

Effect of three kinds nanoparticles and methyl jasmonate on antioxidant system activity in *Cannabis sativa* L.

Sedigheh Fabriki-Ourang^{1*}, Motahareh Mohammadi², Jafar Ahmadi³

1- Corresponding Author, Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

(s.ourang910@gmail.com)

2- M.Sc. student in genetics and plant breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

(naemeh@gmail.com)

3- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. (njahmadi910@yahoo.com)

Received Date: 29/04/2022

Accepted Date: 14/10/2022

Abstract

Introduction: *Cannabis sativa* L. is an annual dioecious plant from Central Asia. It has been used since ancient times as a medicinal plant, but also it is the source of hemp fibers and vegetable oil used as food. Cannabis has been used for medicinal purposes, for treating pain, spasms, asthma, insomnia, depression, and loss of appetite, in many cultures for hundreds of years. Antioxidants are the most important chemical compounds found in the *C. sativa* species. Cannabis contains a diverse group of active compounds, including cannabinoids, terpenes, and flavonoids, which exhibit multidirectional biological activity and can influence each other's pharmacological profile. Hemp leaves, often considered waste in the industry, have been found to contain high levels of active compounds, making them a valuable resource for extraction. Utilizing hemp leaves can contribute to a zero-waste approach and sustainable development of the industry. Considering the climatic diversity of Iran, as well as the importance of the medicinal plant cannabis and also the use of nanoparticles in agriculture, the present study was conducted with the aim of the effect of these abiotic elicitors on the antioxidant system of cannabis.

Material and methods: To evaluate the effect of nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂) (250 and 500 mg/l), zinc dioxide (ZnO₂) (125 and 250 mg/l), cerium dioxide (CeO₂) (125 and 250 mg/l) and methyl jasmonate (MJ) (50 and 100 µM) on the antioxidant activity of hemp plant, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications. The elicitors solution was applied as irrigation and the sampling of plant leaves was done 24, 48 and 72 hours after the elicitor treatment, respectively. After preparing the enzyme extracts from the leaf tissue of treated cannabis plants, the activity of antioxidant enzymes catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, glutathione reductase and guaiacol peroxidase was measured using a spectrophotometer..

Results and discussion: The analysis of variance results indicated the significance ($p \leq 0.01$) of the effect of different elicitors and sampling times on all antioxidant activities. Also, all the two-way elicitor $\times$ time interaction effects were significant ($p \leq 0.01$) on all studied traits. In means comparison of the two-way interaction effect, it was found that the 125 mg/l of CeO₂ and 250 mg/l of ZnO₂ in the sample taken 48 hours after the treatment had the highest amount of protein. Also, 250 mg/l TiO₂ in 48 hours sampling after the treatment showed the highest amount of catalase, 125 mg/l ZnO₂ in the 72 and 48 hours sampling after the treatment showed the highest amount of ascorbate peroxidase, the 250 mg/l CeO₂ in 48 hours sampling after the treatment showed the highest amount of glutathione reductase, the 125 mg/l CeO₂ in 48 hours sampling and 250 mg/l ZnO₂ in 72 hours sampling showed the highest levels of guaiacol peroxidase, and 50 µM methyl jasmonate in the sample taken 48 hours after the treatment had the highest amount of superoxide dismutase in the leaves of the hemp plant.

Conclusions: In this research, the highest amount of protein was observed with cerium and zinc nanoparticles at 48 hours sampling time after treatment. Also, the highest amount of catalase with titanium nanoparticles at 48 hours, the highest amount of ascorbate peroxidase with zinc nanoparticles at 72 and 48 hours, the highest amount of glutathione reductase and Guaiacol peroxidase with cerium nanoparticles in 48 hours and the highest amount of superoxide dismutase with methyl jasmonate in 48 hours sampling time after treatment were observed in hemp leaves.

Keywords: Cerium dioxide, Elicitor, Titanium dioxide, Zinc dioxide..

تأثیر محلول پاشی نانوذرات و متیل جاسمونات بر فعالیت آنتی اکسیدانی شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)

صدیقه فابریکی اورنگ^{۱*}، مطهره محمدی^۲، جعفر احمدی^۳

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.
(s.ourang910@gmail.com)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.
(naemeh@gmail.com)

۳- نویسنده مسئول، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.
(njahmadi910@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۹

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO_2) (غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر)، دی اکسید روی (ZnO_2) (غلظت ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر)، دی اکسید سرب (CeO_2) (غلظت ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر) و متیل جاسمونات (MJ) (غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار) بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه شاهدانه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. محرک‌ها به صورت محلول تهیه و به صورت آبیاری در مرحله شروع گلدهی اعمال گردید و نمونه برداری برگ گیاهان به ترتیب، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال محلول محرک انجام شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی دار بودن اثر فاکتور محرک‌های مختلف و زمان‌های نمونه‌گیری پس از اعمال تیمار بر تمام فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در سطوح احتمال یک درصد بود. همچنین اثر متقابل دوگانه محرک $\times$ زمان نمونه برداری بر روی تمام صفات در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. در مقایسه میانگین اثر متقابل دوگانه محرک $\times$ زمان، به ترتیب غلظت‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب و روی در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال محرک بالاترین میزان پروتئین را نشان دادند. همچنین غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر تیتانیوم در زمان ۴۸ ساعت بالاترین میزان کاتالاز، غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر روی در زمان ۷۲ و ۴۸ ساعت بالاترین میزان آسکوربات پراکسیداز، غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سرب در زمان ۴۸ ساعت بالاترین میزان گلوکاتایون ردوکتاز، غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر لیتر سرب در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر روی در زمان ۷۲ ساعت بالاترین میزان گایاکول پراکسیداز و غلظت ۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات در زمان ۴۸ ساعت میزان سوپراکسید دیسموتاز را در برگ‌های گیاه شاهدانه نشان دادند.

کلمات کلیدی: الیستور، دی اکسید تیتانیوم، دی اکسید روی، دی اکسید سرب.

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) یک گیاه دارویی است که با وجود قدمت کشت و کار طولانی، به دلیل ممانعت‌های قانونی، جایگاه اصلی خود را در بین گیاهان، به‌ویژه در ایران پیدا نکرده است. از این رو هیچ‌گاه به‌عنوان یک منبع غذایی، دارویی و صنعتی مهم مورد توجه نبوده است و تحقیقات اندکی روی ویژگی‌های زراعی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن صورت گرفته است. شاهدانه گیاهی یک‌ساله، علفی و دو پایه از خانواده کانابیناسه می‌باشد که بیش از ۴۸۰ ترکیب شیمیایی در آن شناسایی شده است (Flores, 2008).

یکی از فناوری‌های پیشرفته در زمینه کنترل تنش‌های وارده به گیاه، استفاده از نانوذره‌ها است. نانوذرات، مجموعه‌ای اتمی یا مولکولی با ابعاد یک تا صد نانومتر هستند که خواص فیزیکوشیمیایی متفاوتی نسبت به گروه مواد خود دارند. نانوذرات اکسید فلزی به دلیل تنوع در ساختمان کریستالی و ماهیت پیوندهای یونی، کووالانسی یا فلزی شناخته شده هستند. این ذرات، ویژگی‌های الکترونیکی و مغناطیسی خاصی دارند و در مواد تجاری، زیست محیطی، شیمی و پزشکی به کار می‌روند (Gawande et al., 2016).

