



سنتز سبز نانوذرات اکسید روی و مس با استفاده از عصاره گیاه مورینگا و ارزیابی اثر آن‌ها بر بیان ژن *Mo-CBP3*

Green Synthesis of ZnO and CuO Nanoparticles Using Extract of Moringa and Evaluation of Their Effects on *Mo-CBP3* Gene Expression

صالحه گنجعلی^۱، حمیده خواجه^{۲*}، ایوب مزارعی^{۳*}، حسین کمال‌الدینی^۴، حسن احمدی^۵

Salehe Ganjali¹, Hamide Khajeh^{2*}, Ayoub Mazarei^{3*}, Hossein Kamaladini⁴, Hassan Ahmadi⁵

۱- استادیار، ۳- دانش آموخته دکتری بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

۲- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل، ایران.

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه زابل، ایران.

۵- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل، ایران

1. Assistant Professor, 3. PhD Graduate of Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran.

2. MSc. Molecular Genetics of Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Iran.

4. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Iran.

5. MSc. Biotechnology of Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Iran.

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: mazaia70@gmail.com and Hmdekhaje@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۲/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۸/۱ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۸/۶

Received: 2025/04/26 | Accepted: 2025/10/23 | Published: 2025/10/28

Abstract

The use of plant extracts for the green synthesis of nanoparticles is an environmentally friendly approach that employs natural solvents and, due to increased production efficiency and reduced cost, time, and energy, can serve as a suitable alternative to conventional physical and chemical methods. This study aimed to synthesize zinc oxide (ZnO) and copper oxide (CuO) nanoparticles using Moringa plant extract and to evaluate the effects of different concentrations (0, 100, 150, and 250 ppm) on the relative expression of the *Mo-CBP3* gene in Moringa at 48 and 72 hours after treatment. Structural characterization of the nanoparticles using scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray (EDX) analysis showed that the synthesized particles were spherical with sizes of 25–37 nm for ZnO and 32–36 nm for CuO. Analysis of variance revealed that application of ZnO and CuO nanoparticles altered *Mo-CBP3* gene expression. The highest relative expression (1.51-fold) was observed 48 hours after treatment with 150 ppm ZnO, showing a 6.67% increase compared to the control. Increasing the ZnO concentration led to a significant decrease in gene expression at 72 hours, while 100 ppm CuO induced the highest relative expression (1.504-fold) at 48 hours, corresponding to a 6.55% increase over the control. In combined treatments, co-application of 150 ppm ZnO and 100 ppm CuO resulted in the highest relative *Mo-CBP3* expression at 48 hours, showing a 2.73% increase compared to the control. Overall, these results indicate that ZnO and CuO nanoparticles act as effective elicitors for enhancing the expression of the antifungal *Mo-CBP3* gene, with the most pronounced effect observed 48 hours after treatment.

Key words: Green synthesis, Medicinal plants, Scanning Electron Microscopy, Nano elicitor, Real Time PCR

چکیده

رفرنس دهی این مقاله Citation

Ganjali S, Khajeh H, Mazarei A, Kamaladini H, Ahmadi H. (2025). Green synthesis of ZnO and CuO nanoparticles using extract of moringa and Evaluation of their effects on *Mo-CBP3* gene expression. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (1): 60-76. Doi: [10.61882/gebsj.14.1.5](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.1.5)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-511-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 14, Number 1, 2025

خلاصه

استفاده از عصاره گیاهان در فیتوسنتز نانوذرات، به عنوان یک روش سازگار با محیط زیست بوده که در آن از حلال‌های طبیعی استفاده می‌شود و به دلیل افزایش میزان تولید و کاهش هزینه، زمان و انرژی می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب ممکن، برای روش‌های مرسوم مانند روش‌های فیزیکی و شیمیایی استفاده شود زیرا در روش‌های مرسوم سنتز نانو ذرات معمولاً گران قیمت هستند و به دما و فشار بالا نیاز دارند و در عین حال به دلیل تولید مواد شیمیایی سمی برای محیط زیست و موجودات زنده سمی و خطرناک می‌باشند. از این رو هدف از این تحقیق سنتز سبز نانو ذرات اکسید روی و مس با استفاده از عصاره گیاه مورینگا و ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف آن‌ها (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ ppm) در دو بازه زمانی (۴۸ و ۷۲ ساعت پس از محلولپاشی) بر سطح بیان نسبی ژن *Mo-CBP3* در گیاه مورینگا بود. بررسی ساختار نانو ذرات اکسیدروی و مس با تکنیک میکروسکوپ الکترونی روبشی و پراکنش انرژی اشعه ایکس نشان داد که شکل نانو ذرات سنتز شده کروی و اندازه ذرات آن‌ها به ترتیب ۳۷-۲۵ و ۳۶-۳۲ نانومتر بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اعمال نانو الیستورهای اکسید روی و مس باعث تغییر در الگوی بیان ژن *Mo-CBP3* شد و بیشترین میزان سطح بیان نسبی (۱/۵۱)، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار با ۱۵۰ ppm اکسید روی مشاهده شد که نسبت به سطح شاهد افزایشی ۶/۶۷ درصد نشان داد و با افزایش غلظت نانو اکسید روی در بازه زمانی ۷۲ ساعت کاهش قابل توجهی در بیان ژن مورد مطالعه مشاهده شد؛ اما تیمار با غلظت ۱۰۰ ppm نانو ذرات اکسید مس در بازه زمانی ۴۸ ساعت بیشترین میزان سطح بیان نسبی ژن *Mo-CBP3* با میانگین ۱/۵۰۴ را سبب شد که افزایشی ۵۵/۶ درصدی نسبت به سطح شاهد داشت. در تیمار اثرات متقابل مشاهده شد که کاربرد توام نانو ذرات اکسید مس و روی سبب افزایش سطح بیان نسبی ژن نسبت به شاهد شد به طوری که طی اعمال غلظت ۱۵۰ ppm اکسید روی و ۱۰۰ ppm اکسید مس در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بیشترین میزان سطح بیان نسبی ژن مشاهده شد نسبت به سطح شاهد افزایشی ۷۳/۲ درصد نشان داد. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که نانو الیستورهای اکسید روی و مس در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار تأثیر مثبت بر بیان ژن *Mo-CBP3* داشت و نانوذرات سنتز شده می‌توانند به عنوان نانوالیستورهای مؤثر برای افزایش بیان ژن ضدقارچی *Mo-CBP3* مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: سنتز سبز، گیاهان دارویی، میکروسکوپ الکترونی روبشی، نانو الیستور، Real Time PCR

مقدمه

Introduction

یکی از مهمترین روش‌های کنترل قارچ و بیماری‌های گیاهی، استفاده از ترکیبات شیمیایی سنتزی می‌باشد (Farahani et al., 2018)؛ اما استفاده بیش از حد این قبیل مواد شیمیایی و عدم رعایت اصول به کار گیری از این ترکیبات از یک طرف منجر به بروز پدیده‌ی مقاومت در آفات و امراض نسبت به این ترکیبات شده و از طرف دیگر، موجب بروز آلودگی‌های زیست محیطی و مسمومیت موجودات غیر هدف گردیده است (Gujar et al., 2012; Othman et al., 2019). بنابراین، یافتن روش‌های جایگزین این ترکیبات که ضمن دارا بودن کارایی مطلوب در کنترل عوامل زنده‌ی خسارت‌زا، برای محیط زیست و موجودات غیر هدف از جمله انسان، دام و دشمنان طبیعی ایمن باشند بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Meela et al., 2019). از این رو تحقیقات گسترده‌ای جهت جایگزینی روش‌های جدیدتر به منظور مبارزه با عوامل بیماری‌زای مقاوم به قارچ کش‌ها در سراسر دنیا انجام می‌شود؛ مطالعات انجام شده نشان داده است که برخی از گیاهان دارویی از طریق تولید متابولیت‌های ثانویه، مکانیسم‌های دفاع شیمیایی در برابر آفات و بیماری‌ها دارند (Madariaga-Mazón et al., 2019; Hernández-Ceja et al., 2021) که برخلاف متابولیت‌های اولیه نظیر کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و غیره به خودی خود در

مراحل مختلف رشد گیاه تأثیر ندارند، بلکه در دفاع از گیاهان در برابر گیاهخواران و بیمارگرها مؤثر می‌باشند (Ramírez-Gómez *et al.*, 2019; Deresa and Diriba, 2023).

مورینگا با نام علمی *Moringa oleifera* به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از این متابولیت‌ها، از زمان‌های بسیار قدیم مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Abdallah *et al.*, 2023; Falowo *et al.*, 2017). این گیاه به وفور در مناطق استوایی و نیمه گرمسیری یافت می‌شود و بومی مناطق هند، پاکستان، بنگلادش، افغانستان و مالایا می‌باشد (Gopalakrishnan *et al.*, 2016; Minaiyan *et al.*, 2014). تمام قسمت‌های این درخت از جمله برگ، غلاف، دانه، ریشه و ... قابل خوردن و دارای خواص دارویی چون ضد التهاب، تب بر، ضد سرطان، آنتی اکسیدان، نوتروپیک، محافظ کبد، محافظ گوارش، ضد زخم، قلب و عروق، ضد چاقی، ضد میکروبی و تعدیل کننده ایمنی از جمله اثرات فارماکولوژیک مطالعات شده بر روی این گیاه می‌باشد (Hannan *et al.*, 2014; Dhakad *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2022) که تمامی این اثرات را به وجود ترکیبات فعال زیستی مانند اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، فیتواسترول‌ها، قندهای طبیعی، ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای آلی نسبت داده‌اند (Promkum *et al.*, 2010; Mbikay, 2012; Kou *et al.*, 2018). تمام قسمت‌های درخت مورینگا دارای خواص دارویی هستند که عمدتاً برای اهداف دارویی استفاده می‌شوند اما برگ‌های آن با غنای استثنایی از ترکیبات گیاهی فعال بیولوژیکی مفیدترین قسمت آن می‌باشد (Mahdi *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2014) که براساس مطالعات گذشته عصاره برگ‌های مورینگا الیفا همچنین حاوی تانن‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و گلیکوزیدها می‌باشد که به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دارای خواصی چون خاصیت ضد سرطانی، ضد میکروبی، ضد قارچی و غیره است (Raafat and Hdaib, 2017; Jaiswal *et al.*, 2013).

