسیدازهای پراکسیزومی، NADPH-اکسیدازها، پراکسیدازهای نوع III و سوپراکسید دیسموتازها تولید می‌شود (Smirnoff & Arnaud, 2019). در تنش اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد می‌توانند به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان ثانوی عمل کرده و منجر به تجمع برخی از ترکیبات مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی در سلول‌ها و بافت‌های تحت تنش شوند. ترکیبات فنولی نقش استثنایی در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) دارند (Nourozi et al., 2019). بر اساس نتایج این پژوهش، Fe₃O₄-NPs و L-Phe محتوای H₂O₂ را کاهش دادند، اما tCA سبب افزایش محتوای پراکسید هیدروژن در کالوس‌ها شد. یافته‌های Kapoor و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند در گیاه نخود (*Pisum sativum*) تیمار با سینامیک اسید سبب افزایش سطح H₂O₂ شد. تیمار گیاهان با نانوذرات اکسید آهن می‌تواند تجمع H₂O₂ را کاهش دهد و تمامیت غشای سلولی را حفظ نماید (Konate et al., 2017). این نتیجه با یافته‌های Tawfik و همکاران (۲۰۲۱) همخوانی دارند و نشان دادند نانوذرات اکسید آهن سبب کاهش محتوای پراکسید هیدروژن در گیاه *Moringa oleifera* شده بود.

پژوهش، تیمار کالوس های نرگس توسط نانوذرات Fe_3O_4 -NPs به تنهایی و همراه با *tCA* یا *L-Phe* سبب افزایش فعالیت آنزیم های پاداکسایشی شد. آهن بخش مهمی از سیستم ردوکس در پروتئین های دارای گروه هم مانند کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم و پروتئین های Fe-S مانند فردوکسین ها و سوپر اکسید دیسموتاز است (Nourozi et al., 2019). نتایج پژوهش های Wang و همکاران (۲۰۱۱) افزایش فعالیت SOD و CAT گیاهان چچم چندساله (*Lolium perenne*) و *Cucurbita mixta* را که در معرض Fe_3O_4 -NPs قرار گرفته بودند نشان دادند. کاربرد فنیل آلانین روی برگ ها و بذر سویا سبب افزایش فعالیت آنزیم های پاداکسایشی SOD، POD و CAT شد (Teixeira et al., 2017). همچنین نتایج ما نشان دادند در کالوس های تحت تیمار *tCA*، فعالیت SOD و POD افزایش و فعالیت CAT کاهش نشان داد. همچنین گزارش شده است که سینامیک اسید سبب تنش اکسیداتیو می شود (Ye et al., 2006)، بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم های پاداکسایشی قابل توجیه است. در پژوهش Sardar و همکاران (۲۰۲۳) نشان داده شد نانوذرات اکسید آهن سبب تحریک تولید پاداکساینده ها و متابولیت ها در کشت کالوس گیاه *Bergenia ciliata* (haw.) Sternb شدند. افزودن نانوذرات آهن به محیط کشت کالوس های فوق سبب افزایش فعالیت آنزیم های فنیل آلانین آمونیا لیاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شد. علاوه بر آن، محتویات ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدها پس از تیمار با نانوذرات افزایش یافتند. ریزنمونه های برگ و دم برگ گیاه سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) در شرایط درون شیشه ای، با سویه A4/اگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenensis*) تلقیح شد تا ریشه موئین تولید شود. ریشه های موئین تکثیر داده شد و با سطوح مختلف نانو اکسید آهن تیمار شدند. نتایج نشان داد که غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید آهن منجر به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای فلاونوئیدی شد (Madani et al., 2021). استفاده از دو محرک فنیل آلانین و ترانس سینامیک اسید به عنوان پیش سازهای اولیه ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی، سبب افزایش فعالیت آنزیم های دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیت های ثانوی و افزایش تولید آن ها می شود. در پژوهش حاضر محتوای ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آلکالوئیدی کل در کالوس نرگس شهلا تحت تیمارهای نانوذرات آهن و پیش سازهای *L-Phe* و *tCA* افزایش یافت. Sanikhani و همکاران (۲۰۲۰) اثر فنیل آلانین بر محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئید کل را در گیاه هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) بررسی کردند. غلظت یک میلی مولار فنیل آلانین محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را افزایش داد. بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب به ۱۶/۹۴ و ۷/۳۱ میلی گرم در گرم وزن خشک گیاه رسید. Hassan و Jassim (۲۰۱۸) در پژوهشی نشان دادند اسیدهای فنولی شامل سینامیک اسید محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی برگ ها و ریشه های گیاه برنج را افزایش دادند (Xuan & Khang, 2018).