یکی از واکنش‌های گیاهان به تنش‌های زنده و غیر زنده، افزایش دادن انواع اکسیژن فعال^۱ می‌باشد که از احیای ناقص اکسیژن در طی فرآیندهای حیاتی سلول همچون تنش، فتوستنز، تنفس نوری به وجود می‌آید. رادیکال‌های آزاد منجر به تخریب درشت مولکول‌ها، پروتئین‌ها و نشاسته می‌شوند و توسط پراکسیداسیون لیپیدی پایداری غشا را کاهش می‌دهند و نیز با بالابردن نشت الکترولیت‌ها از غشا باعث کاهش جوانه‌زنی گیاه می‌شوند (Turkan, 2011). تنش اکسیداتیو در گیاه بر اثر تولید انواع اکسیژن فعال در طی اجرای فرآیندهای حیاتی ایجاد می‌شود و سلول‌های گیاهی برای مهار انواع اکسیژن فعال

از مکانیسم‌های تحمل چرخه مهلر^۲، چرخه گلوتاتیون آسکوربات^۳ و چرخه گزانتوفیل^۴ بهره می‌برند. اجزای این چرخه‌ها، یا انواع اکسیژن فعال را جذب می‌کنند و یا از تولید آن‌ها جلوگیری نموده و به پایداری سلول کمک می‌کنند. این چرخه‌ها از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی تشکیل شده‌اند (Gill and Tuteja, 2010). گیاهان برای کنترل انواع اکسیژن فعال دارای دو نوع عملکرد (سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی) می‌باشند. عملکرد غیر آنزیمی شامل کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، آسکوربات و گلوتاتیون آنتوسیانین‌ها و ترکیبات فنولیک مانند فلاوونوئیدها است و عملکرد آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز^۵، کاتالاز^۶، آسکوربات پراکسیداز^۷، گلوتاتیون ردوکتاز^۸، گایاکول پراکسیداز^۹ و سایر آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد (Gill and Tuteja, 2010). ترکیبات آنتی اکسیدان با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند و با دادن الکترون، آن‌ها را به فرم پایدار تبدیل می‌کنند (Pandey et al., 2002).

تیتانیوم به عنوان یک عنصر مفید سبب بیش‌تر شدن و تحریک رشد می‌شود. نانو دی اکسید تیتانیوم باعث بهتر شدن جذب نور و فعالیت آنزیم رویسکو، بالارفتن جذب نیترات و بیش‌تر شدن سرعت تبدیل مواد غیر آلی به آلی می‌شود (Nair et al., 2010). تیتانیوم دی اکسید (TiO_2) کاربردهای زیادی دارد، از جمله اینکه به وسیله بالابردن فتوستنز و کم کردن آسیب‌های آفات و بیماری‌ها تا ۳۰ درصد سبب افزایش محصول می‌گردد (Martinez-Sanchez et al., 1993). تیتانیوم بر فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه نیز اثر دارد و باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، نیترات ردوکتاز و پراکسیداز می‌شود. محققین، دلیل افزایش فعالیت این آنزیم‌ها تحت تأثیر محرک تیتانیوم را ناشی از

2. Mehler reaction

3. ascorbate-glutathione cycle

4. Xanthophyll cycle

5. Superoxide dismutase; SOD

6. Catalase; Cat

7. Ascorbate peroxidase; APX

8. Glutathione reductase; GR

9. Guaiacol peroxidase; GPX

1. Reactive oxygen species; ROS

افزایش جذب آهن دانستند (Martinez-Sanchez et al., 1993).

جاسمونیک اسید و پیش سازهای آن با عنوان جاسمونات‌ها شناسایی می‌شوند. جاسمونات برای اولین بار در دهه ۱۹۶۰ در گل یاس شناسایی شد. متیل جاسمونات با فرمول شیمیایی $C_{13}H_{20}O_3$ به صورت مایعی بی رنگ می باشد که به عنوان یکی از هورمون‌های گیاهی در تنظیم بیان ژن، تنظیم مسیر متابولیت‌ها، ایجاد پاسخ‌های دفاعی و تولید مثل موثر می باشد. متیل جاسمونات به عنوان یک محرک با منشا غیر زیستی می‌تواند به القای تولید آنزیم‌های اکسیدانت در گیاهان کمک کند (Saisavivey et al., 2014).

عنصر روی از عناصر کم مصرف ضروری است که برای رشد طبیعی و تولیدمثل گیاهان زراعی ضروری است. نیاز به روی، برای رشد بهینه و مراحل فیزیولوژیک گزارش شده است. این فلز به عنوان فعال کننده و کوفاکتور برخی آنزیم‌های حیاتی گیاه ازجمله کربونیک انهیدرازها، RNA دهیدروژنازها، آلکالین فسفاتازها، فسفولیپازها و پلیمرازها در متابولیسم پروتئین‌ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها، فتوسنتز گیاه و بیوسنتز اکسین به عنوان یک هورمون محرک رشد ایفای نقش می‌کند. برخی از محققان معتقدند که فلز روی از طریق محافظت پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی در برابر رادیکال‌های آزاد و سایر محصولات حاصل از واکنش‌های احیایی درون سلولی، سبب حفظ تمامیت غشای سلول‌ها می‌شود. به علاوه این فلز به همراه مس بخش اصلی آنزیم سوپراکسیددسموتاز را به عنوان حذف کننده رادیکال‌های آزاد تشکیل می‌دهد (Misra, 1992). محققان بیان کرده‌اند که نانوذرات اکسید روی در مقایسه با اکسید روی اثر منفی بیشتری دارند زیرا گونه‌های فعال اکسیژن بیشتری تولید می‌کنند (Franklin et al., 2007). سمی بودن فلز روی در غلظت بالا به دلیل این است که این ترکیب، با مهار فرایند انتقال الکترون فتوسنتزی، به عنوان یک تولید کننده فعال رادیکال‌های

سمی اکسیژن سلول عمل می‌کند و همچنین به صورت غیر مستقیم با کاهش جذب و جابجا کردن آهن در گیاه، واکنش‌های اکسیداتیو را راه اندازی می‌کند (Prasad, 1995).

نانوذرات اکسید سریم ($nCeO_2$) کاربرد مکانیکی شیمیایی گسترده دارند و در مواد افزودنی سوخت استفاده می‌شود. نانو ذرات اکسید سریم شکل اکسید شده عنصر سریم می‌باشد که به جهت تغییرات جای خالی اکسیژن سطحی و آرایش ظرفیتی می‌توانند فعالیت سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز را تقلید کنند، بنابراین قادر هستند به عنوان جاروب کننده‌های گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر در بسیاری از زمینه‌های بیولوژیک عمل کنند. این ویژگی سریم در مقیاس نانو به دلیل نسبت بیشتر سطح به حجم افزایش پیدا می‌کند (Celardo et al., 2011).

با توجه به تنوع اقلیمی ایران و نیز اهمیت گیاه دارویی شاهدانه و استفاده از نانوذره‌ها در کشاورزی، بررسی حاضر با هدف تاثیر این محرک‌های غیرزنده روی سیستم آنتی اکسیدانی شاهدانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

عملیات کشت در گلخانه و محلول پاشی محرک‌ها

به منظور بررسی تاثیر محرک‌های غیر زنده، بر فعالیت‌های آنتی اکسیدانی شاهدانه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در گلخانه و آزمایشگاه دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) استان قزوین با سه تکرار انجام شد. دو فاکتور مورد مطالعه شامل محرک‌ها (۹ سطح) و زمان نمونه‌گیری (۳ سطح) بودند، به‌طوری که محرک تیتانیوم دی اکسید (TiO_2) با دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر، متیل جاسمونات (MJ) با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و دو محرک سریم دی اکسید (CeO_2) و روی دی اکسید (ZnO_2) هر دو با غلظت ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر تهیه شده و قبل از استفاده به مدت نیم ساعت در دستگاه سونیکاتور قرار داده شدند.