اخیراً، یک پروتئین جدید متصل به کیتین (*CBP*) از *M. oleifera* خالص‌سازی و به *Mo-CBP3* نامگذاری شده است (Gifoni *et al.*, 2013; Freire *et al.*, 2019). پروتئین‌های متصل شونده به کیتین (*CBPs*) نشان‌دهنده گروهی از پروتئین‌ها گیاهی هستند که اغلب دارای جرم مولکولی از ۳.۱ کیلو دالتون تا ۲۰ کیلو دالتون و مقاومت بالا در برابر تغییرات شدید pH و پروتئولیز هستند. برخی از *CBP* ها توانایی مهار رشد قارچ را دارند (Batista *et al.*, 2014) زیرا به کیتین، یک جزء کلیدی دیواره سلولی قارچ، متصل شده و عملکرد مناسب آن را مختل می‌کنند و پیشنهاد شده است که اتصال این پروتئین‌ها به کیتین در قارچ‌های رشته ای منجر به اختلال در بیوژنز دیواره سلولی و قطبیت سلولی می‌شود (Yao *et al.*, 2010). *Mo-CBP3* یک پروتئین ضد قارچی مقاوم در برابر حرارت ۱۴ کیلو دالتون است که از جوانه زنی هاگ و رشد میسلیم *Fusarium solani* و سایر قارچ‌ها از جمله *Colletotrichum musae* و *Colletotrichum* *gloeosporioides* جلوگیری می‌کند این پروتئین ممکن است در توسعه داروهای ضد قارچی جدید یا محصولات تراریخته با افزایش مقاومت در برابر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مفید باشد (Freire *et al.*, 2015). اگرچه مکانیسم اثر *Mo-CBP3* و بسیاری دیگر از پروتئین‌های متصل به کیتین به طور کامل شناخته نشده است، ولی فعالیت ضد قارچی این *CBPs* احتمالاً نتیجه اتصال پروتئین به کیتین دیواره سلولی قارچی نوپا باشد (Freire *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2014). بعبارتی مکانیسم احتمالی اثر ضد قارچی پروتئین *Mo-CBP3* به توانایی آن در اتصال به کیتین تازه سنتز شده دیواره سلولی قارچ بازمی‌گردد. اتصال *Mo-CBP3* به کیتین سبب اختلال در سازمان‌دهی شبکه ساختاری دیواره می‌شود و مقاومت مکانیکی سلول را کاهش می‌دهد (Langner and Göhre, 2016). این اختلال می‌تواند جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیم را مهار کرده و فشار اسمزی و یکپارچگی سلول قارچ و دیواره سلولی آن را به مخاطره اندازد که اختلال در دیواره سلولی ممکن است موجب ایجاد استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود که آسیب به غشا و سیتوپلاسم سلول را تشدید می‌کند (Freire *et al.*, 2014). با وجود اینکه شواهد مستقیم برای دخالت *Mo-CBP3* در بیوسنتز دیواره سلولی محدود است، فرض می‌شود که این پروتئین با اتصال به کیتین تازه سنتز شده، فرآیند بیوژنز دیواره را مختل کرده و باعث ضعف دیواره و مرگ سلولی می‌شود. ویژگی‌های منحصر به فرد *Mo-CBP3* شامل پایداری در برابر حرارت و فعالیت قوی در غلظت‌های پایین، آن را به نامزد امیدوارکننده‌ای برای توسعه داروهای ضدقارچی و محصولات تراریخته مقاوم به قارچ تبدیل کرده است (Freire *et al.*, 2014; Langner and Göhre, 2016).

یکی از راه‌های تغییر در بیان ژن‌های گیاهی، استفاده از الیستورها است. الیستورها ترکیب‌هایی با منشأ زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث تغییرات بیانی می‌شوند (Rahimi Sherbaf Moghadas *et al.*, 2021; Banerjee *et al.*, 2019). از جمله الیستورهایی که امروزه تمایل به استفاده از آنها افزایش یافته است، نانوالیستورها هستند. نانو الیستورها شامل ذرات فلزی و اکسیدی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشند (Lv *et al.*, 2020; Moghadami *et al.*, 2023) که با سطح ویژه بالا و واکنش‌پذیری سطحی بالا نه تنها از طریق تماس فیزیکی جذب می‌شوند بلکه می‌توانند با پروتئین‌های زیستی میانکنش دهند و حتی توسط سلول جذب گردند (Banerjee *et al.*, 2019).

نانوذرات، به دلیل اندازه نانومتری و سطح ویژه بالا، می‌توانند به عنوان الیستورهای دفاعی گیاهان عمل کنند؛ مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تماس گیاه با نانوذرات می‌تواند تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تحریک کند، که این ROS ها به‌عنوان سیگنال‌های ثانویه موجب فعال‌سازی مسیرهای دفاعی گیاه و بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت می‌شوند (Lala, 2021). افزون بر این، نانوذرات قادرند مسیرهای هورمونی - دفاعی مانند مسیرهای مرتبط با سیگنالینگ اسید سالیسیلیک یا JA/H₂O₂ را فعال کنند؛ این مسیرها می‌توانند باعث افزایش بیان آنزیم‌های دفاعی مثل کیتینازها، پروتئینازها و پلی‌فنول اکسیدازها شوند، که نقش مهمی در تقویت دیواره سلولی و مهار پاتوژن‌ها دارند (Tripathi *et al.*, 201). در برخی مطالعات گزارش شده که نانوذرات نه تنها پاسخ دفاعی گیاه را القا می‌کنند، بلکه اثر مهاری مستقیم بر رشد پاتوژن‌ها نیز دارند؛ و می‌توانند یک اثر دوگانه ایجاد کنند که هم از طریق فعال‌سازی سیستم ایمنی گیاه و هم از طریق اثر مستقیم ضدپاتوژن، مقاومت را افزایش می‌دهد؛ از این رو، نانوذرات به‌عنوان القاکننده‌های دفاعی، پتانسیل بالایی برای استفاده در استراتژی‌های مدیریت بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دارند (Tripathi *et al.*, 201).

مطالعات مختلفی در مورد تاثیر نانو ذرات بر روی بیان ژن‌های گیاهی انجام شده است از جمله می‌توان به نتایج Vahedi و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی اثر تیمارهای کیتوزان و نانو ذرات نقره بر بیان ژن بتا آمیرین سنتاز در گیاه زنبان (جمعیت سیستان و پاکستان) اشاره داشت که اظهار کردند الیستور نانوذرات نقره همراه با کیتوزان در زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار تأثیر مثبت بر بیان ژن بتا آمیرین سنتاز داشته و میزان افزایش بیان ژن در این حالت در جمعیت پاکستان نسبت به سیستان بیشتر بود و یا تحقیق Rahimi Sherbaf Moghadas و همکاران (۲۰۲۱) که اثر نانو نانولوله‌های کربنی، نانو ذرات نقره سبز و شیمیایی را بر بیان برخی ژن‌های گیاه شقایق شرقی بررسی نمودند و نتایج نشان داد تحت تأثیر این الیستورها، بیان نسبی ژن‌ها به شدت تغییر کرد، به طوریکه در هر دو ژن *COR* و *DBOX* بیشترین میزان بیان نسبی در ۴۸ ساعت پس از تیمار گرافن با پوشش نانوذره نقره شیمیایی، به ترتیب ۵۷/۹۶ و ۸/۳۴ به دست آمد و بیشترین بیان نسبی ژن *ODM6T* مربوط به تیمار الیستور ترکیبی گرافن به همراه نانوذره نقره سبز، به میزان ۴۵/۷۷ برابر بود. همچنین Babaei و همکاران (۲۰۱۸) که اثر الیستور کیتوزان و نانو ذرات نقره بر بیان ژن *Hyp-I* در گل راعی را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش شد که نانو ذرات نقره اثر منفی بر بیان ژن *Hyp-I* داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره بیان ژن *Hyp-I* کم شده اما کیتوزان اثر مثبتی بر بیان ژن *Hyp-I* داشته ولی با افزایش غلظت تا سطح ۲۰۰ ppm نیز از میزان بیان ژن کاسته شد.

روش‌های متداول سنتز نانوذرات نظیر فرآیند سل-ژل، ته‌نشینی شیمیایی، روش هیدروترمال، سنتز به کمک مایکروویو و رسوب بخار شیمیایی، اگرچه امکان تولید نانوذرات با ویژگی‌های کنترل‌شده را فراهم می‌کنند، اما اغلب مستلزم استفاده از معرف‌های شیمیایی خطرناک، دما و فشار بالا و شرایط عملیاتی پیچیده هستند که می‌توانند منجر به اثرات نامطلوب زیست‌محیطی شوند. در نتیجه، توسعه روش‌هایی سازگار با محیط زیست برای سنتز مواد نانو به یک ضرورت علمی و صنعتی تبدیل شده است (Naghavi *et al.*, 2024). در این راستا، روش‌های سنتز زیستی با بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌ها و به‌ویژه گیاهان یا عصاره‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین‌هایی ایمن، پایدار و دوستدار محیط زیست معرفی شده‌اند. این روش‌ها با فراهم کردن شرایط واکنشی ملایم و سینتیک واکنش کندتر، امکان کنترل بهتر بر فرآیند جوانه‌زنی و رشد کریستال‌ها، اندازه، مورفولوژی و پایداری نانوذرات را فراهم می‌سازند. علاوه بر این، سنتز زیستی نانوذرات مسیر مناسبی

