

Biochemical Characteristics and Medicinal Value of Some Native Plant Species in Khuzestan Province

Pages
53-70

A. Galavi¹, H. Sobhanian^{2*}, S. Bazzi³, and E. Yazdanpanah⁴

1, 2, 3 & 4) Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran.

*Corresponding author: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir

Received date: 2024.06.30

Accepted date: 2024.10.05

Abstract

In this study, zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) were synthesized using the green synthesis method with *Malva sylvestris* extract, and their effects on certain physiological and morphological characteristics of *Trigonella foenum-graecum L.* were investigated. Green synthesis is considered a sustainable, non-toxic, and environmentally friendly approach due to its reliance on plant-derived bioactive compounds. X-ray diffraction (XRD) and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) confirmed that the synthesized nanoparticles had an approximate size of 40 nm. The experiment was conducted in a completely randomized design with six ZnO-NPs concentration levels (0, 10, 20, 30, 40, and 50 mg/l) and three replications. The results showed that nanoparticle concentration had no significant effect on shoot and root fresh weight. The highest shoot dry weight was observed at 40 mg/l and 50 mg/l. Additionally, the greatest shoot and root lengths were recorded at 30 mg/l, while the lowest values were found in the control group. Chlorophyll a, b, and total chlorophyll content were highest in the control plants, and carotenoid content showed no significant changes. The highest total protein content was recorded at 20 mg/l, while the highest ascorbate peroxidase activity was observed at 10 mg/l. Catalase and peroxidase enzyme activities did not show significant variations.

Keywords: Phytochemical compounds, Antioxidant activity, Ascorbate peroxidase and Oxidative stress.

سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه پنیرک و تأثیر آن بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژی و

مورفولوژی گیاه *Trigonella foenum-graecum* L.

شماره صفحات

۵۳-۷۰

علیرضا گلوی^۱، حمید سبحانیان^{۲*}، صفورا بزی^۳ و عنایت‌الله یزدان‌پناه^۴

۱، ۲، ۳ و ۴) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: hamid.sobhanian@pnu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۰

چکیده

در این پژوهش، نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) به روش سنتز سبز و با استفاده از عصاره گیاه پنیرک (*Malva sylvestris*) تولید و تأثیر آن بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژی و مورفولوژی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) بررسی شد. سنتز سبز به دلیل استفاده از ترکیبات زیستی گیاهان، روشی پایدار، غیرسمی و سازگار با محیط‌زیست محسوب می‌شود. نتایج پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) نشان داد که نانوذرات تولیدشده دارای اندازه‌ای در حدود ۴۰ نانومتر هستند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش سطح غلظت ZnO-NPs (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت نانوذرات تأثیر معناداری بر وزن تر اندام هوایی و ریشه نداشت. بیشترین وزن خشک اندام هوایی در غلظت‌های ۴۰ mg/l و ۵۰ mg/l مشاهده شد. همچنین، بیشترین طول اندام هوایی و ریشه در غلظت ۳۰ mg/l و کمترین مقدار در نمونه شاهد بود. کلروفیل a، b و کلروفیل کل در نمونه شاهد بیشترین مقدار را داشتند، داده‌های مربوط به مقدار کاروتنوئید نیز معنادار نبود. بیشترین مقدار پروتئین کل در غلظت ۲۰ mg/l و بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در ۱۰ mg/l مشاهده شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تغییر معناداری نشان ندادند. به‌طور کلی، نانوذرات اکسید روی سنتز شده با عصاره پنیرک تأثیر مثبتی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژی و مورفولوژی شنبلیله داشتند، اما تأثیرات این نانوذرات وابسته به غلظت بوده و اثرات متغیری بر محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فیتوشیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آسکوربات پراکسیداز و تنش اکسیداتیو.

مقدمه

نانوفناوری یکی از حوزه‌های پیشرفته علمی است که به بررسی و استفاده از مواد در ابعاد نانومتری (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) می‌پردازد. این فناوری در دهه‌های اخیر به‌طور گسترده‌ای توسعه یافته و نانوذرات مختلفی مانند نانوذرات فلزی، اکسید فلزی و کربنی در صنایع گوناگون، از پزشکی تا کشاورزی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Husen, 2019). یکی از مهم‌ترین نانوذرات در این حوزه، نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) است که به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، از جمله فعالیت ضد میکروبی، خاصیت فتوکاتالیستی و زیست‌سازگاری، در صنایع مختلف به کار می‌رود (Bala *et al.*, 2015). امروزه، تولید نانوذرات اکسید روی به دلیل کاربردهای گسترده و متنوع آن افزایش یافته است (Hamed *et al.*, 2023). روی، به عنوان یک عنصر کم‌مصرف ضروری، نقش مهمی در رشد و توسعه گیاهان دارد و در فرآیندهای کلیدی مانند فتوسنتز و عملکرد آنزیم‌ها مشارکت می‌کند (Dhoke *et al.*, 2013). باتوجه به اهمیت این عنصر در متابولیسم گیاهی، استفاده از ZnO-NPs به‌عنوان کودهای نانو می‌تواند کارایی جذب روی را در گیاهان افزایش داده و به بهبود رشد و عملکرد آن‌ها کمک کند (Elsherif *et al.*, 2023). نانوذرات به روش‌های مختلفی از جمله شیمیایی، فیزیکی و زیستی تولید می‌شوند (Ghoshal & Singh, 2022). در سال‌های اخیر، سنتز نانوذرات از طریق روش‌های دوستدار محیط‌زیست به دلیل هزینه پایین، سهولت تولید در شرایط معمولی، عدم سمیت و سازگاری با محیط‌زیست محبوبیت زیادی پیدا کرده است (Bala *et al.*, 2015). سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از ارگانوسم‌های مختلفی مانند گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها ممکن است (Cai *et al.*, 2022). در این روش، میکروارگانوسم‌ها، آنزیم‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌عنوان عوامل اصلی تولید نانوذرات به کار می‌روند. این رویکرد با بهینه‌سازی مصرف مواد اولیه و فرایند تولید، اثرات منفی کمتری بر محیط‌زیست دارد و بهره‌وری منابع طبیعی را افزایش می‌دهد، درحالی‌که به حفظ محیط‌زیست نیز کمک می‌کند (Dejene & Geletaw, 2023). به همین دلیل، رویکردهای سازگار با محیط‌زیست مانند سنتز سبز نانوذرات، که از عصاره‌های گیاهی به عنوان عوامل کاهنده و پایدارکننده استفاده می‌کنند، به عنوان جایگزین‌های مناسبی برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی پیشنهاد شده‌اند (Radwan *et al.*, 2021). گیاه پنیرک (*Malva Sylvestris*) به دلیل داشتن ترکیبات زیست‌فعال نظیر فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و تانن‌ها، توانایی بالایی در سنتز زیستی نانوذرات دارد (Benhammada & Trache, 2022). این گیاه به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد میکروبی، از گذشته‌های دور در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان عوامل پایدارکننده در فرآیند سنتز نانوذرات به کار روند و در عین حال از سمیت مواد شیمیایی معمول در این فرآیندها جلوگیری کنند (Cai *et al.*, 2022). از سوی دیگر، نانوذرات تولید شده به روش سبز می‌توانند در کشاورزی به‌عنوان کودهای نانو مؤثر باشند و نقش مهمی در بهبود عملکرد گیاهان ایفا کنند (Rastogi *et al.*, 2017). تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که عصاره‌های برگ‌ها، پوست، ریشه، گل‌ها، میوه‌ها و دانه‌های گیاهان می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهش‌دهنده و تثبیت‌کننده برای سنتز نانوذرات اکسید روی عمل کنند (Dejene