نهایت به حجم ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد. این محلول در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه محلول استوک سرم گاوی BSA

مقدار ۰/۰۱ گرم از آلبومین گاوی را توزین نموده در یک میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده حل و به این ترتیب محلول ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. سپس از این استوک غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ تهیه شد. به هر یک از غلظت‌های فوق ۹۰۰ میلی لیتر محلول Bradford افزوده شد، سپس ۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در نهایت دستگاه اسپکتروفتومتر را روی طول موج ۵۹۵ نانومتر تنظیم نموده، برای بلانک کردن دستگاه از ۹۰۰ میلی لیتر محلول Bradford به علاوه ۱۰۰ میلی لیتر آب استفاده شد. نهایتاً منحنی استاندارد ترسیم و میزان پروتئین نمونه‌ها با روش برادفورد (۱۹۷۶) محاسبه شد.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) به روش ناکاتو و آسادا (۱۹۸۱) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7)، ۰/۳۴ میکرولیتر H_2O_2 دو میلی مولار، ۸۰ میکرولیتر آسکوربات دو میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره گیاه شاهدانه بود. دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر تنظیم شد و نتایج در ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه و بر حسب میکرومول آسکوربات اکسیده شده در دقیقه در یک میلی گرم پروتئین خوانده شد.

آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) به روش Upadhyay و همکاران (۱۹۸۵) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=6.1) ۵۰۰ میکرولیتر گایاکول یک درصد، ۵۰۰ میکرولیتر H_2O_2 یک درصد و ۲۰ میکرولیتر عصاره گیاهی بود. دستگاه در طول موج ۴۲۰ نانومتر تنظیم

برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. گلدان‌های به قطر ۲۰ سانتی متر و ارتفاع ۲۰ سانتی متر انتخاب و با نسبت سه به یک از خاک مزرعه و کود دامی پوسیده پر شدند و در هر گلدان ۱۲ بذر کاشته شد. آبیاری با توجه به خشک بودن خاک و به طور معمول دو بار در هفته انجام شد. پس از این‌که گیاهان به مرحله گل‌دهی رسیدند، اعمال محرک‌ها به صورت محلول‌دهی به همراه آبیاری به هر گلدان به میزان ۳۳۳ میلی لیتر انجام شد. برداشت نمونه گیاهان به ترتیب ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال محرک‌ها انجام شد. به این صورت که، به میزان ۰/۵ گرم از برگ‌های گیاهان تیمار شده در تکرارهای مختلف جدا و در فویل آلومینیومی پیچیده شده و در نیتروژن مایع قرار گرفت، و در نهایت در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند. سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با اسپکتوفتومتر (مدل Unico double beam UV) و در دمای آزمایشگاه ژنومیکس (۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد.

تهیه عصاره آنزیمی

برای تهیه بافر استخراج عصاره، ۷۰۰ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=7) را آماده نموده و سپس ۷۰ میلی لیتر گلیسرول به همراه ۴۵ میلی لیتر مرکاپتول به آن اضافه شد. در مرحله بعد ۱/۲ میلی لیتر از بافر را به هر نمونه که توسط نیتروژن مایع کوبیده شده و وزن آن ۰/۲ گرم بود افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس انجام شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در سانتریوفیوژ با دمای ۴ درجه و دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه قرار داده شد و از محلول رویی برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی استفاده شد.

تهیه محلول Bradford

۰/۰۲۵ گرم از ماده comassia brilliant blue G 250 را توزین کرده و سپس ۱۲/۵ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد به آن افزون گردید و روی دستگاه هیتر قرار داده شد. سپس ۲۵ میلی لیتر فسفریک اسید ۸۵ درصد به آن افزوده و در

و نتایج در ۳۰، ۶۰، ۳۰۰ ثانیه و بر حسب میکرومول گایاکول اکسیده شده در دقیقه در یک میلی گرم پروتئین خوانده شد.

آنزیم کاتالاز

فعالیت این آنزیم به روش Aebi (۱۹۸۴) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7.4)، ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 یک درصد، ۳۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲۵ میکرولیتر عصاره گیاهی بود. دستگاه در طول موج ۲۴۰ نانومتر تنظیم و نتایج در ۰ ثانیه و ۳ دقیقه و بر حسب میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در یک میلی گرم پروتئین قرائت شد.

آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) به روش کلاپک و همکاران (۱۹۹۰) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر گلوتاتیون اکسید شده (GSSG)، ۱ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7)، ۱۰۰ میکرولیتر NADPH، ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲۵ میکرولیتر عصاره گیاهی بود. برای تهیه محلول GSSG، ۰/۰۲۴ گرم از این ماده در ۲ میلی لیتر آب حل و سپس ورتکس شد. ۰/۰۰۳۴ گرم از NADPH در Tris ده میلی مولار (pH=7) حل و سپس ورتکس شد. و هر دو محلول جهت ثابت ماندن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در بلوک حرارتی نگاه داشته شد. دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر تنظیم و نتایج در ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه و براساس تعداد گلوتاتیون اکسید شده توسط گلوتاتیون ردوکتاز با مصرف NADPH بر حسب میلی گرم پروتئین ثبت شد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت این آنزیم به روش میسرا و فردویچ (۱۹۷۲) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.8)، ۰/۰۰۴۴۷ گرم متیونین، ۰/۰۰۰۲ گرم نیتروبلوترازولیوم کلراید (NBT) و

۰/۶ میکرولیتر EDTA (pH=8) و ۳۰ میکرولیتر ریبوفلاوین بود که به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور با دور ۱۰۰ دقیقه زیر لامپ فلوروسنت قرار گرفت. دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۶۰ نانومتر تنظیم و ۵۰ میکرولیتر عصاره به مخلوط واکنش اضافه و نتایج خوانده شد.

آنالیز آماری

پس از اندازه گیری صفات جهت تجزیه و مرتب سازی داده ها از نرم افزار Excel استفاده شد تجزیه واریانس داده ها و مقایسه میانگین صفات با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و ترسیم نمودارها به کمک نرم افزار Excel انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها حاکی از معنی دار بودن ($P \leq 0.01$) اثر محرک ها، اثر زمان های نمونه برداری و اثر متقابل دوجانبه محرک ها $\times$ زمان های نمونه برداری بر روی تمامی صفات مورد مطالعه بود (جدول ۱).

پروتئین

بر اساس آزمون مقایسه میانگین ها به روش دانکن برای اثر متقابل دوگانه محرک $\times$ زمان نمونه برداری، بیش ترین میزان پروتئین (۱۴۳/۶، ۱۳۷/۳ و ۱۲۷/۹ میلی گرم) به ترتیب برای دی اکسید سربیم با غلظت ۱۲۵ میلی گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت نمونه برداری، دی اکسید روی با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت نمونه برداری، دی اکسید تیتانیوم با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر پس از ۷۲ ساعت نمونه برداری و کم ترین میزان پروتئین (۴۹/۲ و ۵۶/۹ میلی گرم) در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات با زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال محرک مشاهده گردید (شکل ۱).