برای بهبود قابلیت تکرارپذیری و کاهش هزینه‌های تولید ارائه می‌دهد (Geletaw and Dejene, 2023). مزایای یادشده موجب افزایش قابل توجه تحقیقات در زمینه مسیرهای سنتز سبز شده است، به گونه‌ای که این رویکرد امکان طراحی و تولید نانوذرات با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی قابل کنترل را برای کاربردهای متنوع در حوزه‌های مختلف فناوری نانو فراهم می‌سازد (Radwan et al., 2021). گیاه مورینگا غنی از مواد معدنی، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و به عبارتی منبع غنی از فیتوکیمیکال‌ها می‌باشد که موجب تمایز این درخت و مطرح شدنش در جوامع علمی شده است (Patil et al., 2022). پروفایل فیتوشیمیایی زیست‌فعال *M. oleifera* شامل ترکیباتی مانند کینین، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئیدها، گلیکوزیدها، نیازبین‌ها، نیازیمین‌ها و بسیاری ترکیبات دیگر است (Patil et al., 2022)؛ این تنوع گسترده متابولیت‌های ثانویه توجه زیادی را به *M. oleifera* به عنوان یک ابزار سبز برای سنتز انواع نانوذرات دارای فعالیت‌های زیستی جلب کرده است (Paikra et al., 2017) در برخی مطالعات به طور تجربی نشان داده شده است که متابولیت‌های ثانویه *M. oleifera* می‌توانند سنتز نانوذرات با فعالیت‌های چشمگیر را میانجی‌گری کنند (Perumalsamy et al., 2024). به عنوان نمونه، فلاونوئیدها، فنولیک‌ها، پلی‌ساکاریدها و تریپنوئیدهای موجود در برگ‌ها، گل‌ها، ساقه، پوست و غلاف گیاه به عنوان عوامل کلیدی در سنتز نانوذرات متنوع با اندازه‌ها و شکل‌های مختلف شناخته شده‌اند (Espenti et al., 2020; Das et al., 2020). از این رو باتوجه به اهمیت روش‌های سنتز سازگار نانو ذرات با محیط زیست و غنای بالای فیتوکیمیکال‌های گیاه مورینگا، هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذرات اکسید روی و مس با استفاده از عصاره گیاه مورینگا و بررسی اثر غلظت‌های مختلف آن‌ها در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان بیان ژن *Mo-CBP3* در گیاه مورینگا است.

مواد و روش‌ها

Materials and Methods

جمع آوری و تهیه عصاره گیاه مورینگا: در ابتدا اندام‌های هوایی گیاه مورینگا (جمع‌آوری از شهرستان سراوان استان سیستان و بلوچستان) با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند سپس در دمای اتاق قرار گرفته تا خشک شوند و پس از پودر کردن آن‌ها، ۵ گرم پودر آماده شده با ۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه مخلوط شد و به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای جوش روی هیتز قرار گرفت و بعد از سرد شدن با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد و عصاره آبی حاصل برای آزمایشات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنتز سبز نانوذرات اکسید مس: ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر از محلول سولفات مس (خلوص ۹۹ درصد. شرکت مرک آلمان) بدون آب در ارلن شیشه‌ای کوچک ریخته، سپس آن را روی هیتز با همزن مغناطیسی به دمای ۱۲۰-۱۰۰ سانتیگراد رسانده و سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاه مورینگا قطره قطره با بورت به آن اضافه می‌شود. در ابتدا رنگ محلول از آبی به سبز تغییر می‌یابد اما بعد از همزدن مداوم طی مدت زمان ۲۴ ساعت رنگ محلول به قرمز آجری تبدیل می‌شود. سپس روی ارلن ۲۴ ساعت درپوش آلومینیومی گذاشته تا سنتز نانو ذرات به خوبی صورت گیرد. بعد از سنتز، محلول حاوی نانو ذرات را به مدت ۱۵ دقیقه سرعت ۵۵۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و پودر بدست آمده را در دمای ۹۰°C درجه به مدت ۲۴ ساعت در آن قرار می‌گیرد تا خشک شود (Ghahremani and Izanloo, 2020).

سنتز سبز نانوذرات اکسید روی: ابتدا به ۱۰۰ سی‌سی محلول استات روی (خلوص ۹۹ درصد-شرکت مرک آلمان) ۱۰ سی‌سی عصاره گیاه مورینگا اضافه و سپس محلول حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد روی همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود. سپس به محلول حاصله قطره قطره سود ۱ مولار اضافه می‌گردد تا زمانی که pH محلول به ۱۲ برسد. در مرحله بعد ذرات کلئیدی حاصل، سانتریفیوژ و رسوب به دست آمده خشک می‌شود (Behjati et al., 2020).

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و ساختاری نانو ذرات سنتز شده: از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل ((Scanning Electron Microscopy)، با ولتاژ ۲۵ kV و بزرگنمایی (x ۱۰۰۰۰۰) و پراکنش انرژی اشعه ایکس (EDAX) استفاده گردید.

کشت گیاه: پس از تهیه بذرها از شهرستان سراوان، به منظور جوانه زنی و تولید گیاهچه، بذرها در سینی‌های نشا کشت و پس از جوانی زنی، گیاهچه‌های همسان و هم اندازه مورینگا با ریشه مناسب و کیفیت مطلوب رشدی به گلدانهای پلاستیکی با بستر کشت، شامل ۱۰٪/ماسه، ۳۵ کوکوپیت، ۳۵٪ پرلیت و ۱۰٪ خاک مزرعه منتقل شدند. به منظور بررسی تاثیر سنتز سبز نانو ذرات اکسید روی و مس بر بیان ژن *MO-CBP3* در گیاه مورینگا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار در دانشگاه زابل در شرایط گلدانی در سال ۱۴۰۳ (۲۰۲۴ میلادی) انجام شد. فاکتور اول شامل محلولپاشی با نانو ذرات اکسید روی و مس سنتز سبز با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ پی‌پی‌ام و فاکتور دوم زمان (۴۸ و ۷۲ ساعته) بود که در مرحله ی ۴ برگی گیاهچه‌ها تیمارها اعمال شدند. نمونه‌ها در دو دور متوالی، ۴۸ و ۷۲ ساعته، برداشت و در داخل نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج RNA، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج RNA: گیاه مورینگا با استفاده از کیت Total RNA isolation شرکت دنازیست آسیا (Cat. No.: S-1010-50)، مطابق دستورالعمل کیت استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد بررسی شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومی *18srRNA* و *28srRNA* روی ژل نشان دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده بود. جهت از بین بردن DNA ژنومی از DNase شرکت پیشگام استفاده شد.

طراحی آغازگرها: در این مطالعه از آغازگرهای اختصاصی *MO-CBP3* به همراه ژن *18srRNA* استفاده شد. طراحی این آغازگرها بر اساس انتهای ۳' به کمک داده‌های موجود در پایگاه اینترنتی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و همچنین نرم افزار Primer 3 صورت گرفت. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است:

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش Real Time PCR در گیاه مورینگا

Table 1. The sequences of primers used in RT-PCR for Moringa			
Gene	primer	primer sequence	Annealing temperature (°C)
<i>18srRNA</i>	F	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'	60
	R	5'-AGGGGTCTGAAGCGGTAGAGG-3'	61
<i>MO-CBP3</i>	F	5'-CCCAGTGAAGGACACCGC-3'	59
	R	5'-CCCAGTGAAGGACACCGC-3'	58

سنتز cDNA و بررسی بیان نسبی ژن *MO-CBP3*: ابتدا با استفاده از RNA استخراج شده یک تست PCR با پرایمر انجام شد تا اطمینان حاصل شود هیچ خرده DNA باقی نمانده است. سپس اقدام به سنتز cDNA شد. مراحل ساخت cDNA با استفاده از کیت Geneall (GeneAll Biotechnology (South Korea), Cat. No. 601-005: First-Strand cDNA Synthesis Kit)، شرکت پیشگام انجام گرفت. پس از سنتز cDNA بیان ژن‌ها با روش Real Time PCR و با دستگاه Real Time PCR set Corbett (3000) با استفاده از کیت EvaGreen (جدول ۲) انجام شد. بدین ترتیب که cDNAهای ساخته شده با استفاده از دستگاه Real Time PCR و با شرایط تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۱۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه به صورت واسرشت سازی ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (مناسب برای جفت آغازگر مورد نظر) و طولی سازی ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد و در نهایت طولی سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت:

جدول ۲- میزان و مواد لازم جهت انجام Real Time PCR

Table 2. The amount and materials required for Real Time PCR

Materials	Amount
cDNA	1 μ l
Eva Green Master X5	4 μ l
Primer Forward 10uM	0.5 μ l
Primer Reverse 10uM	0.5 μ l
PCR-grade water	14 μ l

جهت تجزیه و تحلیل نسبت بیان ژن هدف (*MO-CBP3*) در مقایسه با ژن کنترل *18srRNA* برای تمام تیمارها از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. نرخ بیان هر ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ (۴۵) محاسبه شد:

$$\Delta\Delta CT = (\Delta CT - \text{نمونه آزمایشی}) - (\Delta CT - \text{کنترل})$$

$$= (\Delta CT - \text{ژن خانه دار } \Delta CT - \text{ژن هدف})$$

برای هر نمونه سه تکرار برای ژن اختصاصی و سه تکرار برای ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل نتایج با شروع واکنش منحنی تکثیر رسم شده توسط دستگاه آغاز می شود و برای تجزیه داده ها از روش ΔCT استفاده شد. در این روش بین CT های ژن کنترل داخلی و ژن مورد نظر تفاوت وجود دارد. بنابراین این تفاوت را در CT های ژن مورد نظر و ژن کنترل، اعمال کردیم و داده ها که همان CT ها هستند را نرمال نمودیم. برای نرمال کردن داده ها CT ژن مورد بررسی را در تک تک نمونه ها از CT ژن کنترل داخلی همان نمونه تفریق کردیم. از آنجایی که داده های نرمال برای هر نمونه از تفریق CT ژن مورد نظر از CT ژن کنترل داخلی به دست آمده است داده نرمال شده را ΔCT می نامیم

$$\Delta CT = CT - (\text{ژن مورد نظر}) - CT - (\text{ژن کنترل داخلی})$$

ΔCT از نوع لگاریتمی بر پایه ۲ می باشد (زیرا در time real هر سیکل محصول ما ۲ برابر می شود) بنابراین باید ΔCT ها را به جای تقسیم کردن از هم تفریق نمود. پارامتر جدید را که از تفریق ΔCT نمونه مورد نظر از ΔCT نمونه شاهد به دست آمده است $\Delta\Delta CT$ می نامیم:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT - (\text{ژن مورد نظر}) - \Delta CT - (\text{ژن کنترل داخلی})$$