پژوهش، تیمار کالوس های نرگس توسط نانوذرات Fe_3O_4 -NPs به تنهایی و همراه با *tCA* یا *L-Phe* سبب افزایش فعالیت آنزیم های پاداکسایشی شد. آهن بخش مهمی از سیستم ردوکس در پروتئین های دارای گروه هم مانند کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم و پروتئین های Fe-S مانند فردوکسین ها و سوپر اکسید دیسموتاز است (Nourozi et al., 2019). نتایج پژوهش های Wang و همکاران (۲۰۱۱) افزایش فعالیت SOD و CAT گیاهان چچم چندساله (*Lolium perenne*) و *Cucurbita mixta* را که در معرض Fe_3O_4 -NPs قرار گرفته بودند نشان دادند. کاربرد فنیل آلانین روی برگ ها و بذر سویا سبب افزایش فعالیت آنزیم های پاداکسایشی SOD، POD و CAT شد (Teixeira et al., 2017). همچنین نتایج ما نشان دادند در کالوس های تحت تیمار *tCA*، فعالیت SOD و POD افزایش و فعالیت CAT کاهش نشان داد. همچنین گزارش شده است که سینامیک اسید سبب تنش اکسیداتیو می شود (Ye et al., 2006)، بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم های پاداکسایشی قابل توجیه است. در پژوهش Sardar و همکاران (۲۰۲۳) نشان داده شد نانوذرات اکسید آهن سبب تحریک تولید پاداکساینده ها و متابولیت ها در کشت کالوس گیاه *Bergenia ciliata* (haw.) Sternb شدند. افزودن نانوذرات آهن به محیط کشت کالوس های فوق سبب افزایش فعالیت آنزیم های فنیل آلانین آمونیا لیاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شد. علاوه بر آن، محتویات ترکیبات فنولی کل و فلاونوئیدها پس از

بررسی فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL به علت ارتباط آن‌ها با مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی انتخاب شد. دو آنزیم PAL و TAL جز اولین و مهم‌ترین آنزیم‌های مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، فنولی و آلکالوئیدی هستند. این آنزیم‌ها از طریق دآمیناسیون فنیل آلانین و تیروزین به ترتیب برای تولید ترانس سینامیک اسید و p-کوماریک اسید (هیدروکسی سینامیک اسید) با آزاد کردن آمونیوم عمل می‌کنند و از این طریق پیش‌سازهای ترکیبات فنولی و آلکالوئیدها تولید خواهد شد. فعالیت این آنزیم‌ها تحت تمامی تیمارهای بکار برده شده در پژوهش حاضر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. L-Phe پیش‌ساز آنزیم PAL است و سبب تسریع بیوسنتز ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی می‌شود، CA، اولین محصول و آهن کوفاکتور ضروری برای بسیاری از آنزیم‌های این مسیر است. نتایج مشابهی در پژوهش Feduraev و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شد، بطوری که فعالیت آنزیم‌های PAL و TAL در نمونه‌های گندم منتقل شده به محیط کشت حاوی ۵۰۰ μM فنیل آلانین و تیروزین پس از ۴ ساعت به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در پژوهش دیگری فنیل آلانین که به صورت افشانه برگی روی سویا بکار رفته بود، افزایش فعالیت PAL را نشان داد (Teixeira et al., 2017).

نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر اثرات نانوذرات اکسید آهن و پیش‌ماده‌های L-فنیل آلانین و ترانس سینامیک اسید بر تولید آلکالوئیدهای آماریلیداسه در کالوس حاصل از پیاز گیاه نرگس شهلا بررسی

(2018). کاربرد خارجی L-فنیل آلانین در غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ یا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر تولید آلکالوئیدهای گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) آزمایش شده است. نتایج نشان دادند فنیل آلانین سبب افزایش معنی‌دار برخی از آلکالوئیدهای این گیاه شد (Hassan & Jassim, 2018). در پژوهشی بر روی گیاه بذراالبنج، که به عنوان منبعی غنی از آلکالوئیدهای تروپانی مانند اسکوپولامین و هیوسیامین شناخته شده است، اثر یون‌های معدنی از جمله آهن بر تولید آلکالوئیدها بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده‌ی افزایش محتوای آلکالوئید اسکوپولامین در طی استفاده خارجی آهن در این گیاه بود (Pudersell et al., 2012). همچنین تأثیر افزودن پیش‌ماده‌ی فنیل آلانین بر تجمع ترکیبات فنلی در کشت بافت بخش هوایی گیاه سداب (*Ruta graveolens* L.) بررسی شد. جداکشت‌ها در محیط کشت لینس مایر و اسکوگ (LS) کشت شدند و ۴ هفته پس از کشت فنیل آلانین با غلظت ۱/۲۵ گرم در لیتر اضافه شد. تولید اسیدهای فنلی و کاتچین (۱/۵ برابر) با افزودن پیش‌ماده به میزان قابل توجهی افزایش یافت. بیشترین میزان اسیدهای فنلی کل در روز دوم پس از تیمار بدست آمد. پارا-کوماریک اسید و فرولیک اسید ترکیبات فنلی غالب بودند (Szewczyk et al., 2023). نتایج مشابه در کالوس‌های گیاه چای تیمار شده با یک میلی‌مولار سینامیک اسید مشاهده شد. در پژوهش حاضر حداکثر تجمع ترکیبات فنلی کل در سه روز پس از تیمار (حدود ۵۰ درصد نسبت به شاهد) بدست آمد (Aksenova et al., 2023).

- 24) Optimal methods for sterilization of *Narcissus* bulb explants (*Narcissus tazetta* L.) *in vitro*. 6th Iranian Conference of Plant Physiology, Yazd University, Yazd, Iran. [in Persian].
- Alkhatib, R., Alkhatib, B., Abdo, N., Al-Eitan, L. & Creamer, R. (2019) Physio-biochemical and ultrastructural impact of (Fe₃O₄) nanoparticles on tobacco. *BMC Plant Biology*, 19(1), 253. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1864-1>
- Avellan, A., Yun, J., Zhang, Y., Spielman-Sun, E., Unrine, J. M., Thieme, J., Li, J., Lombi, E., Bland, G. & Lowry G.V. (2019) Nanoparticle size and coating chemistry control foliar uptake pathways, translocation, and leaf-to-rhizosphere transport in wheat. *ACS Nano*, 13, 5291–5305. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09781>
- Bastida, J., Berkov, S., Torras Clavería, L., Pigni, N. B., Andradre, J. P., De Martínez, V., Codina, C., & Francesc, V. (2011) Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In Munoz-Torrero (ed) *Recent advances in Pharmaceutical Sciences*, (Vol. 661, pp. 65-100). Transworld Research Network.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Christenhusz, M. J. M. & Byng, J. W. (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, شد. تیمار کالوس‌ها در محیط کشت بافت حاوی محرک‌های فوق‌الذکر سبب افزایش توان آن‌ها در تولید ترکیبات فنولی و آلکالوئیدها شد. به نظر می‌رسد نانوذرات و پیش‌ماده‌ها با ورود به سلول‌ها و سطوح H₂O₂ و MDA را در ساعت‌های اولیه تیمار افزایش داده و باعث تنش اکسیداتیو می‌شوند. سپس در نتیجه انفجار ROS مسیرهای علامت‌دهی پاسخ به تنش‌های غیر زیستی، فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی را تشدید نموده، منجر به القاء فعالیت بیشتر آنزیم‌های SOD، CAT و POD و آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوستنز متابولیت‌های ثانوی مانند آنزیم‌های PAL و TAL می‌شوند که افزایش محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را به عنوان ترکیبات پاداکساینده غیر آنزیمی بدنبال دارد و در ادامه تولید متابولیت‌های ثانوی دیگری مانند آلکالوئیدها نیز افزایش نشان داد. در نتیجه فعالیت آنزیم‌های پاداکسایشی به سرعت محتوای پراکسید هیدروژن و MDA بافت‌ها کاهش می‌یابد، به نحوی که در پایان روز دوم و پانزدهم که برداشت ریزنمونه‌ها صورت گرفت، مقدار این ترکیبات کاهش یافته بود و همبستگی منفی را با محتوای متابولیت‌های ثانوی نشان داد.