Geletaw, 2023). یکی از گیاهان دارویی مهم که پتانسیل بالایی برای بررسی اثرات نانوذرات بر رشد و توسعه گیاهی دارد، شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum L.*) است. این گیاه از خانواده *Fabaceae* بوده و به دلیل خواص تغذیه‌ای و دارویی خود در مناطق مختلف جهان کشت می‌شود (Aasim et al., 2018). علاوه بر این، شنبلیله در پزشکی سنتی به‌عنوان عامل ضد دیابت و تقویت‌کننده سیستم ایمنی شناخته شده است (Wani & Kumar, 2018). در مطالعات مختلف، نانوذرات فلزی به روش‌های سبز تولید شده‌اند و کاربردهای متنوعی دارند. نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه پنیرک به روش سبز تولید شده است. این نانوذرات ویژگی‌های آنتی‌باکتریالی قوی دارند و می‌توانند در درمان عفونت‌های باکتریایی کاربرد داشته باشند. نتایج نشان می‌دهد که روش‌های سبز به تولید نانوذرات با پایداری بالا و کاربردهای مفید در پزشکی کمک می‌کنند (Mahmoodi Esfanddarani et al., 2018). همچنین بررسی ترکیبات اسانس گیاه *M. sylvestris* با استفاده از کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) نشان داد که این اسانس شامل ۳۴ ترکیب مختلف است که مهم‌ترین آن‌ها شامل اسید اولئیک (۱۸.۵٪)، اسید پالمیتیک (۱۱.۰۸٪)، فیتون (۶.۶۴٪)، p-وینیل‌گواکول (۶.۴٪) و فیتول (۴.۲۳٪) می‌باشد. در ادامه، از عصاره *M. sylvestris* برای سنتز زیستی نانوساختارهای نقره و اکسید نقره استفاده شد و ویژگی‌های نانوذرات سنتز شده با روش‌های مختلفی از جمله پراش پرتو ایکس (XRD)، تأییدی بر تشکیل نانوساختارهای نقره و اکسید نقره بود. این نانوذرات دارای شکل کروی و توزیع اندازه مناسبی بودند (Bekhradian et al., 2024). نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه *Sphagneticola trilobata* سنتز و تأثیر آن بر رشد گیاه شنبلیله بررسی شد. این نانوذرات باعث بهبود رشد گیاه و کاهش اثرات تنش شوری شدند، به ویژه باعث افزایش محتوای روی در ریشه گیاه شد (Shaik et al., 2020). تأثیر نانوذرات اکسید روی بر بهبود ویژگی‌های فیزیکی گندم تحت تنش شوری نیز بررسی شد. این نانوذرات به طور مؤثری پارامترهایی چون کلروفیل، ارتفاع بوته و عملکرد دانه گندم را افزایش داد (Adil et al., 2022). در مطالعه‌ای که بر روی سنتز سبز ZnO-NPs و کاربرد آنها بر روی گیاهان شنبلیله (*T. foenum-graecum L.*) انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تنش شوری باعث کاهش صفات مورفولوژی مانند طول ساقه و ریشه، تعداد شاخه و برگ و وزن بذر می‌شود. اما محلول‌پاشی نانوذرات اکسید روی و سولفات روی در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ ppm باعث بهبود این صفات و افزایش ویژگی‌های برداشت شد. ترکیب نانوذرات اکسید روی در 40 ppm با شوری 1500 ppm منجر به بالاترین وزن ۱۰۰ دانه و محتوای کل ساپونین شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که نانوذرات اکسید روی می‌توانند درمان مؤثری برای مقابله با اثرات شوری بر گیاهان شنبلیله باشند (Swafy & Abdallah, 2021). باتوجه به اهمیت نانوذرات اکسید روی در بهبود رشد گیاهان و همچنین ضرورت استفاده از روش‌های سنتز سازگار با محیط‌زیست، در این پژوهش به بررسی سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه پنیرک و تأثیر آن بر برخی پارامترهای فیزیولوژی و مورفولوژی گیاه شنبلیله پرداخته شده است. این مطالعه می‌تواند راهکاری نوین برای بهینه‌سازی استفاده از نانوذرات در کشاورزی ارائه دهد و درک بهتری از نقش نانوفناوری در بهبود عملکرد گیاهان دارویی فراهم کند.