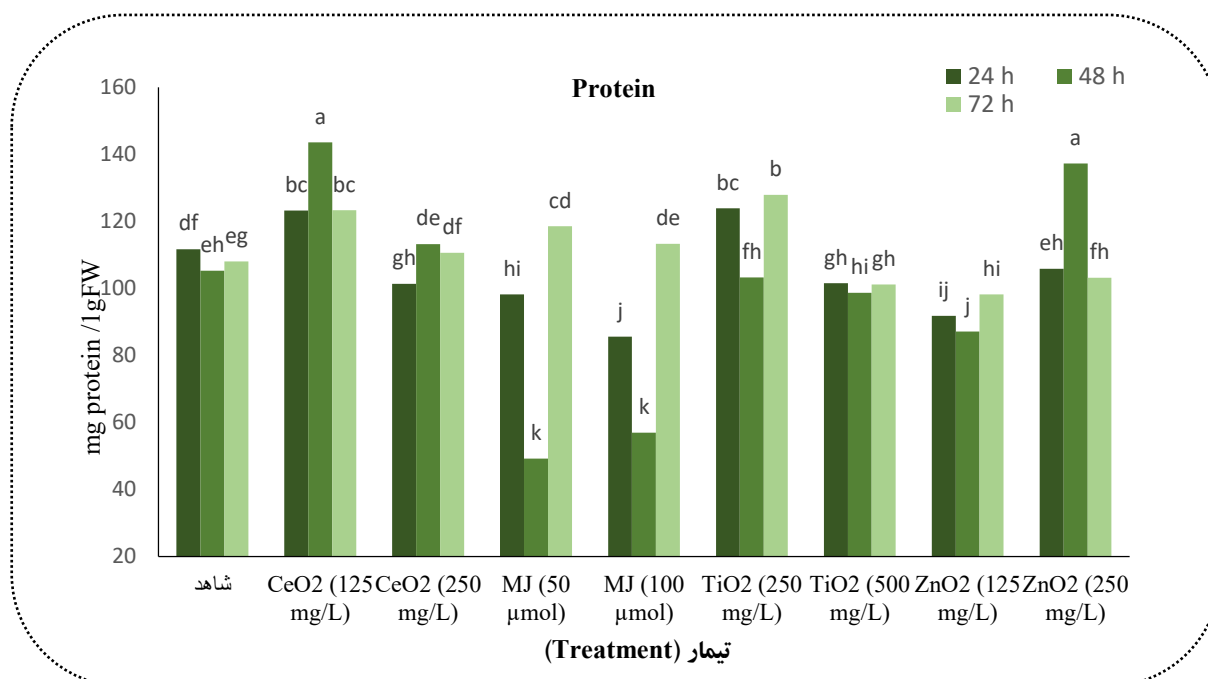
جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر نانوذررات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی شاهده.

Table 1- Variance analysis of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate effect on protein content and antioxidant enzymes activity in hemp.

Sources of Variations	df	Protein	CAT	SOD	GPX	APX	GR
Elicitor	8	1991.6**	41.17**	0.69**	0.006**	0.217**	0.054**
Sampling Time	2	1003.9**	40.98**	0.34**	0.0005*	0.030**	0.004**
Time× Elicitor	16	930.2**	7.36**	0.15**	0.001**	0.107**	0.005**
Error	54	12.75	0.045	0.004	0.00004	0.002	0.00007
CV%		3.39	8.24	9.53	8.03	8	6.15

** : Significant at the 0.01 probability level.

CAT: Catalase; SOD: Super Oxide Dismutase; GPX: Guaiacol Peroxidase; APX: Acrobat Peroxidase; GR: Glutathione Reductase.



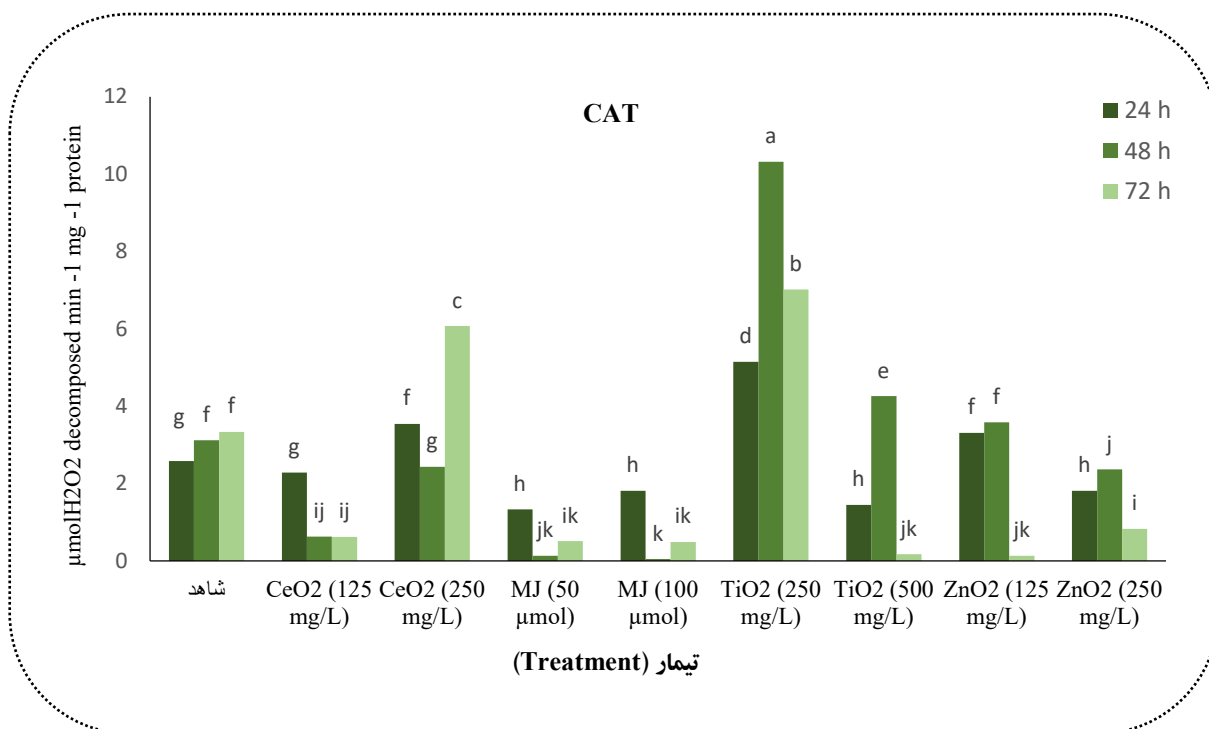
شکل ۱- تاثیر نانوذررات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان پروتئین کل در شاهده. میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون برای هر صفت بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig 1. Effect of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate on total protein in hemp. Means with the same letters is not significant at 0.01 level of Duncan test.

پس از ۷۲ ساعت نمونه برداری، دی اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر پس از ۷۲ ساعت نمونه برداری و کمترین میزان کاتالاز (۰/۰۶۶ میکرومول) در غلظت ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات با زمان ۴۸ ساعت بعد از اعمال محرک مشاهده گردید (شکل ۲).