References

- Aksenova, M. A., Nechaeva, T. L., Zubova, M. Y., Goncharuk, E. A., Kazantseva, V. V., Katanskaya, V. M., Lapshin, P. V., & Zagorskina, N. V. (2023). Influence of different precursors on content of polyphenols in *Camellia sinensis* *in vitro* callus culture. *Plants*, 12(4), 796. <https://doi.org/10.3390/plants12040796>
- Alviridi-Pourganjelo, M., Saboora, A., & Seyed-Nezhad, M. (2019, October 23 &

- distribution of mineral elements in wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Plants*, 11(14), 1894. <https://doi.org/10.3390/plants11141894>
- Hanks, G. R. (2002) *Narcissus* and daffodil-the genus *Narcissus*. In Hardman, R. (ed), *Medicinal and aromatic plants-industrial profiles* (Vol. 21). Taylor & Francois, London. <https://doi.org/10.1201/9780203219355>
- Hassan, S. A. & Jassim, E. H. (2018) Effects of L-phenylalanine on the production of some alkaloids and steroidal saponins of fenugreek cotyledons derived callus. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 15(2), 481-486.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 12, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hein, C. L., Lens, J-P., Pai-Paranjape, V., Peek, C. & van de Grampel R. D. (2013) *X-ray and/or metal detectable articles and method of making the same*. US Patent 2013131251
- Hojjat, S. S. (2016) The effect of silver nanoparticle on lentil seed germination under drought stress. *The International Journal of Farming and Allied Sciences*, 5(3), 208–212.
- Hotchandani, T., de Villers, J. & Desgagné-Penix, I. (2019) Developmental regulation of the expression of Amaryllidaceae alkaloid biosynthetic genes in *Narcissus papyraceus*. *Genes (Basel)*, 10, 1-25. <https://doi.org/10.3390/genes10080594>
- Howlett, B. J. (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic 261, 201–217. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Dazy, M., Béraud, E., Cotelte, S., Meux, E., Masfarau, j. F., & Féraud, J. F. (2008) Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, 73, 281-290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.044>
- DeArmitt, C. (2017). Magnetite. in rothon, R. (eds) *Fillers for Polymer Applications. Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28117-9_34
- Desgagné-Penix, I. (2020) Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews*, 20(2), 409-431. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>
- Elemike, E. E., Uzoh, I. M., Onwudiwe, D. C. & Babalola, O. O. (2019) The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Applied Sciences*, 9, 499. <https://doi.org/10.3390/app9030499>
- Feduraev, P., Skrypnik, L., Riabova, A., Pungin, A., Tokupova, E., Maslennikov, P., & Chupakhina, G. (2020) Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways. *Plants*, 9(4), 476. <https://doi.org/10.3390/plants9040476>
- Feng, Y., Kreslavski, V. D., Shmarev, A. N., Ivanov, A. A., Zharmukhamedov, S. K., Kosobryukhov, A., Yu, M., Allakhverdiev, S. I., & Shabala, S. (2022) Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on growth, photosynthesis, antioxidant activity and