مواد و روش

سننتز سبز نانوذرات اکسید روی

در این مطالعه، ZnO-NPs به روش سننتز سبز با استفاده از عصاره گل پنیرک (*M. sylvestris*) تولید شد. گلبرگ‌های گل‌های پنیرک پس از جمع‌آوری، جدا و در دمای اتاق در سایه خشک شدند. ۳ گرم گلبرگ خشک شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و برای ۱۵ دقیقه تحت حرارت قرار گرفت. عصاره بدست آمده پس از فیلتراسیون، به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار $Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ تهیه و ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره پنیرک به محلول نیترات روی ۰/۲ مولار اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. برای افزایش pH به ۱۲، محلول ۲ مولار NaOH به صورت قطره‌قطره اضافه گردید و مخلوط به مدت ۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از پایان مدت زمان، محلول سانتریفوژ شده، شسته و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. نانوذرات سننتز شده پس از خشک‌شدن در هاون ساییده شدند و تحلیل ساختار بلوری نانوذرات اکسید روی با استفاده از دستگاه XRD مدل D8 Advance Bruker AXS, Germany در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر در محدوده ۱۰ تا ۸۰ درجه 2θ انجام شد. همچنین ویژگی‌های مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل MIRA3 TESCAN-XMU, Czech Republic در ولتاژ ۱۵ کیلوولت بررسی شدند (Bazzi, 2021).

مراحل کشت گیاهان

بذرهای شنبليله از توده پاکوتاه اردستانی شرکت زر بذر ایرانیان تهیه شدند. برای تعیین غلظت بهینه نانوذرات اکسید روی، بذرهای در محلول‌های مختلف نانوذرات (شاهد، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. بذرهای شنبليله در مخلوطی از ۷۰٪ کوکوپیت و پرلیت و ۳۰٪ خاک لومی - رسی کشت شدند. دما و شرایط نوردهی آزمایشگاه به طور کنترل‌شده تنظیم شدند. ۲۱ روز پس از کشت، گیاهان برای اندازه‌گیری ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی برداشت شدند (Elsherif et al., 2023).

سنجش ویژگی‌های مورفولوژی و رشد

گیاهان به صورت تصادفی از هر واحد آزمایشی برداشت شد و پس از شستشو با آب مقطر، طول ریشه و ساقه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند. سپس گیاهان به دو بخش ریشه و اندام هوایی تقسیم شده و وزن تر هر بخش مشخص شد. پس از آن، گیاهان در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو روز در آون قرار گرفته و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد (Noohpishheh, 2019).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها بررسی شدند، مقدار ۰/۰۱ گرم برگ تازه شنبلیله در هاون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد همگن شد (Lichtenthaler, 1987). جذب محلول‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر JENWAY 6305, UK در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی، از فرمول‌های زیر استفاده می‌شود، در این فرمول‌ها A_{663} ، A_{645} ، A_{470} مقادیر جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر می‌باشند و مقادیر C_a ، C_b ، C_{a+b} و C_{x+c} به ترتیب نشان‌دهنده غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها می‌باشند.

$$C_a = A_{645} \times 5.19 - A_{663} \times 13.36 \quad \text{رابطه ۱:}$$

$$C_b = A_{663} \times 8.12 - A_{645} \times 27.43 \quad \text{رابطه ۲:}$$

$$C_{a+b} = A_{645} \times 22.24 + A_{663} \times 5.24 \quad \text{رابطه ۳:}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 \times A_{470} - 2.13 \times C_a - 97.64 \times C_b}{209} \quad \text{رابطه ۴:}$$

سنجش پروتئین‌های محلول کل

بر اساس روش ارائه‌شده توسط برادفورد (Bradford, 1976)، برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های محلول، مقدار ۰/۱ گرم از نمونه تازه گیاه در به طور کامل در بافر فسفات همگن شد. سپس پس از سانتریفوژ کردن در ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، محلول حاصل برای سنجش غلظت پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر PG Instrument ltd T80, UK در طول موج ۵۹۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD)

با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان تبدیل آن به تترایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز انجام گرفت. این سنجش با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان تبدیل آن به تترایاکول با ضریب خاموشی $25/5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر PG Instrument ltd T80, UK انجام شد (Chance & Maehly, 1955).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

در این سنجش بر اساس تجزیه H_2O_2 با ضریب خاموشی $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ و با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر PG Instrument ltd T80, UK صورت گرفت (Chance & Maehly, 1955).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

بر اساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز انجام گرفت. این سنجش با ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ و کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Instrument Ltd T80, UK+PG صورت گرفت (Boominathan & Doran, 2002).

آنالیز آماری داده‌ها

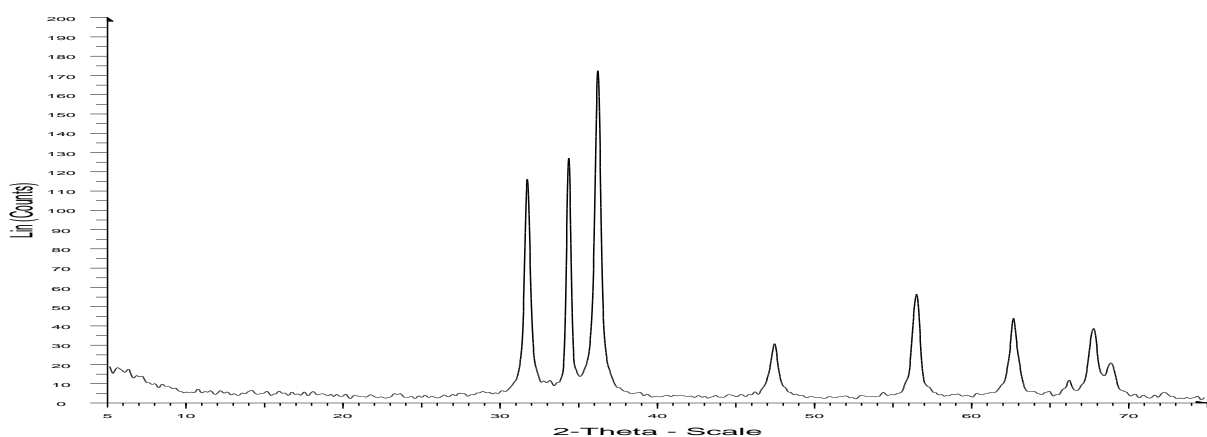
با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد و نتایج به صورت میانگین سه تکرار همراه با انحراف استاندارد (SD) گزارش شد. سطح معناداری تفاوت بین تیمارها با آزمون دانکن و آنالیز واریانس یک طرفه ($P \leq 0.05$) سنجش شد.