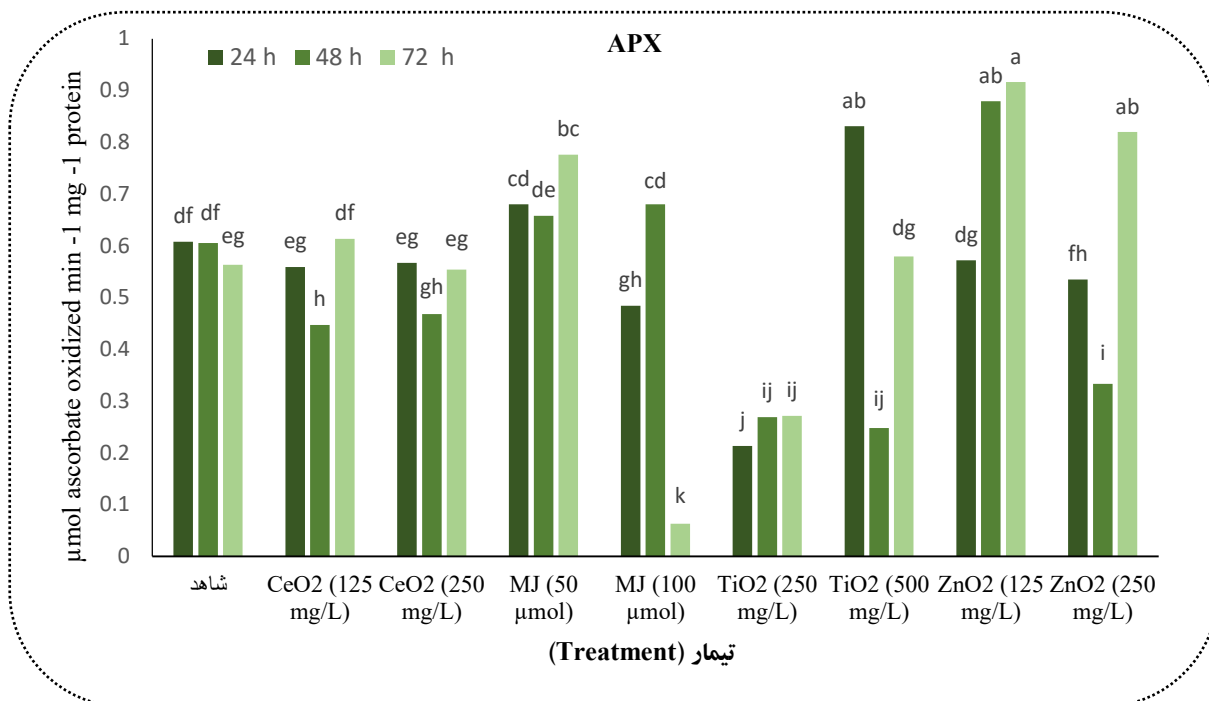
کاتالاز (CAT)

در مقایسه میانگین‌های اثر متقابل دوگانه محرک × زمان نمونه برداری، بیشترین میزان کاتالاز (۱۰/۳۲، ۷/۰۲ و ۶/۰۷ میکرومول) به ترتیب برای دی اکسید تیتانیوم با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت نمونه برداری، دی اکسید تیتانیوم با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر



شکل ۲- تاثیر نانوذرات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان کاتالاز در شاهدانه. میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون برای هر صفت بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig 2. Effect of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate on catalase in hemp. Means with the same letters is not significant at 0.01 level of Duncan test.



شکل ۳- تاثیر نانوذرات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شاهدانه. میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون برای هر صفت بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig 3. Effect of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate on Ascorbate Peroxidase in hemp. Means with the same letters is not significant at 0.01 level of Duncan test.

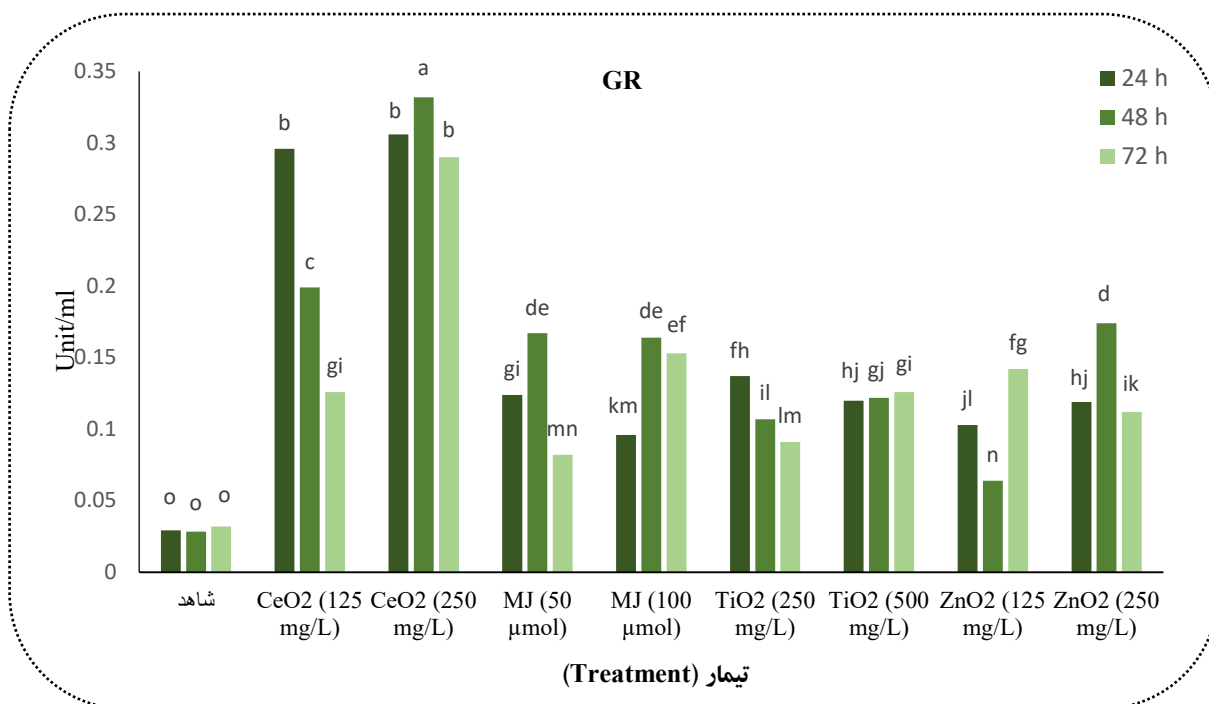
آسکوربات پراکسیداز (APX)

در نتایج مقایسه میانگین‌های اثر متقابل دوگانه محرک × زمان نمونه‌برداری، بیش‌ترین میزان آسکوربات پراکسیداز (۰/۹۱۶، ۰/۸۷۹ و ۰/۸۳۱ و ۰/۸۲ میکرومول) به ترتیب برای دی اکسید روی با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۷۲ و ۴۸ ساعت نمونه برداری، دی اکسید تیتانیوم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت نمونه برداری، دی اکسید روی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۷۲ ساعت نمونه برداری و کم‌ترین میزان آسکوربات پراکسیداز (۰/۰۶۳ میکرومول) در غلظت ۱۰۰ میکرومول متیل جاسمونات با زمان ۷۲ ساعت بعد از

اعمال محرک مشاهده گردید (شکل ۳).

تغییرات گلوتاتیون ردوکتاز (GR)

در مقایسه میانگین‌های اثر متقابل دوگانه محرک × زمان نمونه‌برداری، بیش‌ترین میزان گلوتاتیون ردوکتاز (۰/۳۳۲، ۰/۳۰۶ و ۰/۲۹ و ۰/۲۹۶ واحد) به ترتیب برای دی اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت نمونه برداری، دی اکسید سریم با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۲۴ ساعت نمونه برداری و کم‌ترین میزان گلوتاتیون ردوکتاز (۰/۰۲۸ واحد) در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۴- تاثیر نانوذرات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در شاهدانه. میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون برای هر صفت بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig 4. Effect of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate on Glutathione Reductase in hemp. Means with the same letters is not significant at 0.01 level of Duncan test.