- Frontiers in Plant Science*, 13, 1-13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.806781>
- Kolton, A., Długosz-Grochowska, Wojciechowska, R., & Czaja, M. (2022) Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. *Scientia Horticulturae*, 291, 1-15.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110561>
- Konate, A., He X., Zhang, Z., Ma, Y. Zhang, P.; Alugongo, G. M.; Rui, & Y. (2017) Magnetic (Fe₃O₄) nanoparticles reduce heavy metals uptake and mitigate their toxicity in wheat seedling. *Sustainability*, 9, 790.
<https://doi.org/10.3390/su9050790>
- Kumari, A., Rana, V., Yadav, S. K. & Kumar, V. (2023) Nanotechnology as a powerful tool in plant sciences: Recent developments, challenges and perspectives. *Plant Nano Biology*, 5, 100046.
<https://doi.org/10.1016/j.plana.2023.100046>
- Kyndt, J. A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., & Van Beeumen, J. J. (2002) Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Letters*, 512(1-3), 240-244.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02272-X)
- Liu, D., Wen, J., Liu, J., & Li, L. (1999) The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: Reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB Journal*, 13, 2318–2328.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.15.2318>
- Lv, J., Christie, P. & Zhang, S. (2019) Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: Recent advances and methodological challenges. *Environmental Science: Nano*, 6, 41–59.
<https://doi.org/10.1039/C8EN00645H>
- Madani, V., Zare, N., & Asghari Zakaria, R. (2021) The effect of elicitors on the fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 371-375.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.004>
- Hu, J., Guo, H., Li, J., Gan, Q., Wang, Y., & Xing, B. (2017) Comparative impacts of iron oxide nanoparticles and ferric ions on the growth of *Citrus maxima*. *Environmental Pollution*, 221, 199–208.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.064>
- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I.Z., & Saeed, M. (2012) Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(1), 10-20.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.92725>
- Kapoor, R. T., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2021) Exogenously applied spermidine confers protection against cinnamic acid-mediated oxidative stress in *Pisum sativum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 2619-2625.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.052>
- Karyagina, T. B., Gaevskaya, O. A., Gukasova, E. A., Timchenko, T. V., & Bairamashvili, D. I. (2007) The effect of phenylalanine on biosynthesis of protoberberine alkaloids in the cell culture of low meadow-rue. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 267–272.
<https://doi.org/10.1134/S102144370702015X>
- Klosi, R., Mersinllari, M., & Gavani, E. (2016) Galantamine content in *Leucojum aestivum* populations grown in northwest Albania. *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 3-5.
- Koleva, L., Umar, A., Yasin, N. A., Shah, A. A., Siddiqui, M. H., Alamri, S., Riaz, L., Raza, A., Javed, T., & Shabbir, Z. (2022) Iron oxide and silicon nanoparticles modulate mineral nutrient homeostasis and metabolism in cadmium-stressed *Phaseolus vulgaris*.

- Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 73-7.
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.93330>
- Ramachandra, C. T. & Srinivasa Rao, P. (2008) Processing of *Aloe vera* Leaf Gel: A Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(2), 502-51.
<https://doi.org/10.3844/ajabssp.2008.502.510>
- Ramachandra Rao, S. & Ravishankar, G. A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
[https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00007-1)
- Renaudin, J. P. (1984) Reversed-phase HPLC characteristics of indole alkaloids from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L. *Chromatography*, 291, 165-174.
- Rivero-Montejo, S. d. J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021) Nanoparticles as novel elicitors to improve bioactive compounds in plants. *Agriculture*, 11, 134.
<https://doi.org/10.3390/agriculture11020134>
- Sanikhani, M., Akbari, A., & Kheiry, A. (2020) Effect of phenylalanine and tryptophan on morphological and physiological characteristics in colocynth (*Citrullus colocynthis* L.). *Journal of Plant Process and Function*, 9(35), 317-328.
- Sardar, T., Ishtiaq, M., Waqas-Mazhar, M., Maqbool, M., Moussa, I. M., Zaman, W., & Mahmoud, E. A. (2023). Methyl jasmonate and iron oxide nanoparticles act as elicitors to stimulate production of bioactive antioxidants and metabolites in the in vitro callus cultures of *Bergenia ciliata* (haw.) Sternb. *South African Journal of Botany*, 162, 201-210.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.09.016>
- biochemical properties and expression of the genes involved in sesquiterpenes biosynthesis pathway in the hairy root cultures of medicinal plant *Valeriana officinalis* L. *Iranian Journal of Plant Biology*, 12(4), 19-42.
<https://doi.org/10.22108/ijpb.2020.122350.1207>
- Marconi, P. L., Alvarez, M. A., & Pitta-Alvarez, S. I. (2007) How polyamine synthesis inhibitors and cinnamic acid affect tropane alkaloid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136, 63-75.
<https://doi.org/10.1007/BF02685939>
- Moe, L. A. (2013) Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100, 1692-1705.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1300033>
- Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A. & Farjaminezhad, M. (2017) Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53, 104-111. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9802-0>
- Nourozi, E., Hosseini, B., Maleki, R., & Abdollahi-Mandoulakani, B. (2019) Iron oxide nanoparticles: a novel elicitor to enhance anticancer flavonoid production and gene expression in *Dracocephalum kotschyi* hairy-root cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6418-6430.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9921>
- Pudersell, K., Vardja, T., Vardja, R., Matto, V., Arak, E., & Raal, A. (2012) Inorganic ions in the medium modify tropane alkaloids and riboflavin output in *Hyoscyamus niger* root cultures.