CT ، ΔCT و $\Delta\Delta CT$ بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ هستند بنابراین آنها را به حالت خطی در آورده ایم، پس $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ بیانگر سطح بیان نسبی ژن بود.

$$\text{The Relative gene expression (RGE)} = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

در نهایت داده های حاصله با استفاده از نرم افزار اماری SAS 9.1 مورد تجزیه قرار گرفت و مقایسه میانگین داده ها نیز در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ارزیابی شد و همچنین برای رسم شکل ها و نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

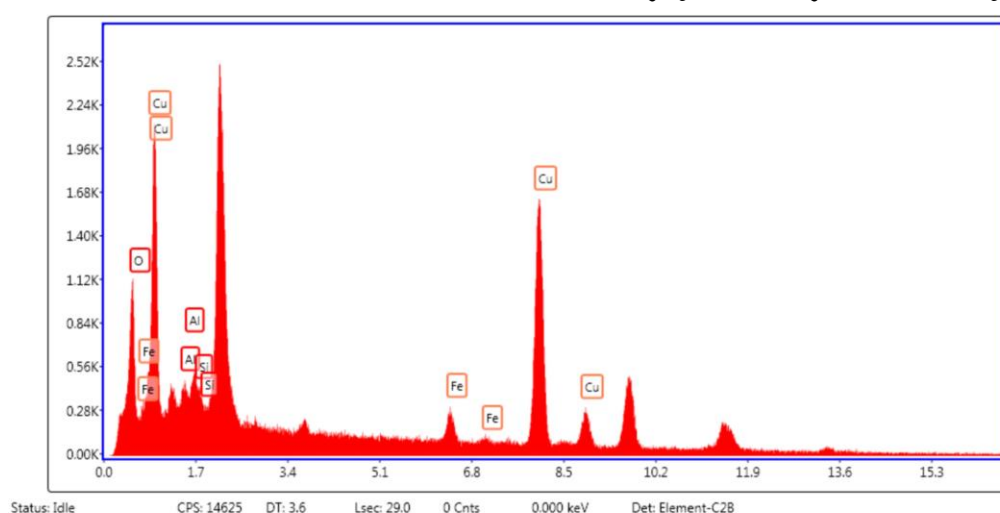
Results and Discussion

مطالعه تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

شناسایی مواد با استفاده از آنالیز EDAX (Energy Dispersive X-Ray Analysis)

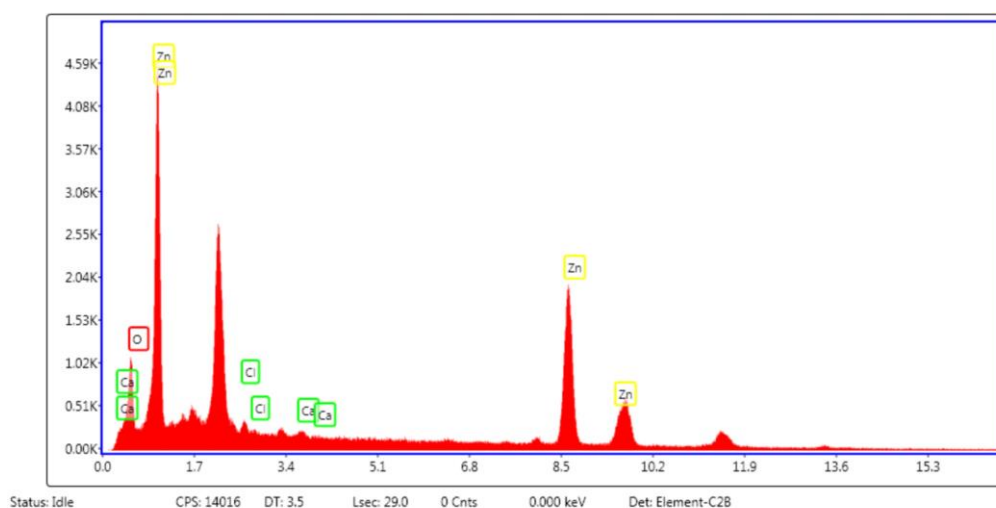
در بررسی نانو ساختارهای مغناطیسی روی و مس توسط پراکنش انرژی اشعه ایکس (EDAX) حضور عنصر روی و مس به خوبی مشاهده شد (شکل ۱ و ۲) که نشان دهنده تشکیل نانوذرات مورد نظر هستند، علاوه بر روی و مس، عناصری مانند Al، Si، Fe، O، Cl، Ca، Cu و Zn در طیف مشاهده شد. مطالعات متعدد نشان داده اند که طیف های EDAX نانوذرات سنتز شده با عصاره گیاهی، نه تنها پیک های مربوط به فلز

هدف، بلکه پیک‌های جزئی عناصر آلی/معدنی را نیز شامل می‌شوند که معمولاً از ترکیبات عصاره و مولکول‌های آلی جذب‌شده روی سطح نانوذرات ناشی می‌شوند (Assad *et al.*, 2025)؛ عبارتی منشأ این عناصر می‌تواند چندگانه باشد. چون گیاهان به‌طور طبیعی حاوی عناصر کم‌مقدار معدنی و ترکیبات آلی نظیر پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و پروتئین‌ها هستند که در سنتز سبز نانوذرات می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهنده و پایدارکننده عمل کنند (Alharbi *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023) از این رو بخش قابل توجهی از این عناصر احتمالاً ناشی از ترکیبات معدنی و زیستی موجود در عصاره گیاه مورینگا است. همچنین، حضور عنصر اکسیژن در طیف EDAX می‌تواند به تشکیل فازهای اکسیدی مس و روی در طول فرآیند حرارتی و خشک‌سازی نمونه مربوط باشد. برخی عناصر دیگر مانند Si و Al ممکن است ناشی از آلودگی‌های جزئی ظروف شیشه‌ای یا بستر نمونه در هنگام آماده‌سازی و آنالیز باشند، و عنصر Cl می‌تواند به باقی‌مانده نمک‌های محلول یا مواد شیمیایی مورد استفاده در سنتز و شست‌وشو مرتبط باشد (Assad *et al.*, 2025).



شکل ۱- تجزیه XRD نانو ذرات سنتز شده اکسید مس با استفاده از عصاره گیاه مورینگا

Fig 1. XRD analysis of synthesized copper oxide nanoparticles using Moringa extract



شکل ۲- تجزیه XRD نانو ذرات سنتز شده اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه مورینگا

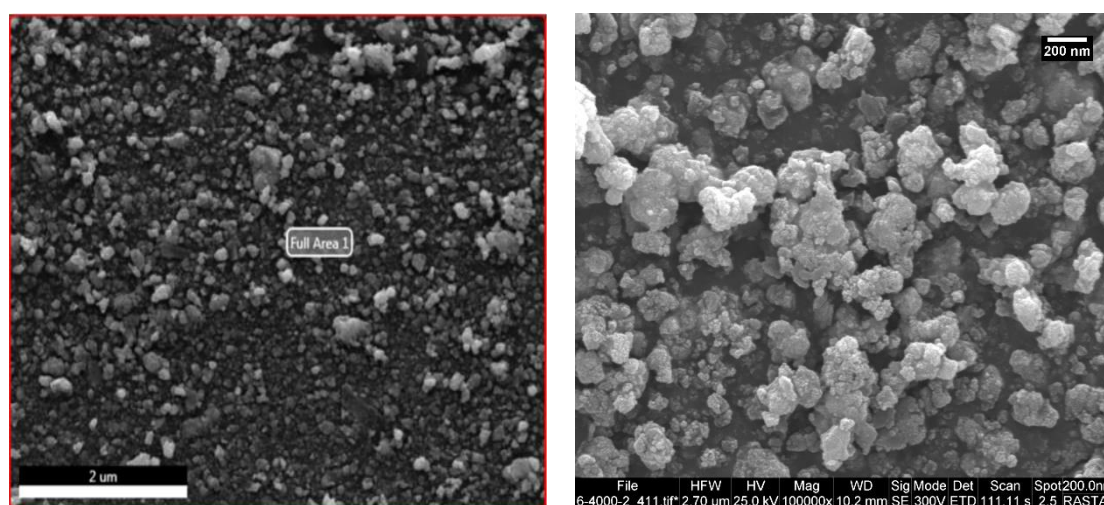
Fig 2. XRD analysis of synthesized copper oxide nanoparticles using Moringa extract

بنابراین، مشاهده عناصر فرعی در EDAX که شدت بسیار پایین‌تری نسبت به عناصر مورد هدف دارند، می‌تواند هم به جایگاه سطحی ترکیبات عصاره مورینگا (پایدارکننده‌های طبیعی) و هم به آلودگی‌های جزئی از محیط یا مواد مصرفی در آماده‌سازی نمونه مرتبط باشد و از طرفی این عناصر فرعی در بسیاری از گزارش‌های سنتز سبز نانوذرات مشاهده شده و به‌عنوان ترکیبات جانبی ناشی از عصاره گیاهی یا پوشش آلی تایید شده‌اند (Naiel et al., 2022; Kaur et al., 2025).