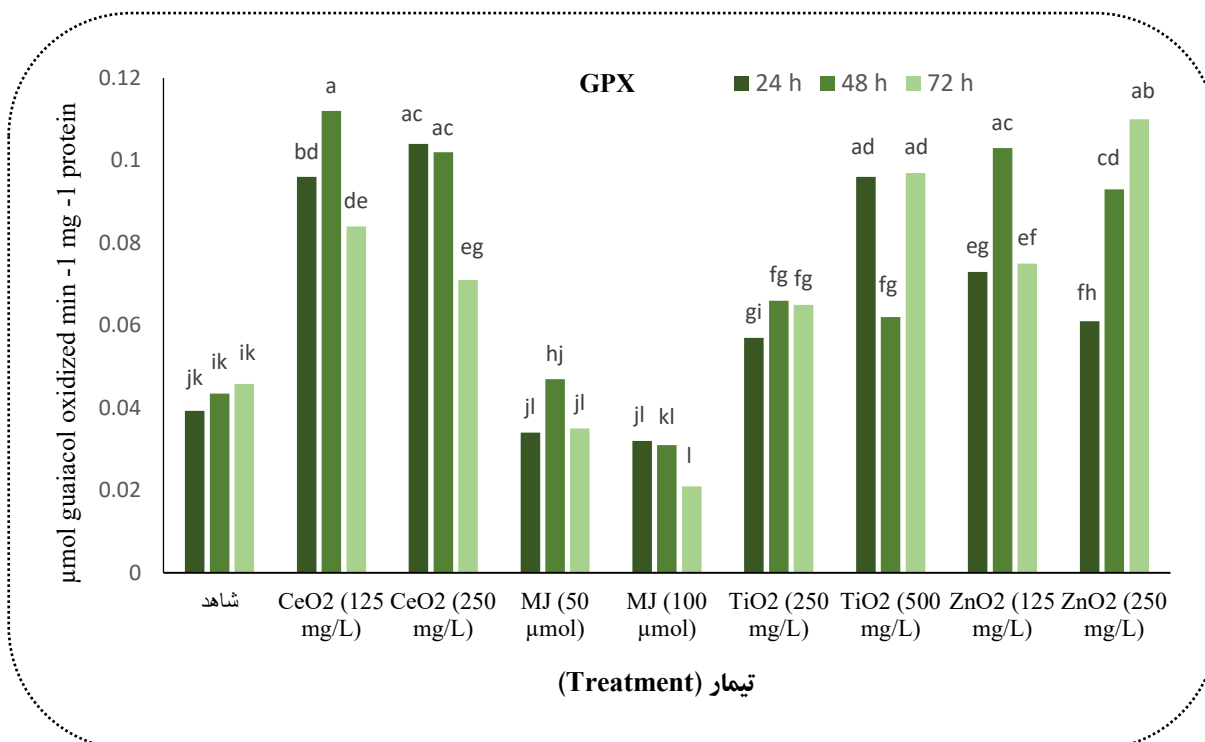
گایاکول پراکسیداز (GPX)

در مقایسه میانگین‌های اثر متقابل دوگانه محرک × زمان نمونه‌برداری، بیش‌ترین میزان گایاکول پراکسیداز (۰/۱۱۲، ۰/۱۱۰ و ۰/۱۰۴ و ۰/۱۰۳ میکرومول) به ترتیب

برای دی اکسید سریم با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت نمونه برداری، دی اکسید روی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۷۲ ساعت نمونه برداری، دی اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پس از ۲۴

جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومول پس از ۷۲ ساعت نمونه برداری مشاهده گردید (شکل ۵).

ساعت نمونه برداری و دی اکسید روی با غلظت ۱۲۵ میلی گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت نمونه برداری و کمترین میزان گایاکول پراکسیداز (۰/۰۲۱ میکرومول) در تیمار متیل



شکل ۵- تاثیر نانوذرات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز در شاهدانه. میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون برای هر صفت بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Fig 5. Effect of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate treatment on Guaiacol Proxidase in hemp. Means with the same letters is not significant at 0.01 level of Duncan test.

خسارت به پروتئین‌های غشاء سلولی نقش حفاظتی مهمی برای گیاه داشته باشد. محتوای پروتئین محلول، شاخص مهمی جهت رشد گیاه محسوب می‌شود. افزایش پروتئین همچنین می‌تواند به علت تولید پروتئین‌های مرتبط با پاسخ دفاعی، آنتی اکسیدانی و ذخیره‌ای باشد تا گیاه از آسیب‌های تنش حفظ گردد (Alharby et al., 2016). افزایش پروتئین با استفاده از نانوذره سریم می‌تواند به این علت باشد که نانو ذرات اکسید سریم شکل اکسید شده عنصر سریم می‌باشد که به جهت تغییرات جای خالی اکسیژن سطحی و آرایش ظرفیتی می‌توانند فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را تقلید کنند، بنابراین قادر هستند به عنوان جاروب کننده‌های گونه‌های اکسیژن

سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

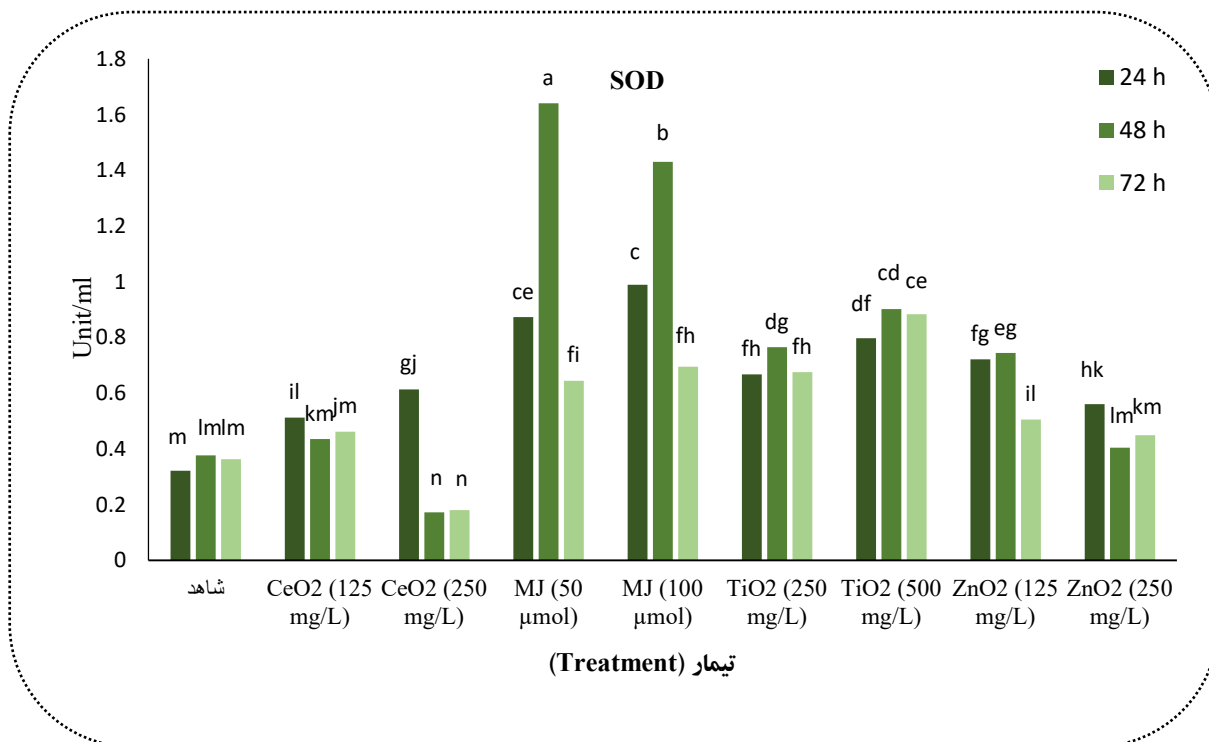
در مقایسه میانگین‌های اثر متقابل دوگانه محرک × زمان نمونه برداری، بیشترین سوپراکسید دیسموتاز (۱/۶۴ و ۱/۴۳ واحد) به ترتیب برای متیل جاسمونات با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت نمونه برداری و کمترین میزان سوپراکسید دیسموتاز (۰/۱۷۳ و ۰/۱۸) واحد) در تیمار دی اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه برداری مشاهده گردید (شکل ۶).