نتایج و بحث

نتایج سنتز سبز نانوذرات اکسید روی

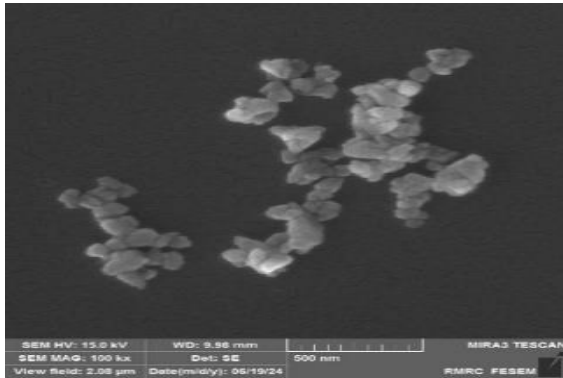
نتایج تجزیه و تحلیل پراش پرتو X (XRD)

تجزیه و تحلیل پراش پرتو X نانوذرات اکسید روی در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به فرمول $D = k\lambda / (\beta \cos\theta)$ که به عنوان فرمول شرر شناخته می‌شود، اندازه نانوذرات سنتز شده حدود $42/1$ نانومتر ارزیابی شد. در این فرمول، D اندازه نانوذرات، $k = 0.9$ ثابت شرر، $\lambda = 0.275$ طول موج اشعه ایکس برای تیتانیوم، θ زاویه پراش، و $FWHM = 0.354$ است. اطلاعات مربوط به $2\theta = 36.2182$ و سایر پارامترها از طریق نرم‌افزار X'Pert به دست آمده‌اند که برای آنالیز نمودار خروجی دستگاه XRD به کار می‌رود و β از طریق فرمول $\beta = (\pi \times FWHM) / 180$ محاسبه می‌شود.



شکل ۱- طیف XRD نانوذرات اکسید روی سنتز شده با استفاده از عصاره گل پنیرک (*M. sylvestris*)

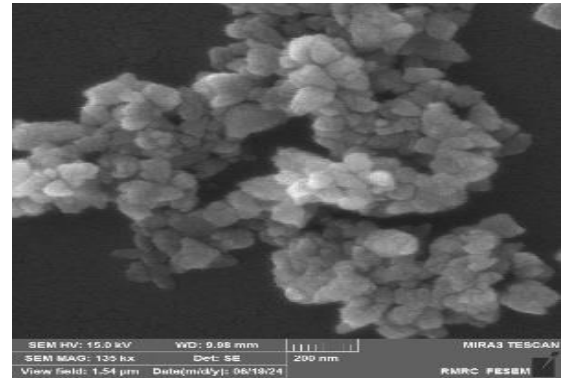
Figure 1. XRD pattern of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Malva sylvestris* (common mallow) flower extract



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM از

نانوذرات اکسید روی (بزرگنمایی ۲۰۰ nm)

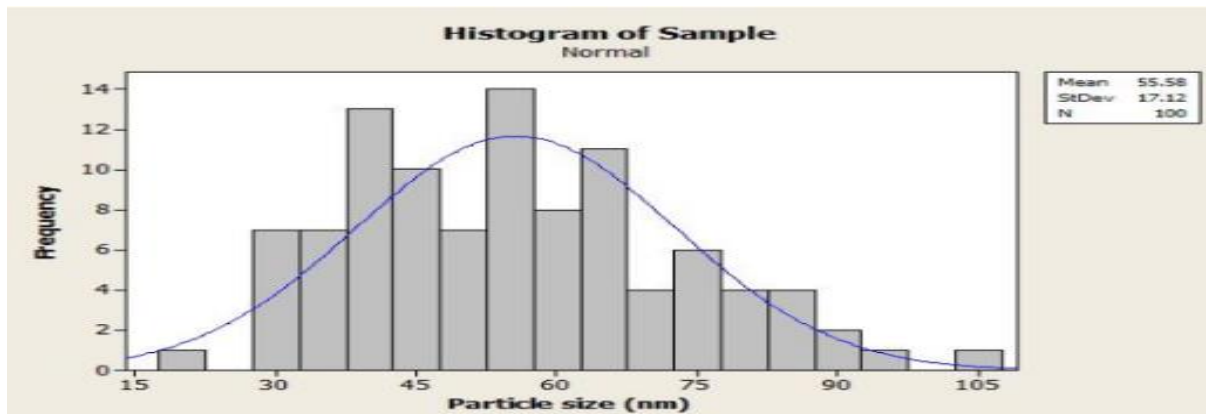
Figure 2. Field Emission Scanning Electron Microscopy image of zinc oxide nanoparticles at 200 nm magnification.



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM از

نانوذرات اکسید روی (بزرگنمایی ۵۰۰ nm)

Figure 3. Field Emission Scanning Electron Microscopy image of zinc oxide nanoparticles at 500 nm magnification.