بررسی ساختاری نانوذرات اکسید روی و مس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

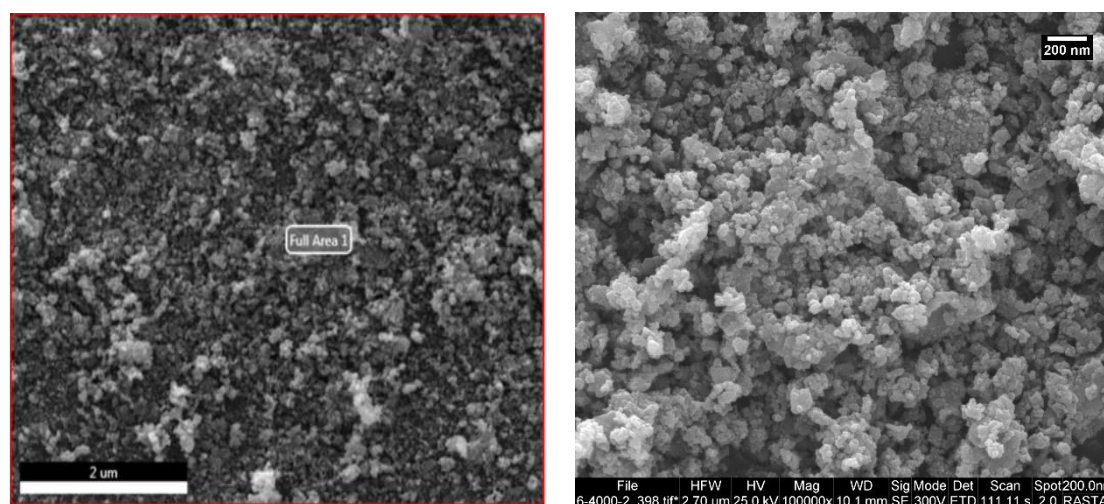
یکی از روش‌های ویژگی‌یابی نانوذرات فلزی، استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی است که به کمک آن می‌توان شکل و اندازه نانو ذرات سنتز شده را مشخص کرد. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی به دست آمده از نانوذرات فلزی روی و مس تحت شرایط بهینه ذکر شده، نشان از سنتز نانو مواد کروی شکل می‌باشد. اندازه ذرات تولید شده اکسید روی و مس به ترتیب در دامنه ۲۵-۳۷ و ۳۲-۳۶ نانومتر بودند (شکل ۳ و ۴). از لحاظ مرفولوژی (ریخت شناسی) نانوذرات به اشکال هندسی همشکل و متبلور مشاهده شدند. همچنین با توجه به این که مدت زمان انتظار برای آنالیز زیاد بوده است نانوذرات مغناطیسی روی و مس حاوی عصاره مورینگا تا حدودی کلوخه‌ای (آگلومره) شده‌اند.

آگلومره شدن نانوذرات در تصاویر SEM یک پدیده رایج و شناخته‌شده است که ناشی از ترکیبی از عوامل فیزیکی و شیمیایی است. آگلومره شدن نانوذرات در تصاویر SEM یک پدیده رایج و شناخته‌شده است که ناشی از تعامل همزمان چند عامل فیزیکی و شیمیایی است. یکی از مهم‌ترین عوامل، نیروهای میان‌ذره‌ای مانند واندروالس و چسبندگی سطحی است؛ به دلیل نسبت بالای سطح به حجم در نانوذرات، این نیروها نقش غالب پیدا می‌کنند و ذرات تمایل دارند به یکدیگر جذب شده و خوشه تشکیل دهند، به‌ویژه زمانی که سطح ذرات فاقد پوشش پایدارکننده باشد (Kister et al., 2018). علاوه بر این، فرآیند خشک شدن نمونه پیش از SEM باعث کاهش فاصله بین ذرات و افزایش غلظت آن‌ها در محلول می‌شود، که این امر نیروهای جاذبه میان ذرات را تقویت و تشکیل آگلومره‌ها را تسهیل می‌کند، حتی اگر ذرات ابتدا در محلول به خوبی پراکنده بوده باشند (Michen et al., 2015). عامل سوم، پایداری کلوئیدی و بار سطحی ذرات است؛ کاهش بار سطحی یا تغییر pH موجب غلبه نیروهای جاذبه مانند واندروالس بر دافعه الکترواستاتیک شده و تجمع ذرات و تشکیل آگلومره‌ها را تشدید می‌کند (Moore et al., 2015). از این رو براساس موارد بیان شده احتمالاً آگلومره شدن نانوذرات در SEM نتیجه‌ی تعامل پیچیده‌ی نیروهای میان‌ذره‌ای، شرایط آماده‌سازی نمونه و وضعیت الکتریکی سطح ذرات است.



شکل ۳- تصویر SEM نانو ذرات سنتز شده اکسید مس با استفاده از عصاره گیاه مورینگا

Fig 3. SEM image of copper oxide nanoparticles synthesized using Moringa plant extract



شکل ۴- تصویر SEM ذرات سنتز شده اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه مورینگا

Fig 4. SEM image of copper oxide nanoparticles synthesized using Moringa plant extract

همان‌گونه که نتایج ساختاری نشان داد، اندازه ذرات CuO و ZnO به ترتیب حدود ۲۵–۳۷ نانومتر و ۳۲–۳۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. این اختلاف نسبی در اندازه ذرات نه تنها نشان‌دهنده تفاوت در مشخصات فیزیکوشیمیایی آن‌هاست، بلکه می‌تواند به‌طور مستقیم بر رفتار و پاسخ‌های بیولوژیکی گیاهان اثر بگذارد. گزارش شده است که اندازه نانوذرات یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر جذب، توزیع و اثرات بیولوژیک در گیاهان است؛ به‌گونه‌ای که ذرات کوچک‌تر به‌علت سطح ویژه بیشتر، نه تنها زیست‌توزیع و نفوذ بهتر به بافت‌های گیاهی را نشان می‌دهند، بلکه واکنش‌پذیری سطحی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را نیز افزایش می‌دهند، که این پدیده با افزایش سمیت و استرس اکسیداتیو در گیاهان ارتباط داده شده است (Zong *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2024). برای مثال، در مطالعه‌ای گزارش شده که کاهش اندازه ذرات ZnO منجر به افزایش تجمع در ریشه و پیامدهای فیزیولوژیک منفی شد، که نشان‌دهنده حساسیت بالاتر ذرات ریز نسبت به ذرات بزرگ‌تر در سیستم‌های گیاهی است (Kim *et al.*, 2024). به‌طور مشابه، در مورد نانوذرات CuO نیز مشاهده شده که اندازه ذرات می‌تواند توزیع و انتقال عناصر غذایی و میزان آسیب اکسیداتیو را تحت تأثیر قرار دهد (Zong *et al.*, 2022). این تفاوت اندازه ذرات احتمالاً باعث تغییر در نرخ حل‌شدن یون‌ها، نفوذ به بافت‌های گیاهی، تعامل با دیواره سلولی، و القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌شود. ذرات با اندازه کوچک‌تر به دلیل نسبت سطح به حجم بالاتر، می‌توانند ROS بیشتری تولید کرده و سازوکارهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی را بیشتر فعال کنند، که این سازوکارها مستقیماً با استرس اکسیداتیو و تنظیم ژنتیکی پاسخ‌های گیاهی مرتبط هستند (Zong *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2024).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر نانو ذره روی، نانو ذرات مس، زمان، اثرات متقابل دوگانه و سه گانه بر بیان ژن MO-CBP3 در سطح احتمال یک درصد معنی دار شدند. اثر اصلی نانو ذرات روی و مس بر بیان نسبی ژن MO-CBP3 مؤثر و با افزایش غلظت نانو ذرات میزان بیان نسبی ژن مذکور نسبت به شاهد افزایش پیدا کرده و سیر صعودی داشته است به طوری که بیشترین میزان بیان نسبی ژن MO-CBP3 طی کاربرد نانوذره اکسید روی و مس به ترتیب در غلظت‌های ۱۵۰ و ۱۰۰ ppm مشاهده شد؛ از طرفی اثر زمان بر بیان ژن مورد بررسی معنی دار و مشخص شد که هر چه مدت زمان تماس تیمارهای نانو ذرات روی و مس با نمونه‌ها افزایش یافته از میزان بیان ژن مورد بررسی کاسته شده است به گونه‌ای که در بازه زمانی ۴۸ ساعت بیان ژن بیشتری نسبت به بازه زمانی ۷۲ ساعت مشاهده شد. نتایج اثر متقابل دوگانه نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات روی و مس، بیان نسبی ژن MO-CBP3 افزایش می‌یابد اما این افزایش معنادار فقط در بازه زمانی ۴۸ ساعته بوده و با گذشت زمان کاهشی شده است به طوری که بیشترین میزان بیان ژن طی کاربرد نانو ذره اکسید روی در غلظت ۱۵۰ ppm و بازه زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۵-A). همچنین طی کاربرد نانو ذره اکسید مس هم بیشترین میزان بیان در غلظت ۱۰۰ ppm و بازه زمانی ۴۸ حاصل شد (شکل ۵-B) در اثر متقابل سه گانه نیز همین امر صادق بوده و بیشترین میزان بیان نسبی ژن MO-

CBP3 در غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات اکسید مس و ۱۵۰ ppm نانوذره اکسید روی در بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بوده و با گذشت زمان میزان بیان ژن کمتر شده است (شکل ۶)

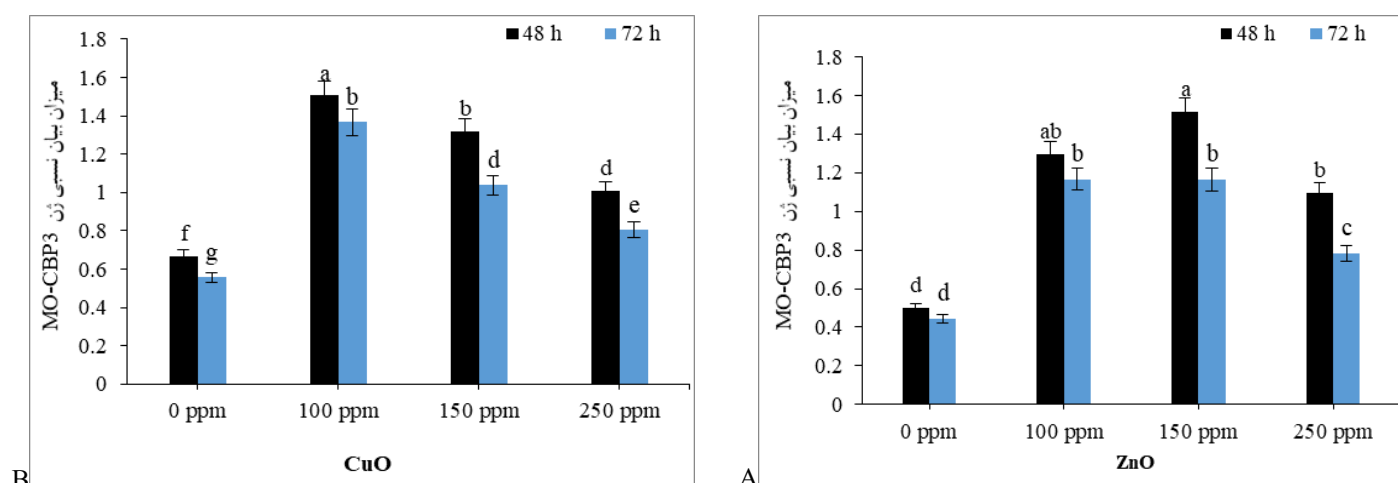
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نانو ذرات روی و مس بر بیان ژن نسبی *MO-CBP3* گیاه مورینگا در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت.