بحث

افزایش پروتئین کل در این تحقیق می‌تواند با مهار

بیش تر سطح به حجم افزایش پیدا می کند (Celardo et al., 2011).

واکنش پذیر (ROS) در بسیاری از زمینه های بیولوژیک عمل کنند. این ویژگی سریم در مقیاس نانو به دلیل نسبت



شکل ۶- تاثیر نانوذرات روی، سریم و تیتانیوم و متیل جاسمونات بر میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شاهدانه. میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون برای هر صفت بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

Fig 6. Effect of zinc, cerium and titanium nanoparticles and methyl-jasmonate on Superoxide dismutase in hemp. Means with the same letters is not significant at 0.01 level of Duncan test.

همکاران، ۱۳۹۷؛ Kumari et al., 2006). در گزارشی دیگر فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز در تیمارهای نانوذرات دی اکسید سریم بیش تر از فعالیت آن ها در تیمارهای اکسید روی در گیاه لوبیا بود (صالحی و همکاران، ۱۳۹۸). در بررسی دیگر روی گیاهچه ذرت، بیش ترین میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و مقدار پرولین در شرایط تنش شوری و استفاده از تیمار روی مشاهده شد (رشیدی فرد، ۱۳۹۹). در گزارش Amirjani و همکاران (۲۰۱۴) اعلام شد تیمار گیاه پریش با نانوذره روی سبب افزایش فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز می شود. در آزمایش نجفی وفا و همکاران (۱۳۹۹) نیز بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و آنزیم کاتالاز در محلول پاشی ۲ گرم در

پایین بودن سطح پروتئین برگ در استفاده از سایر محرک ها می تواند ناشی از وجود نداشتن اثرات سمی نانوذره در سلول بر سطح برگ باشد. این بررسی با نتایج Moaveny (۲۰۱۱) روی گیاه همیشه بهار مطابقت دارد و در بررسی او فعالیت کاتالاز با به کار بردن تیتانیوم به صورت معنی داری افزایش یافت. در بررسی Martinez (۱۹۹۳) نیز مشخص شد تیتانیوم باعث افزایش فعالیت کاتالاز می گردد. در بررسی مزارعی مشخص شد که با افزایش مصرف تیتانیوم (۰، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) میزان آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد روند افزایشی که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در یک بررسی دیگر اعلام شد غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات موجب افزایش کاتالاز، در بادام زمینی می شود (مزارعی و

لیتر نانوکلات روی مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مطابقت ندارد. همچنین در بررسی روی گیاه نخود مشخص شد که در گیاهان تحت تاثیر تیمارهای مختلف روی، میزان آنزیم کاتالاز تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر افزایش می یابد (Pandey, 2012). در بررسی نجفی وفا و همکاران (۱۳۹۹) بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط محلول پاشی ۲ گرم در لیتر نانو کلات روی مشاهده شد. در این بررسی دلیل بالا رفتن میزان آنزیم کاتالاز نقش ساختاری روی در این آنزیم ها و نقش مستقیم آن در بیان ژن و ساخت پروتئین ها بود. با توجه به اینکه کاربرد تیتانیوم، محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدهید و همچنین اثرات مخرب بالارفتن رادیکال های آزاد و میزان نشت الکترولیت در سلول های گیاهی را کم می کند و یون آهن به عنوان گروه پروستتیک در هموپروتئین هایی مانند کاتالاز، پروکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در نابودی رادیکال های آزاد اکسیژن در گیاه نقش دارد و نیز با توجه به بررسی های محققین به نظر می رسد افزایش کاتالاز به دلیل افزایش جذب آهن باشد. این نتایج با بررسی کرامت و همکاران (۱۳۹۱) که اعلام کردند با به کار بردن متیل جاسمونات، میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به شاهد کاهش می یابد تطابق دارد اما با بررسی مزارعی و همکاران، که در مطالعه ای بیان کردند با افزایش مصرف تیتانیوم (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) و متیل جاسمونات (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز، نسبت به شاهد روند افزایشی داشت مطابقت ندارد (مزارعی و همکاران، ۱۳۹۷).

از آن جا که فلز روی به عنوان فعال کننده و کوفاکتور برخی آنزیم های حیاتی گیاه از جمله دهیدروژناز و RNA پلیمراز، در متابولیسم پروتئین ها، قندها، اسیدهای نوکلئیک، چربی ها، فنوستنز گیاه و بیوستنز اکسین نقش دارند و تجمع پایین روی سبب می شود تا سیستم آنٹی-اکسیدانی گیاه قادر به از بین بردن رادیکال های آزاد باشد، اما در صورت تجمع بالای گونه های فعال اکسیژن بر

سیستم آنٹی اکسیدانی غلبه می کند. به نظر می رسد که در این بررسی میزان نانوذره روی، تجمع بالایی در گیاه داشته و میزان آنزیم آسکوربات پراکسیداز به همین دلیل افزایش یافته است و سایر محرک ها تجمع قابل تحملی در گیاه داشته اند (زارع و اسرار، ۱۳۸۷؛ Rion and Allowey, 2004). همچنین گزارش شده است نانو ذرات اکسید روی باعث القای ژن *AtKCI* و *AtCHX17* در ریشه و قسمت هوایی آرابیدوپسیس شد که این ژن ها مسئول حفظ هوموستاز مواد معدنی و یون ها هستند. این نتایج بیان می کند که گیاهان تنش غیرزیستی را با افزایش ساخت برخی پروتئین ها خنثی می کنند (Nair and Chung, 2015).

نتایج به دست آمده از این تحقیق با مطالعه مزارعی و همکاران (۱۳۹۷) که در آن بیان شد با افزایش مصرف تیتانیوم (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به شاهد روند افزایشی داشت مطابقت دارد. محققین دیگری نیز بیان نموده اند که متیل جاسمونات اثری بر فعالیت گایاکول پراکسیداز در تاتوره نداشت. در یک گزارش دیگر نیز، اعلام شده تیمار گیاه پریش با نانوذره روی سبب افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز می شود (Hare and Walling 2006; Amirjani, Askari and Askari 2014). نتایج مطالعه Moaveni و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که بیشترین فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در محلول پاشی تیتانیوم ۰.۰۳ درصد و کمترین مربوط به شاهد بود. در مطالعه مزارعی و همکاران (۱۳۹۷) نیز بیان شد که با افزایش مصرف تیتانیوم (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) میزان آنزیم دیسموتاز نسبت به شاهد روند افزایشی داشت، همچنین در این تحقیق بیان شد که با افزایش مصرف متیل جاسمونات (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر) میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش می یابد (مزارعی و همکاران، ۱۳۹۷). Kumari و همکاران (۲۰۰۶) بیان کرده اند که متیل جاسمونات سطوح رادیکال های آزاد را از طریق افزایش آنٹی اکسیدان ها کاهش می دهد و غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰

روی در این آنزیم‌ها و نقش مستقیم آن در بیان ژن و ساخت پروتئین‌ها بود. عنصر روی در فتوسنتز، تقسیم سلولی و طویل شدن سلول، حفظ ساختمان و عملکرد غشای سلولی، افزایش هورمون تحریک کننده رشد و باروری گیاهان و تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. روی یک کوفاکتور ضروری برای تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسیددیسموتاز و افزایش طول ریشه می‌باشد و می‌تواند برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژنی که در اثر تنش‌های محیطی در گیاه به وجود می‌آید مؤثر باشد.

منابع

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. In Methods in Enzymology, 105: 121-126.

Alharby, H. F., Metwali, E. M., Fuller, M. P., and Aldhebiani, A. Y. 2016. The alteration of mRNA expression of SOD and GPX genes, and proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under stress of NaCl and/or ZnO nanoparticles. Saudi Journal of Biological Sciences, 23(6): 773-781.