شکل ۴- نمودار توزیع فراوانی اندازه نانوذرات اکسید روی

Figure 4. Frequency distribution histogram of zinc oxide nanoparticle sizes

بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM)

تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) به وضوح نشان می‌دهند که نانوذرات اکسید روی دارای ساختار شش‌ضلعی می‌باشند (شکل ۲ و ۳). علاوه بر تصاویر، هیستوگرام توزیع نانوذرات اکسید روی (شکل ۴) نیز بر اساس داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ FE-SEM ارائه شده است. این هیستوگرام به تجزیه و تحلیل آماری توزیع اندازه نانوذرات کمک می‌کند و به وضوح توزیع اندازه‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس این هیستوگرام، میانگین قطر نانوذرات اکسید روی که از داده‌های تصویری FE-SEM استخراج شده است، تقریباً ۴۰ نانومتر برآورد شده است.

اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به اندام هوایی

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس به دست آمده از داده‌های مربوط به آنالیز شاخص‌های مربوط به اندام هوایی گیاه نشان می‌دهد

که اثر غلظت نانوذرات بر شاخص‌های مختلف اندام هوایی چگونه است. طبق جدول اثر نانوذرات بر وزن تر اندام هوایی در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنادار نبوده است؛ اما غلظت نانوذرات بر وزن خشک اندام هوایی و طول اندام هوایی در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنادار بوده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس و سطح معنادار بودن اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به اندام هوایی گیاه شنبلیله

Table 1. Analysis of variance and significance levels of zinc oxide nanoparticles' effects on aerial part indices of fenugreek plant

میانگین مربعات Mean Square				منابع تغییرات S.O.V
طول اندام هوایی Shoot Length (cm)	وزن خشک اندام هوایی Dry Weight (mg)	وزن تر اندام هوایی Fresh Weight (mg)	درجه آزادی df	
1.948 *	37.948 *	2306.833 ^{ns}	5	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration
0.736	12.809	1216.669	48	خطا آزمایش Error

* و ns: به ترتیب بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

*** , and ns: indicate statistically significant differences at the 5% level, and non-significant differences, respectively**

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر ویژگی‌های مربوط به اندام هوایی

باتوجه به داده‌های جدول بیشترین وزن خشک اندام هوایی در غلظت ۴۰ mg/l و ۵۰ mg/l مشاهده شد. در طول اندام

هوایی بیشترین طول مربوط به غلظت ۳۰ mg/l بود.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر نانو ذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به اندام هوایی گیاه شنبلیله

Table 2. Mean comparison of zinc oxide nanoparticles' effects on aerial part indices of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

طول اندام هوایی (cm) Shoot Length (cm)	وزن خشک اندام هوایی (mg) Dry Weight (mg)	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration
4.61 ± 0.79 a	14.16 ± 3.63 ab	0
4.68 ± 0.9 a	12.42 ± 3.65 a	10
5.25 ± 0.86 ab	13.61 ± 3.81 ab	20
5.83 ± 0.63 b	11.11 ± 1.67 a	30
5.27 ± 0.84 ab	16.25 ± 4.16 b	40
4.81 ± 1.04 a	16.23 ± 3.95 b	50

داده‌ها شامل میانگین سه تکرار و انحراف استاندارد SD می‌باشند. حروف متفاوت روی هر ستون، تفاوت معنادار بین تیمارها را در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) نشان می‌دهند.

Data represent mean values of three replicates ± standard deviation (SD). Different lowercase letters above columns indicate statistically significant differences between treatments at $P \leq 0.05$

اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به ریشه

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس به دست آمده از داده‌های مربوط به آنالیز شاخص‌های مربوط به ریشه گیاه نشان می‌دهد که اثر غلظت نانوذرات بر شاخص‌های مختلف ریشه چگونه است طبق جدول اثر نانوذرات بر وزن تر ریشه در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنادار نبوده است و غلظت نانوذرات بر وزن خشک ریشه در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنادار بوده است. طول ریشه در سطح ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنادار بوده است.

جدول ۳- تجزیه واریانس و سطح معنادار بودن اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به ریشه گیاه شنبلیله

Table 3. Analysis of variance and significance levels of zinc oxide nanoparticles' effects on root-related indices of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

میانگین مربعات Mean Square			درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
طول ریشه Root Length (cm)	وزن خشک ریشه Dry Root Weight (mg)	وزن تر ریشه Fresh Root Weight (mg)		
7.645 **	1.709 *	116.144 ns	5	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration
1.264	0.577	75.534	48	خطا آزمایش Error

ns، * و **: به ترتیب بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

** , * , and ns: indicate statistically significant differences at the 1% level, 5% level, and non-significant differences, respectively

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر ویژگی‌های مربوط به ریشه

باتوجه به داده‌های جدول تغییر غلظت نانوذرات بر وزن تر ریشه اثر معناداری نداشت. در متغیر وزن خشک ریشه نمونه‌های تحت تیمار نانوذرات اکسید روی تغییر معناداری نسبت به نمونه شاهد نشان می‌دهند. در حالیکه در غلظت‌های مختلف تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. بیشترین طول ریشه مربوط به غلظت ۳۰ mg/l و کمترین مربوط به نمونه شاهد است. نکته قابل توجه کاهش طول ریشه در غلظت‌های ۴۰ mg/l و ۵۰ mg/l می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به ریشه گیاه شنبلیله

Table 4. Mean comparison of zinc oxide nanoparticles' effects on root-related indices of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

طول ریشه Root Length (cm)	وزن خشک ریشه Dry Root Weight (mg)	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration
3.68 ± 0.98 a	1.64 ± 0.46 a	0
4.25 ± 1.01 ab	2.85 ± 0.98 b	10
5.1 ± 0.98 b	2.68 ± 0.53 b	20
6.33 ± 1.23 c	2.72 ± 0.63 b	30
5.3 ± 1.39 bc	2.47 ± 0.84 b	40
5.31 ± 1.06 bc	2.57 ± 0.93 b	50

داده‌ها شامل میانگین سه تکرار و انحراف استاندارد SD می‌باشند. حروف متفاوت روی هر ستون، تفاوت معنادار بین تیمارها را در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) نشان می‌دهند.