- Tawfik, M. M., Mohamed, M. H., Sadak, M. S., & Thalooh, A. T. (2021) Iron oxide nanoparticles effect on growth, physiological traits and nutritional contents of *Moringa oleifera* grown in saline environment. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 177. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00624-9>
- Teixeira, W. F., Fagan, E. B., Soares, L. H., Umburanas, R. C., Reichardt, K., & Neto, D. D. (2017) Foliar and seed application of amino acids affects the antioxidant metabolism of the soybean crop. *Frontiers in Plant Science*, 8, 327. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00327>
- Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J., Sodek, A., Koussevitzky, S., Narayan Misra, A., Mittler, R., & Shintani, D. (2009) Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151, 421-432. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140046>
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015) Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *The Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1769-1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Van Goietsenoven, G., Hutton, J., Becker, J. P., Lallemand, B., Robert, F., Lefranc, F., Pirker, C., Vandebussche, G., Van Antwerpen, P., Evidente, A., Berger, W., Prévost, M., Pelletier, J., Kiss, R., Kinzy, T. G., Kornienko, A., & Mathieu V. (2010) Targeting of eEF1A with Amaryllidaceae isocarboxystyryls as a strategy to combat melanomas. *Faseb Journal*, 24, 4575-84. <https://doi.org/10.1096%2Ffj.10-162263>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. Serpoush, M., Kiyasatfar, M. & Ojaghi, J. (2022) Impact of Fe₃O₄ nanoparticles on wheat and barley seeds germination and early growth, *Materials Today: Proceedings*, 65, 2915-2919. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.06.441>
- Shah, A. A., Khan, W. U., Yasin, N. A., Akram, W., Ahmad, A., Abbas, M, Ali, A., & Safdar M. N. (2020) Butanolide alleviated cadmium stress by improving plant growth, photosynthetic parameters and antioxidant defense system of *Brassica oleracea*. *Chemosphere*, 261, 127728. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127728>
- Singh, P. K., Singh, R., & Singh, S. (2013) Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 53-9. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0126-6>
- Smirnoff, N. & Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221, 1197-1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
- Swanson, B. G. (2003) Tannins and polyphenols. In Caballero, B., Trugo, L., & Finglas, P. M. (Eds), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 5729-5733), Academic Press.
- Szewczyk, A., Wojciech P., & Halina E. (2023) The influence of exogenous phenylalanine on the accumulation of secondary metabolites in agitated shoot cultures of *Ruta graveolens* L. *Molecules* 28(2), 727. <https://doi.org/10.3390/molecules28020727>

- chlorophylls, phenolics and antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa* L.) in submergence. *Molecules*, 23(3), 620. <https://doi.org/10.3390/molecules23030620>
- Ye, S. F., Zhou, Y. H., Sun, Y., Zou, L. Y., & Yu, J. Q. (2006) Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 255–262. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.608389>
- Zhang, B., Zheng, L. P., & Wang, J. W. (2012) Nitric oxide elicitation for secondary metabolite production in cultured plant cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 455–466. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3658-8>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555- 559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J. Q., Shan, X., & Xing, B. (2011) Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*, 5(1), 30–42. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489206>
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016) Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in Plant Science*, 21, 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
- Wang, X., Xie, H., Wang, P. & Yin, H. (2023) Nanoparticles in plants: uptake, transport and physiological activity in leaf and root. *Materials (Basel)*, 16(8), 3097. <https://doi.org/10.3390/ma16083097>
- Xuan, T. D. & Khang, D. T. (2018) Effects of exogenous application of protocatechuic acid and vanillic acid to