Table 3. Analysis of variance (mean squares) of the effects of zinc oxide and copper oxide nanoparticles on relative *MO-CBP3* gene expression in *Moringa* at 48 and 72 hours

S.O.V	Df	sum of squares	Squares Mean of	F
ZnO nano particle	3	4.91	1.63	265.63**
CuO nano particle	3	6.41	2.13	347.28**
Time	1	1.05	1.15	170.73**
Interaction between ZnO×CuO	9	1.64	0.18	29.69**
Interaction between ZnO×T	3	0.36	0.12	19.68**
Interaction between CuO×T	3	0.06	0.02	3.38**
Interaction between ZnO×CuO×T	9	0.27	0.03	4.97**
Error	64	0.39	0.006	
Total	95	15.12		

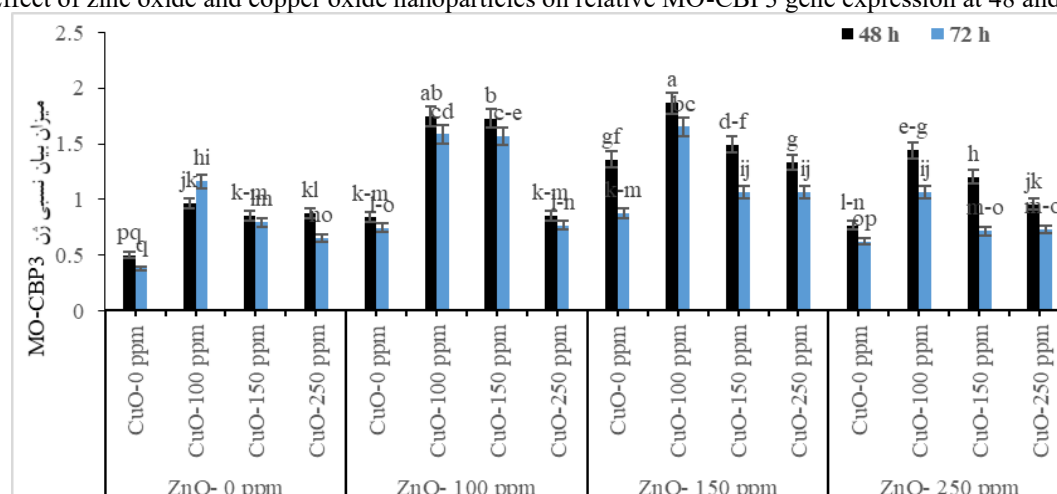
ns, * و **: به ترتیب عدم اختلاف معنی دار، اختلاف معنی دار در سطح ۰/۵ و ۱ درصد

ns, * and **: Non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively



شکل ۵- اثر نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس بر بیان نسبی ژن *MO-CBP3* در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت

Fig 5. Effect of zinc oxide and copper oxide nanoparticles on relative *MO-CBP3* gene expression at 48 and 72 hours



شکل ۶- اثر متقابل نانو ذرات اکسید مس و روی بر بیان نسبی ژن *MO-CBP3* در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت

Fig 6. Effect of interaction between CuO and ZnO nanoparticles on relative *MO-CBP3* gene expressions at 48 and 72 hours

تاکنون پژوهش‌های زیادی در رابطه با تأثیر الیستورها بر بیان ژن‌های مختلف گیاهی صورت گرفته است و مشخص شده است که نوع و غلظت الیستور نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و بر شدت پاسخ‌ها مؤثر است (Trontin et al., 2016; Mosa et al., 2018; Babajani et al., 2019). محققانی چون Jo'sko و همکاران (۲۰۲۱) و Rizwan و همکاران (۲۰۱۷) معتقدند که در مطالعات بیان ژن، خصوصیات نانو ذره، غلظت آن و بافت مورد استفاده بسیار حائز اهمیت‌اند، به دلیل این که اطلاعات زیادی از موارد استفاده ی نانو ذرات و اثرات آنها بر گیاهان در دسترس نیست، لذا تصمیم‌گیری در مورد عملکرد آنها در سلول‌های گیاهی نیازمند مطالعات بیشتری در این زمینه است. در تحقیق حاضر مشخص شد که با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی، میزان بیان ژن *MO-CBP3* بیشتر شده اما این روند افزایشی فقط تا بازه زمانی ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار بوده و با گذشت زمان، این سیر نزولی شده است.

در این تحقیق طی اعمال غلظت‌های مختلف نانو ذرات مشخص شد که غلظت ۱۵۰ ppm نانو ذره اکسید روی و ۱۰۰ ppm نانو اکسید مس غلظت‌های موثری تری هستند؛ غلظت مؤثر الیستور بر حسب گونه‌ی گیاهی متفاوت بوده به طوری که ممکن است غلظت بهینه الیستوری که در یک گیاه اثر تحریکی دارد، بر گیاهی دیگر اثر نداشته باشد؛ مثلاً در گیاه *Melissa officinalis* غلظت بهینه نانو ذرات اکسید روی غلظت ۳۰۰ ppm گزارش شده است (Babajani et al., 2019) در حالی که در گیاه *Datura stramonium* غلظت بهینه ۵۰۰ ppm بوده است (Vafaie et al., 2021).

به نظر می‌رسد علاوه بر غلظت الیستور، مدت زمان قرارگیری در معرض الیستور نیز بر بیان ژن مؤثر باشد (Trontin et al., 2016)، به دلیل این که میزان بیان ژن *MO-CBP3* در بازه ی ۴۸ ساعت بیش از بازه ی زمانی ۷۲ ساعت بود که این کاهش روند بیان ژن با یافته‌های مطالعه Babaei و همکاران (۲۰۱۸) و Vahedi و همکاران (۲۰۲۳) همراستا بود. در پژوهشی Rahimi Sherbaf Moghadas و همکاران (۲۰۲۱) طی بررسی بیان ژن‌های *COR*، *T6ODM* و *DBOX* در گیاه شقایق شرقی، بیشترین میزان بیان را در روز دوم (۴۸ ساعت) اعلام کردند و در روز سوم یعنی ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار، بیان ژن‌های مذکور کاهش یافت که این نتایج با کاهش بیان *MO-CBP3* مورینگا طی بازه‌ی زمانی ۷۲ ساعت در این تحقیق مطابقت دارد. در تحقیقی دیگر طی بررسی بیان ژن‌های *DAT*، *D4H* و *STR* در گیاه *Catharanthus roseus* توسط Rezaee و همکاران (۲۰۱۸) بیشترین میزان بیان، ۸ ساعت پس از اعمال تیمار نانو ذرات اکسید روی مشاهده شد و پس از ۲۴ ساعت بیان ژن‌های مذکور کاهش یافت. کاهش الگوی بیان یا تغییر الگو بیان در بازه زمانی طولانی احتمالاً نشان‌دهنده بروز استرس اکسیداتیو بیش‌ازحد، اختلال در تعادل فیزیولوژیک، یا تجمع نانوذرات در سلول است که طی قرار گرفتن طولانی مدت در معرض غلظت‌های بالای نانو ذرات فلزی و اکسیدی رخ میدهد که ممکن است با فعال کردن مکانیسم‌های بازدارنده بیان ژنی سبب اختلال در رونویسی، کاهش پایداری mRNA، یا سرکوب آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی شوند که این امر ممکن است متعاقباً کاهش بیان ژن‌ها را در بازه زمانی طولانی تر توجیه کند (Leopold et al., 2022).

در تحقیق حاضر مشخص شد که میزان بیان نسبی ژن *MO-CBP3* طی تیمار نانو ذرات اکسید مس و با افزایش غلظت آن نسبت به سطح شاهد روندی افزایش داشته اما با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض تیمار نانو ذرات اکسید مس، میزان نسبی بیان روندی کاهشی داشت. در تایید نتایج این مطالعه مبنی بر کاهش بیان نسبی ژن *MO-CBP3* طی افزایش مدت زمان تیمار در مطالعاتی تأثیر بازه‌های زمانی مختلف را طی اعمال نانوذرات اکسید مس بر ژن‌های *SOD* و *CAT* در گیاه سیب‌زمینی (Hernández-Hernández et al., 2018) و بیان ژن‌های *OsCVC2* و *OsCVC2* در ریشه گیاه برنج (Wang et al., 2015) بررسی و گزارش شد که ژن‌های مورد مطالعه بیشترین تغییرات بیانی را در ساعت‌های اولیه پس از تیمار با نانو الیستورها نشان داده و پس از گذشت زمان، بیان آنها به طور معنی داری کاهش یافته است.