Data represent mean values of three replicates ± standard deviation (SD). Different lowercase letters above columns indicate statistically significant differences between treatments at $P \leq 0.05$

جدول ۵- تجزیه واریانس و سطح معنادار بودن اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به غلظت رنگیزه های گیاه شنبلیله

Table 5. Analysis of variance and significance levels of zinc oxide nanoparticles' effects on photosynthetic pigment concentrations in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg g ⁻¹ FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg g ⁻¹ FW)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg g ⁻¹ FW)	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration
4.62 ± 0.49 b	2.58 ± 0.56 b	2.04 ± 0.17 d	0
2.17 ± 0.24 a	1.04 ± 0.38 a	1.12 ± 0.2 a	10
2.53 ± 0.18 a	0.96 ± 0.08 a	1.56 ± 0.16 bc	20
1.91 ± 0.33 a	0.62 ± 0.07 a	1.28 ± 0.26 ab	30
2.29 ± 0.25 a	0.76 ± 0.05 a	1.52 ± 0.26 bc	40
2.92 ± 1.1 a	1.2 ± 0.95 a	1.71 ± 0.16 cd	50

داده‌ها شامل میانگین سه تکرار و انحراف استاندارد SD می‌باشند. حروف متفاوت روی هر ستون، تفاوت معنادار بین تیمارها را در سطح احتمال (P≤0.05) نشان می‌دهند.

Data represent mean values of three replicates ± standard deviation (SD). Different lowercase letters above columns indicate statistically significant differences between treatments at P ≤ 0.05

اثر نانوذرات اکسید روی بر غلظت رنگیزه ها

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس به دست آمده از داده‌های مربوط به آنالیز شاخص‌های مربوط به رنگیزه‌های گیاه شنبلیله نشان می‌دهد که اثر غلظت نانوذرات بر رنگیزه‌های مختلف چگونه است. طبق جدول اثر غلظت نانوذرات بر مقدار کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح ۱ درصد (P≤0.01) معنادار بوده است. اثر غلظت نانوذرات بر مقدار کاروتنوئید در سطح ۵ درصد (P≤0.05) معنادار نبوده است.

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر غلظت رنگیزه ها

مقدار کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل در نمونه شاهد بیشترین مقدار را داشتند، کلروفیل a در غلظت ۱۰ mg/l کمترین مقدار را نشان داد. مقدار کلروفیل b و کلروفیل کل در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی تغییر معناداری نداشته است.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به غلظت رنگیزه ها گیاه شنبلیله

Table 6. Mean comparison of the effects of zinc oxide nanoparticles on pigment concentration indices in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

میانگین مربعات Mean Square				منابع تغییرات S.O.V
کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg g ⁻¹ FW)	کاروتنوئید Carotenoids (mg g ⁻¹ FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg g ⁻¹ FW)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg g ⁻¹ FW)	
2.903 **	0.009 ns	1.511 **	0.309 **	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration df
0.290	0.036	0.231	0.044	خطا آزمایش Error

** و ns: به ترتیب بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

** and ns: indicate statistically significant differences at the 1% level and non-significant differences, respectively.

اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به غلظت پروتئین محلول کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج تجزیه واریانس به‌دست‌آمده از داده‌های مربوط به غلظت پروتئین محلول کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان می‌دهد که طبق جدول اثر نانوذرات بر پروتئین محلول کل در سطح ۱ درصد ($P \leq 0.01$) معنادار بوده است. میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنادار بوده است و اثر غلظت نانوذرات بر آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در سطح ۵ درصد ($P \leq 0.05$) معنادار نبوده است.

جدول ۷- تجزیه واریانس و سطح معنادار بودن اثر نانوذرات اکسید روی بر غلظت پروتئین محلول کل، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه شنبلیله

Table 7. Analysis of variance and significance levels of zinc oxide nanoparticles' effects on total soluble protein content and antioxidant enzymes in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

میانگین مربعات Mean Square				درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
آنزیم آسکوربات پراکسیداز APX (μUmg^{-1} protein)	آنزیم پراکسیداز PX (μUmg^{-1} protein)	آنزیم کاتالاز Catalase (μUmg^{-1} protein)	پروتئین محلول کل Total Soluble Protein (mg g ⁻¹ FW)		
1.157 **	0.732 ns	0.212 ns	3001.21 **	5	غلظت نانوذرات Nanoparticle Concentration
0.104	0.265	0.110	304.013	12	خطا آزمایش

** و ns: به ترتیب بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

** and ns: indicate statistically significant differences at the 1% level and non-significant differences, respectively.

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به غلظت پروتئین محلول کل و آنزیم‌های

آنتی‌اکسیدان

داده‌های جدول نشان می‌دهد بیشترین مقدار پروتئین محلول کل در غلظت ۲۰ mg/l است. مقدار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۱۰ mg/l بیشترین فعالیت و در غلظت ۴۰ mg/l کمترین فعالیت را نشان می‌دهد. نکته قابل توجه افزایش فعالیت این آنزیم در غلظت ۵۰ mg/l نانوذرات اکسید روی می‌باشد. اجزاء مختلف گیاهی مانند ریشه، برگ، ساقه، دانه، گل و میوه، همراه با فرآورده‌های حاصل از آن‌ها، برای سنتز نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) به کار گرفته شده‌اند. این امر به دلیل وجود ترکیبات فیتوشیمیایی متنوع در عصاره‌های گیاهی است که می‌توانند به‌عنوان عوامل کاهش‌دهنده و تثبیت‌کننده عمل کنند. (Husen, 2019). آنالیز اسانس گیاه *M. sylvestris* با استفاده از تکنیک GC/MS منجر به شناسایی ۳۴ ترکیب مختلف شد. ترکیبات غالب در این اسانس شامل اسید اولئیک، اسید پالمیتیک، فیتون، p- وینیل‌گواکول و فیتول بودند (Bekhradian et al., 2024). در یک مطالعه، از عصاره برگ *Calotropis gigantea* همراه با نمک ZnNO_3 برای تولید نانوذرات ZnO با اندازه‌های بین ۳۰ تا ۳۵ نانومتر استفاده شد (Vidya et al., 2013). همچنین، از عصاره آبی گل‌های افتاده *Jacaranda*