Amirjani, M.R., Askari, M., and Askari, M. 2014. The effect of nano oxide zink on the amount of alkaloids enzymatic and non-enzymatic antioxidants and some indicator of physiology Catharantus. Cells and Tissues Journal, 5(2): 173-183.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.

Brouki milan, E., Hassni, L., Abdollahi Mandoulakani, B., Darvishzadeh, R., Kheradmand, F., and Hassani, A. 2016. The effect of different concentrations of methyl jasmonate on the activity of antioxidant enzymes and total protein in basil. *Journal of Crops Improvement*, 18(1): 103-115.

Celardo, I., Pedersen, J. Z., Traversa, E., and Ghibelli, L. 2011. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*, 3(4):1411-1420.

Comparot, S. M., Graham, C. M., and Reid, D. M. 2002. Methyl jasmonate elicits a differential antioxidant response in light-and dark-grown canola (*Brassica napus*) roots and shoots. *Plant Growth Regulation*, 38(1): 21-30.

میکرومولار متیل جاسمونات موجب افزایش سوپراکسیددیسموتاز، در بادام زمینی می‌شود. در گزارشی دیگر افزایش مصرف متیل جاسمونات تا ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان شد. در بررسی دیگر بیان شد که افزایش متیل جاسمونات سبب افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان می‌شود (Parra-Labato et al., 2009; Broooke Melan, et al. 2016).

نجفی وفا و همکاران (۱۳۹۹) بیان نمودند که اثر مقادیر مختلف کود نانو روی و اثر متقابل تیمارها روی آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. در بررسی Amirijani و همکاران (۲۰۱۴) اعلام شد تیمار گیاه پرپوش با نانوذره روی سبب افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز می‌شود. همچنین گزارش شده است که متیل جاسمونات بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه آراییدوپسیس نقش دارد. در بررسی دیگری نیز مشخص شد متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه آراییدوپسیس، کلزا و بادام زمینی تاثیر گذار بوده است (کرامت، ۱۳۹۱؛ Comparot et al., 2002).

فلز روی به همراه مس بخش اصلی آنزیم سوپراکسیددیسموتاز را به عنوان حذف کننده رادیکال‌های آزاد تشکیل می‌دهد (Rion and Alloway, 2004; Franklin et al., 2007). در این راستا قنبری و همکاران (۱۴۰۱) نیز گزارش کردند که بیشترین میزان فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و غلظت پرولین از تیمار محلول‌پاشی هم‌زمان نانو کلات‌های مس و روی به‌دست آمد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که سمی بودن فلز روی در غلظت بالا به دلیل این است که این ترکیب، با مهار فرایند انتقال الکترون فتوسنتزی، به عنوان یک تولید کننده فعال رادیکال‌های سمی اکسیژن سلول عمل می‌کند و همچنین به صورت غیرمستقیم با کاهش جذب و جابه‌جا کردن آهن در گیاه واکنش‌های اکسیداتیو را راه‌اندازی می‌کند (Alia Prasad, 1995). در مطالعه Bady و Jini (۲۰۱۱) دلیل بالا رفتن میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش ساختاری

Nutrition, 16(5): 975-981.

Mazarie, A., Mousavi-nik, S. M., Ghanbari, A., and fahmideh, L. 2019. Effect of different spraying concentrations of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on some physiological traits and antioxidant system activity of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*, 11(1): 1-22.

Misra, H. and Fridovich, I., 1972. The generation of superoxide radical during auto oxidation. *Journal of Biology and Chemistry*, 247: 6960-6966.

Moaveni, P., Lotfi, M., Farahani, M. K., and Maroufi, K. 2011. Effect of spraying TiO₂ nano particles on some of physiological and chemical parameters in maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Bioscience*, 1(4), 63-67.

Nair, P. M. G., and Chung, I. M. 2015. Changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2): 350-361.

Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., and Kumar, D. S. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179(3): 154-163.

Najafi vafa, Z., Sirousmehr, R., and Bijhani, M. 2020. Effect of different levels of humic acid and nano-zinc fertilizer on the antioxidant enzyme activities and essential oil of Savory (*Satureja hortensis* L.). *Journal of Horticultural Plants Nutrition*, 3(2): 43-58.

Nakano, Y., and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1): 131-140.

Pandey, N., Gupta, B., and Pathak, G. C. 2012. Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2): 198-205.

Pandey, N., Singh, A. K., Pathak, G. C., and Sharma, C. P. 2002. Effect of zinc on antioxidant response in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(8): 954-956.

Parra-Labato, M.C., Fernandez-Garcia, N., Olmas, E., Alvares-Tinaut, M., and GomezJimenez, C. 2009. Methyl jasmonate-induced antioxidant defence in root apoplast from sun flower seedling. *Environmental and Experimental Botany*, 9-17.

Davari, A., Solouki, M., and Fazeli-Nasab, B. 2018. Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis*. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 5(4): 1-20.

Flores-Sanchez, I. J., and Verpoorte, R. 2008. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry reviews*, 7(3): 615-639

Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., and Casey, P. S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24): 8484-8490.

Ghanbari, M., Mokhtassi-Bidgoli, A., Talebi-Siahsaran, P., and Moradi-Latmahaleh, R. 2022. Evaluation of leaf yield, physiological and biochemical characteristics of Green Tea (*Camellia sinensis* L.) in response to different irrigation regimes and foliar application of Cu and Zn nano-Chelate. *Journal of Horticultural Plants Nutrition*, 5(1): 28-43.

Gawande, M. B., Goswami, A., Felpin, F. X., Asefa, T., Huang, X., Silva, R. and Varma, R. S. 2016. Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. *Chemical Reviews*, 116(6): 3722-3811.

Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.

Keramat B, and Daneshmand F. 2012. Dual role of methyl jasmonate in physiological responses of soybean (*Glycine max* L.) plant. *Plant Process and Function*, 1 (1):25-37.

Khalilvand Behrouzfar, E. 2020. Effect of nano-TiO₂ foliar application on ear weight and some of biochemical characteristics of sweet corn (*Zea mays* var *saccharata*) under water deficit stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 13(2): 491-502.

Kumari, G.J., Reddy, A.M., Naik, S.T., Kumar, S.G. and Parasanthi, J. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum* 219-226.

Martínez-Sánchez, F., Nunez, M., Amoros, A., Gimenez, J. L., and Alcaraz, C. F. 1993. Effect of titanium leaf spray treatments on ascorbic acid levels of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal of Plant*

nanoparticles on the element accumulation, growth and biochemical parameters in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Research*, 32(2): 390-405.

Turkan, I. 2011. Plant responses to drought and salinity stress: developments in a post-genomic era. Academic Press.

Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smith, B. N. 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 121(5): 453-461.

Zare-Dehabadi, S., and Asrar, Z. 2009. Effect of excess zinc on the concentration of some mineral element and antioxidant responses of spearmint (*Mentha spicata* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 24(4): 530-540.

Prasad, K. V. S. K., and Saradhi, P. P. 1995. Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus. *Phytochemistry*, 39(1): 45-47.

Prasad, M. N., and Strzalka, K. 2013. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Springer Science & Business Media.

Rion, B., and Allowey, J. 2004. Fundamental aspects of zinc in soils and plants. *International Zinc Association*, 1-128.

Saisavoey, T., Thongchul, N., Sangvanich, P., and Karnchanatat, A. 2014. Effect of methyl jasmonate on isoflavonoid accumulation and antioxidant enzymes in *Pueraria mirifica* cell suspension culture. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(9): 401-407.

Salehi, H., Chehregani Rad, A., Majd, A., and Gholami, M. 2019. Effect of ZnO and CeO₂