در تحقیقی مشابه Da Costa و همکاران (۲۰۱۵) اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید مس را بر بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی *APX* و *SOD* بررسی و نتایج نشان داد که طی افزایش غلظت الیستور، میزان بیان نسبت به سطح شاهد افزایش می‌یابد که در تایید با نتایج این تحقیق می‌باشد. با افزایش غلظت نانوذرات، شدت استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های گیاهی افزایش

می‌یابد؛ ROS به عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه عمل کرده و موجب فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی دفاعی از جمله MAPK و مسیرهای وابسته به سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و اتیلن می‌شوند. در نتیجه، تحریک این مسیرها به صورت وابسته به دوز باعث افزایش رونویسی و بیان ژن‌های مرتبط با دفاع گیاه می‌گردد (Javed et al., 2024).

براساس نظرات Khodayari و همکاران (۲۰۱۴) و Khoshmodi و همکاران (۲۰۱۳) می‌توان از نانو الیستورها برای افزایش بیان ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی گیاهان استفاده کرد اما توجه به مدت زمان تیمار، استفاده بهینه از الیستورها ضروری است زیرا ممکن است که بیان ژن‌های مطلوب مورد نظر طی استفاده مستمر از الیستور و قرار گرفتن در معرض دائم آن‌ها، خود باعث کاهش بیان شود و از آنجایی که عمدتاً طی واکنش‌های دفاعی مختلف سلولی متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شوند افزایش تولید آنها ممکن است منجر به یک سری تغییرات سلولی و واکنش‌های فوق حساسیت شود که در نتیجه آن ممکن است مرگ سلولی رخ می‌دهد (Khodayari et al., 2014). همچنین ممکن است کاربرد نانو الیستورها، منجر به تنش اکسیداتیو شود که این امر خود سبب تولید گونه‌های مختلف اکسیژن می‌شود که در نتیجه آن ممکن است آسیب‌هایی به مولکولهای زیستی وارد شود و از طرفی خود این ذرات نیز ممکن است یون‌هایی را به محیط وارد کنند (Chomoucka et al. 2010).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان چنین استنباط کرد که نانوذرات ZnO و CuO به روش سنتز سبز و با استفاده از عصاره مورینگا به عنوان عامل زیستی، با موفقیت سنتز شدند و استفاده از هیتر مغناطیسی فرایند احیای یون‌های فلزی را تسهیل کرد. نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که هر چند که اعمال نانو ذرات اکسید روی و مس سبب تغییر بیان ژن *MO-CBP3* شده اما این تغییر در غلظت ۱۵۰ ppm نانو ذره اکسید روی و غلظت ۱۰۰ ppm نانو ذره اکسید مس پس از ۴۸ ساعت پاسخ بهتری در افزایش بیان ژن مورد مطالعه داشته است. همچنین با افزایش بیش از حد غلظت و طول مدت تماس هر دو تیمار نانو ذره (غلظت ۲۵۰ ppm و بازه زمانی ۷۲ ساعت) کاهش بیان *Mo-CBP3* مشاهده شد که ممکن است نشان دهنده بروز پاسخ منفی یا تنش اکسیداتیو در گیاه باشد. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که نانوذرات سنتز شده به روش سبز با عصاره مورینگا می‌توانند به عنوان الیستور زیستی برای القای بیان ژن‌های دفاعی گیاه مورد مطالعه به کار روند.

References

منابع

- Abdallah, R., Mostafa, N. Y., Kirrella, G. A., Gaballah, I., Imre, K., Morar, A., ... & Elshebrawy, H. A. (2023). Antimicrobial effect of *Moringa oleifera* leaves extract on foodborne pathogens in ground beef. *Foods*, 12(4), 766. <https://doi.org/10.3390/foods12040766>.
- Alharbi, N. S., Alsubhi, N. S., & Felimban, A. I. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 15(3), 109-124. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2022.06.012>
- Assad, N., Laila, M. B., Hassan, M. N. U., Rehman, M. F. U., Ali, L., Mustaqeem, M., ... & Malik, T. (2025). Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles using *Equisetum diffusum* D. Don. with broad-spectrum antibacterial, anticancer, antidiabetic, and antioxidant potentials. *Scientific Reports*, 15(1), 19246. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-02450-9>
- Babaei, Z., Solouki, M., & Fazeli-Nasab, B. (2019). Investigating The Effect of Biological and non-Biological Elicitor on Expression of Hyp-1 Gene in *Hypericum perforatum*. *Modern Genetics*, 13(4), 543-549. DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.9.2. In Persian
- Babajani, A., Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., & Eslami, B. (2019). Differential growth, nutrition, physiology, and gene expression in *Melissa officinalis* mediated by zinc oxide and elemental selenium nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(24), 24430-24444. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05676-z>
- Banerjee, K., Pramanik, P., Maity, A., Joshi, D. C., Wani, S. H., & Krishnan, P. (2019). Methods of using nanomaterials to plant systems and their delivery to plants (mode of entry, uptake, translocation, accumulation, biotransformation and barriers). In *Advances in*

- phytonanotechnology (pp. 123-152). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815322-2.00005-5>
- Batista, A. B., Oliveira, J. T., Gifoni, J. M., Pereira, M. L., Almeida, M. G., Gomes, V. M., ... & Vasconcelos, I. M. (2014). New insights into the structure and mode of action of *Mo-CBP3*, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. *PloS one*, 9(10), e111427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111427>
- Behjati, M. M., Nemati, A., & Ardalan, P. (2020). Evaluation of the ZnO nanoparticles biosynthesized by *Amaranthus Ruentus* on the expression of apoptotic genes (*Bax* and *Bcl-2*) in breast cancer cells (*MDAMB-231*). DOR: 20.1001.1.22285105.2019.9.4.11.0. In Persian
- Bindhu MR, Umadevi M, Esmail GA, Al-Dhabi NA, Arasu MV. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Moringa oleifera* flower and assessment of antimicrobial and sensing properties. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2020;205:111836. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111836>
- Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Huska, D., Adam, V., Kizek, R., & Hubalek, J. (2010). Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological research*, 62(2), 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.014>
- Da Costa, M. V. J., & Sharma, P. K. (2016). Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54, 110-119. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0167-5>
- Das PE, Majdalawieh AF, Abu-Yousef IA, Narasimhan S, Poltronieri P. Use of a hydroalcoholic extract of *moringa oleifera* leaves for the green synthesis of bismuth nanoparticles and evaluation of their anti-microbial and antioxidant activities. *Materials (Basel)*. 2020;13:876. <https://doi.org/10.3390/ma13040876>
- Dejene, B. K., & Geletaw, T. M. (2023). A review of plant-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles for self-cleaning textiles. *Research Journal of Textile and Apparel*. <https://doi.org/10.1108/RJTA-12-2022-0154>
- Deresa, E. M., & Diriba, T. F. (2023). Phytochemicals as alternative fungicides for controlling plant diseases: A comprehensive review of their efficacy, commercial representatives, advantages, challenges for adoption, and possible solutions. *Heliyon*, 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13810>
- Espenti CS, Rama Krishna AG, Rami Reddy YV. Green biosynthesis of ZnO nanomaterials and their anti-bacterial activity by using *Moringa Oleifera* root aqueous extract. *SN Appl Sci*. 2020;2:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.126483>
- Falowo, A.B.; Muchenje, V.; Hugo, A.; Aiyegoro, O.A.; Fayemi, P.O. Antioxidant activities of *Moringa oleifera* L. and *Bidens pilosa* L. leaf extracts and their effects on oxidative stability of ground raw beef during refrigeration storage. *CyTA J. Food* 2017, 15, 249-256. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1243587>
- Farahani, S., Bandani, A., & Eslami, S. (2018). Comparison of susceptibility of two Iranian populations of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to spirodiclofen. <https://doi.org/10.22073/pja.v7i3>
- Freire reire, J. E. et al., Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family, *PLoS ONE*, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119871>
- Freire, J. E., Vasconcelos, I. M., Moreno, F. B., Batista, A. B., Lobo, M. D., Pereira, M. L., ... & Grangeiro, T. B. (2015). Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. *PloS one*, 10(3), e0119871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119871>
- Ghahremani, F., & Izanloo, C. (2020). Green synthesis of Copper Oxide Nanoparticles Using Extract of *Hypericum Perforatum* and *Marrubium Vulgare* and Evaluation of Antioxidant Properties of Herbal Extracts and Antibacterial Feature of Green-Synthesized Nanostructures. , 12(44), 239-249. DOR: 20.1001.1.20086156.1399.12.44.3.6. In Persian
- Ghebremichael, K. A., Gunaratna, K. R., Henriksson, H., Brumer, H., & Dalhammar, G. (2005). A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water research*, 39(11), 2338-2344. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.012>
- Gifoni, J. M., Oliveira, J. T., Oliveira, H. D., Batista, A. B., Pereira, M. L., Gomes, A. S., ... & Vasconcelos, I. M. (2012). A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Peptide Science*, 98(4), 406-415. <https://doi.org/10.1002/bip.22068>
- Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness*, 5(2), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>
- Hernández-Ceja, A., Loeza-Lara, P. D., Espinosa-García, F. J., García-Rodríguez, Y. M., Medina-Medrano, J. R., Gutiérrez-Hernández, G. F., & Ceja-Torres, L. F. (2021). In vitro antifungal activity of plant extracts on pathogenic fungi of blueberry (*Vaccinium* sp.). *Plants*, 10(5), 852. <https://doi.org/10.3390/plants10050852>
- Hernández-Hernández, H., Juárez-Maldonado, A., Benavides-Mendoza, A., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Sánchez-Aspeytia, D., & González-Morales, S. (2018). Chitosan-PVA and copper nanoparticles improve growth and overexpress the SOD and JA genes in tomato plants under salt stress. *Agronomy*, 8(9), 175. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090175>
- Jaiswal, D., Rai, P. K., Mehta, S., Chatterji, S., Shukla, S., Rai, D. K., ... & Watal, G. (2013). Role of *Moringa*