mimosifolia در سنتز این نانوذرات بهره گرفته شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اسید اولئیک در طی فرایند سنتز، به عنوان یک عامل تثبیت کننده و پوششی عمل می کند (Sharma et al., 2016). ترکیبات فنولی موجود در عصاره انار، شامل فلاونوئیدها، تانن های متراکم و تانن های قابل هیدرولیز، در سنتز نانوذرات ZnO نقش دارند (Barzinjy et al., 2020). ترکیبات گیاهی در این فرایند به عنوان عوامل کاهنده عمل کرده و موجب کاهش یون های فلزی و تشکیل نانوذرات ZnO می شوند (Xu et al., 2021). برای مشخصه یابی این نانوذرات، تکنیک هایی مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) و پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شده اند که در تعیین اندازه، شکل، ساختار کریستالی و ترکیب آن ها نقش دارند (Husen, 2019). بر اساس نتایج XRD و FE-SEM، اندازه نانوذرات ZnO تولید شده با عصاره گل گیاه پنیرک به همراه نمک نیترات روی، حدود ۴۰ نانومتر بود. در مطالعه ای که تأثیر غلظت های مختلف عصاره گل *Hibiscus sabdariffa* را بر سنتز سبز نانوذرات اکسید روی برای تجزیه فوتوکاتالیستی متیلن بلو ارزیابی نمود. نیترات روی به عنوان منبع یون های روی، برای سنتز نانوذرات استفاده شد. عصاره ها در محیط آبی به عنوان عامل های کاهنده و تثبیت کننده به کار رفتند. آنالیز XRD نشان داد که ماده سنتز شده دارای فاز بلوری شش ضلعی است. مورفولوژی نانوذرات ZnO بسته به عصاره استفاده شده، متغیر بوده و اندازه توزیع نانوذرات در بازه ۸ تا ۳۰ نانومتر قرار گرفت (Soto-Robles et al., 2019). نانوذرات ZnO می توانند به عنوان کودهای گیاهی عمل کرده و مواد مغذی را به صورت کنترل شده در دسترس گیاه قرار دهند نتایج این تحقیق نشان داد که خیساندن بذرهای شنبلیله در غلظت های مختلف ZnO-NPs، به طور معناداری رشد گیاه را تحت تأثیر قرار داده است. بیشترین افزایش طول اندام هوایی و ریشه در غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد، در حالی که وزن خشک ریشه و اندام هوایی نیز افزایش یافت، به ویژه در گیاهانی که در غلظت های ۴۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر تیمار شدند. در مطالعه ای روی لوبیا، کاربرد نانوذرات ZnO در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر موجب افزایش زیست توده و بخش هوایی گیاه شد (Dhoke et al., 2013). این امر به قابلیت ZnO-NPs در نفوذ به پوسته بذر و بهبود جذب عنصر روی نسبت داده می شود (Elsherif et al., 2023). در این مطالعه، مقدار کلروفیل a و کلروفیل b و کلروفیل کل در نمونه شاهد بیشترین مقدار را داشتند. در مطالعه ای دیگر تیمار نانوذرات ZnO بر گیاه شنبلیله نشان داد که غلظت های بالا منجر به کاهش محتوای کلروفیل های a و b شده و میزان رنگیزه های فتوسنتزی را کاهش می دهد (Chemingui et al., 2019). در پژوهش دیگری روی گوجه فرنگی، مشخص شد که تیمار با ZnO-NPs به طور وابسته به غلظت، رشد ریشه و ساقه را مهار کرده، میزان کلروفیل را کاهش داده و کارایی فتوسنتزی را کاهش می دهد، که این موضوع ناشی از کاهش بیان ژن های مرتبط با سنتز کلروفیل است (Wang et al., 2018). در مطالعات انجام شده بر گیاه گاوزبان، تیمار ZnO-NPs سبب کاهش محتوای پرولین و کلروفیل شد، که به افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و استرس اکسیداتیو نسبت داده شد (Hashemi et al., 2019). همچنین، در پژوهشی روی گندم مشخص شد که افزایش غلظت ZnO-NPs موجب

افزایش میزان عنصر روی در گیاه شد، اما مقادیر آهن و کلروفیل a کاهش یافت (Amirjani *et al.*, 2016). عنصر روی، یکی از اجزای کلیدی ریبوزوم است که در تنظیم بیان ژن و سنتز پروتئین نقش دارد. کمبود این عنصر می‌تواند منجر به کاهش سنتز پروتئین در گیاهان شود (Cakmak *et al.*, 1989). نتایج نشان داد که در غلظت‌های پایین، میزان پروتئین محلول کل افزایش یافت، اما در غلظت‌های بالاتر (۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، کاهش مشاهده شد (Ram *et al.*, 2007). کاهش معنی‌دار پروتئین محلول کل در غلظت‌های بالا می‌تواند ناشی از اتصال یون‌های اضافی روی به پروتئین‌ها و ایجاد سمیت باشد (Pasandi Pour *et al.*, 2014). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که نانوذرات ZnO می‌توانند بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه تأثیرگذار باشند. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت، درحالی‌که در سایر غلظت‌ها افزایش مشاهده شد. این موضوع نشان‌دهنده اهمیت غلظت مناسب نانوذرات در افزایش تحمل گیاهان است (Chemingui *et al.*, 2019). علاوه بر این، فعالیت آنزیم کاتالاز تغییر معناداری نداشت، که با یافته‌های تحقیقات پیشین سازگار است (Noohpishheh, 2019). نوع و غلظت نانوذرات، شرایط رشد گیاه و ترکیب محیط می‌توانند در افزایش یا کاهش فعالیت این آنزیم‌ها تأثیرگذار باشند (Bandyopadhyay *et al.*, 2015).