- oleifera in regulation of diabetes-induced oxidative stress. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 6(6), 426-432. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60068-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60068-1)
- Javed, R., Khan, B., Sharafat, U., Bilal, M., Galagedara, L., Abbey, L., & Cheema, M. (2024). Dynamic interplay of metal and metal oxide nanoparticles with plants: Influencing factors, action mechanisms, and assessment of stimulatory and inhibitory effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 271, 115992. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.115992>
- Joško, I., Kusiak, M., Xing, B., & Oleszczuk, P. (2021). Combined effect of nano-CuO and nano-ZnO in plant-related system: From bioavailability in soil to transcriptional regulation of metal homeostasis in barley. *Journal of hazardous materials*, 416, 126230. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.115992>
- Kaur, H., Sharma, A., Anand, K., Panday, A., Tagotra, S., Kakran, S., ... & Singh, G. (2025). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *E. cardamomum* and zinc nitrate precursor: a dual-functional material for water purification and antibacterial applications. *RSC advances*, 15(21), 16742-16765. <https://doi.org/10.1039/D5RA01469G>
- Ke, M., Zhu, Y., Zhang, M., Gumai, H., Zhang, Z., Xu, J., & Qian, H. (2017). Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* to CuO nanoparticle (nCuO) exposure. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 99(6), 713-718. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2205-4>
- Khodayari, M., Omidi, M., Shah Nejat Bushehri, A., Yazdani, D., Naqvi, M. R., & Kadkhoda, Z. (2014). Effect biological elicitor and nano elicitor on increasing the production of alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum*). *Iranian Horticultural Science*, 45, 287-295. <https://doi.org/10.22059/ijhs.2014.52877>. In Persian
- Kim, S. H., Bae, S., Sung, Y. W., & Hwang, Y. S. (2024). Effects of particle size on toxicity, bioaccumulation, and translocation of zinc oxide nanoparticles to bok choy (*Brassica chinensis* L.) in garden soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 280, 116519. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116519>
- Kister, T., Monego, D., Mulvaney, P., Widmer-Cooper, A., & Kraus, T. (2018). Colloidal stability of apolar nanoparticles: The role of particle size and ligand shell structure. *ACS nano*, 12(6), 5969-5977. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02202>
- Lala, S. (2021). Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review. *IET nanobiotechnology*, 15(1), 28-57. <https://doi.org/10.1049/nbt.12005>
- Langner, T., & Göhre, V. (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current genetics*, 62(2), 243-254. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0530-x>
- Leopold, L. F., Coman, C., Clapa, D., Oprea, I., Toma, A., Iancu, Ş. D., ... & Coman, V. (2022). The effect of 100–200 nm ZnO and TiO₂ nanoparticles on the in vitro-grown soybean plants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216, 112536. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112536>
- Lv, Z., Jiang, R., Chen, J., & Chen, W. (2020). Nanoparticle-mediated gene transformation strategies for plant genetic engineering. *The Plant Journal*, 104(4), 880-891. <https://doi.org/10.1111/tpj.14973>
- Madariaga-Mazón, A., Hernández-Alvarado, R. B., Noriega-Colima, K. O., Osnaya-Hernández, A., & Martínez-Mayorga, K. (2019). Toxicity of secondary metabolites. *Physical Sciences Reviews*, 4(12). <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0116>
- Mahdi, H. J., Khan, N. A. K., Asmawi, M. Z. B., & Mahmud, R. (2018). In vivo anti-arthritis and anti-nociceptive effects of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats. *Integrative medicine research*, 7(1), 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.11.002>
- Meela, M. M., Mdee, L. K., Masoko, P., & Eloff, J. N. (2019). Acetone leaf extracts of seven invasive weeds have promising activity against eight important plant fungal pathogens. *South African journal of botany*, 121, 442-446. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.12.007>
- Michen, B., Geers, C., Vanhecke, D., Endes, C., Rothen-Rutishauser, B., Balog, S., & Petri-Fink, A. (2015). voiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. *Scientific reports*, 5(1), 9793. <https://doi.org/10.1038/srep09793>
- Minaiyan, M., Asghari, G., Taheri, D., Saeidi, M., & Nasr-Esfahani, S. (2014). Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(2), 127. <https://doi.org/10.22038/ajp.2014.1072>
- Moghadami, F., Hajmoradi, F., & Kalantari, M. (2023). Investigating the effect of silver nanoparticles on the activity of glycerol dehydrogenase by response surface methodology. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 12(1), 59-67. DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1. In Persian
- Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., ... & Petri-Fink, A. (2015). Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6287-6305. <https://doi.org/10.1039/C4CS00487F>
- Mosa, K. A., El-Naggar, M., Ramamoorthy, K., Alawadhi, H., Elnaggar, A., Wartanian, S., ... & Hani, H. (2018). Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*)

- plants. *Frontiers in plant science*, 9, 872. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00872>
- Naghavi, F., Khoshroo, S. M. R., Kazemipour, M. and Mahmoudi Zarandi, M. (2024). Effect of green copper nanoparticles synthesized with Aloe vera aqueous extract on germination parameters of pinto beans under salinity stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 37(1), 16-29. <https://doi.org/10.22034/jpr.2024.2249>. In Persian
- Naiel, B., Fawzy, M., Halmy, M. W. A., & Mahmoud, A. E. D. (2022). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Sea Lavender (*Limonium pruinum* L. Chaz.) extract: characterization, evaluation of anti-skin cancer, antimicrobial and antioxidant potentials. *Scientific Reports*, 12(1), 20370. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24805-2>
- Othman, M., Saada, H., & Matsuda, Y. (2020). Antifungal activity of some plant extracts and essential oils against fungi-infested organic archaeological artefacts. *Archaeometry*, 62(1), 187-199. <https://doi.org/10.1111/arc.12500>
- Paikra, B. K., & Gidwani, B. (2017). Phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of pharmacopuncture*, 20(3), 194. <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.022>
- Perumalsamy, H., Balusamy, S. R., Sukweenadhi, J., Nag, S., MubarakAli, D., El-Agamy Farh, M., ... & Rahimi, S. (2024). A comprehensive review on *Moringa oleifera* nanoparticles: importance of polyphenols in nanoparticle synthesis, nanoparticle efficacy and their applications. *Journal of nanobiotechnology*, 22(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02332-8>
- Raafat, K., & Hdaib, F. (2017). Neuroprotective effects of *Moringa oleifera*: Bio-guided GC-MS identification of active compounds in diabetic neuropathic pain model. *Chinese journal of integrative medicine*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2758-4>
- Radwan, A. M., Aboelfetoh, E. F., Kimura, T., Mohamed, T. M., & El-Keiy, M. M. (2021). Fenugreek-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles and evaluation of its in vitro and in vivo antitumor potency. *Biomedical Research and Therapy*, 8(8), 4483-4496. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i8.687>
- Rahimi Sherbaf Moghadas, M., Naghavi, M., Sabokdast, M., Motemadi, E., & Nasiri, J. (2021). The effect of nano elicitors on the expression of the genes involved in alkaloids biosynthetic pathway in *Papaver orientale* L. suspension culture. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(1), 133-141. <https://doi.org/10.22059/ijfcs.2020.256665.654466>. In Persian
- Rezaee, M., Hosseini, R., & Asghari, B. (2016). Evaluating the effect of zinc and cobalt nanoparticles on expression of STR, DAT and D4H genes in periwinkle (*Cataranthus roseus*) suspension culture. *Cell and Tissue Journal*, 7(4), 355-364. <https://doi.org/10.52547/JCT.7.4.355>. In Persian
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Adrees, M., Ibrahim, M., ... & Abbas, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *Journal of hazardous materials*, 322, 2-16. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.061>
- Singh, H., Desimone, M. F., Pandya, S., Jasani, S., George, N., Adnan, M., ... & Alderhami, S. A. (2023). Revisiting the green synthesis of nanoparticles: uncovering influences of plant extracts as reducing agents for enhanced synthesis efficiency and its biomedical applications. *International journal of nanomedicine*, 4727-4750. <https://doi.org/10.2147/IJN.S419369>
- Teixeira, E. M. B., Carvalho, M. R. B., Neves, V. A., Silva, M. A., & Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food chemistry*, 147, 51-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.135>
- Tripathi, S., Mahra, S., Tiwari, K., Rana, S., Tripathi, D. K., Sharma, S., & Sahi, S. (2023). Recent advances and perspectives of nanomaterials in agricultural management and associated environmental risk: a review. *Nanomaterials*, 13(10), 1604. <https://doi.org/10.3390/nano13101604>
- Trontin, J. F., Klimaszewska, K., Morel, A., Hargreaves, C., & Lelu-Walter, M. A. (2016). Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 167-207. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_8
- Vafaie Moghadam, A., Iranbakhsh, A., Saadatmand, S., Ebadi, M., & Oraghi Ardebili, Z. (2022). New insights into the transcriptional, epigenetic, and physiological responses to zinc oxide nanoparticles in *Datura stramonium*; potential species for phytoremediation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(1), 271-281. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10305-6>
- Vahedi, H., Fahmideh, L., Fakheri, B. A., & Fazeli-Nasab, B. (2023). Effect of Chitosan and Silver nanoparticles on expression of Betaamyrin synthase gene in Ajowan. *Modern Genetics*, 18(2)235-244. URL: <http://mg.genetics.ir/article-1-1616-fa.html>. In Persian
- Wang, S., Liu, H., Zhang, Y., & Xin, H. (2015). The effect of CuO NPs on reactive oxygen species and cell cycle gene expression in roots of rice. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(3), 554-561. <https://doi.org/10.1002/etc.2826>
- Yao, Q., Wu, C. F., Luo, P., Xiang, X. C., Liu, J. J., Mou, L., & Bao, J. K. (2010). A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. *Process*

- Biochemistry, 45(9), 1477-1485.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.026>
- Zhang, H., Demirer, G. S., Zhang, H., Ye, T., Goh, N. S., Aditham, A. J., ... & Landry, M. P. (2019). DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(15), 7543-7548.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1818290116>
- Zong, X., Wu, D., Zhang, J., Tong, X., Yin, Y., Sun, Y., & Guo, H. (2022). Size-dependent biological effect of copper oxide nanoparticles exposure on cucumber (*Cucumis sativus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(46), 69517-69526.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20662-8>