جدول ۸- مقایسه میانگین اثر نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های مربوط به غلظت پروتئین محلول کل، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه شنبليله

Table 8. Mean comparison of zinc oxide nanoparticles' effects on total soluble protein content and antioxidant enzyme activities in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

آنزیم آسکوربات پراکسیداز APX ($\mu\text{Umg}^{-1}\text{ protein}$)	پروتئین کل Total Protein ($\text{mg g}^{-1}\text{ FW}$)	غلظت نانوذرات Nanoparticles Concentration
1.44 ± 0.05 bc	94.87 ± 0.17 a	0
2.43 ± 0.06 d	91.4 ± 16.81 a	10
1.10 ± 0.30 ab	154 ± 9.88 b	20
1.32 ± 0.71 bc	89.42 ± 32.86 a	30
0.65 ± 0.05 a	61.09 ± 5.93 a	40
1.88 ± 0.08 cd	76.9 ± 18.12 a	50

داده‌ها شامل میانگین سه تکرار و انحراف استاندارد SD می‌باشند. حروف متفاوت روی هر ستون، تفاوت معنادار بین تیمارها را در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) نشان می‌دهند

The data represent the mean of three replicates \pm standard deviation (SD). Different letters above each column indicate significant differences between treatments at the probability level ($P \leq 0.05$).

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات ZnO، به دلیل حضور ترکیبات فیتوشیمیایی مانند فنول‌ها و اسیدهای چرب، روشی مؤثر است. نانوذرات تولیدشده با استفاده از گل پنیرک، اندازه‌ای حدود ۴۰ نانومتر داشتند که نشان‌دهنده تأثیر ترکیبات گیاهی در کنترل اندازه آن‌ها است. کاربرد ZnO-NPs در گیاه شنبليله موجب افزایش طول اندام هوایی و ریشه، وزن خشک و محتوای پروتئین کل شد. بیشترین تأثیر مثبت در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم

در لیتر مشاهده شد. همچنین، این نانوذرات اثرات متغیری بر محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داشتند، که تأکیدی بر نقش غلظت نانوذرات در تأثیرات فیزیولوژی آن‌ها بر گیاه است.

منابع

Aasim, M., Baloch, F., Nadeem, M., Bakhsh, A., Samecullah, M., & Day, S. (2018). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): an underutilized edible plant of modern world. *Global perspectives on underutilized crops*, 381-408.

Adil, M., Bashir, S., Bashir, S., Aslam, Z., Ahmad, N., Younas, T., Asghar, R. M. A., Alkahtani, J., Dwiningsih, Y., & Elshikh, M. S. (2022). Zinc oxide nanoparticles improved chlorophyll contents, physical parameters, and wheat yield under salt stress. *Frontiers in plant science*, 13, 932861.

Amirjani, M. R., Askari Mehrabadi, M., & Azizmohammadi, F. (2016). Investigation of the effect of zinc oxide nanoparticles on growth characteristics, element content, and photosynthetic pigments of wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Biology Sciences*, 8(27), 33-48. In Persian.

Bala, N., Saha, S., Chakraborty, M., Maiti, M., Das, S., Basu, R., & Nandy, P. (2015). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Hibiscus subdariffa leaf extract: effect of temperature on synthesis, anti-bacterial activity and anti-diabetic activity. *RSC Advances*, 5(7), 4993-5003.

Bandyopadhyay, S., Plascencia-Villa, G., Mukherjee, A., Rico, C. M., José-Yacamán, M., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Science of the Total Environment*, 515, 60-69.

Barzinjy, A. A., Hamad, S. M., Esmaeel, M. M., Aydın, S. K., & Hussain, F. H. S. (2020). Biosynthesis and characterisation of zinc oxide nanoparticles from *Punica granatum* (pomegranate) juice extract and its application in thin films preparation by spin-coating method. *Micro & Nano Letters*, 15(6), 415-420.

Bazzi, S. (2021). Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Plant Waste Materials and Their Effect on the *Cyamopsis tetragonoloba*. The 7th National Conference on Plant Physiology of Iran, Gorgan, Iran. In Persian.

Bekhradian, A., Karami, B., & Rajabi, H. R. (2024). Green synthesis of silver/silver oxide nanostructures using the *Malva sylvestris* extract prior to simultaneous distillation extraction: synthesis, phytochemical and biological analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(50), 60341-60358.

Benhammad, A., & Trache, D. (2022). Green synthesis of CuO nanoparticles using *Malva sylvestris* leaf extract with different copper precursors and their effect on nitrocellulose thermal behavior. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147, 1-16.

Boominathan, R., & Doran, P. M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New phytologist*, 156(2), 205-215.

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.

Cai, F., Li, S., Huang, H., Iqbal, J., Wang, C., & Jiang, X. (2022). Green synthesis of gold nanoparticles for immune response regulation: Mechanisms, applications, and perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(2), 424-442.

Cakmak, I., Marschner, H., & Bangerth, F. (1989). Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Experimental Botany*, 40(3), 405-412.

Chance, B., & Maehly, A. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases.

Chemingui, H., Smiri, M., Missaoui, T., & Hafiane, A. (2019). Zinc oxide nanoparticles induced oxidative stress and changes in the photosynthetic apparatus in fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 102(4), 477-485.

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*.

Dhoke, S. K., Mahajan, P., Kamble, R., & Khanna, A. (2013). Effect of nanoparticles suspension on the growth of mung (*Vigna radiata*) seedlings by foliar spray method. *Nanotechnology development*, 3(1), e1-e1.

Elsherif, D. E., Abd-ElShafy, E., & Khalifa, A. M. (2023). Impacts of ZnO as a nanofertilizer on fenugreek: some biochemical parameters and SCoT analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 52.

Hashemi, Nadernejad, Nazi, Poursaidi, & Asrar. (2019). Toxicity assessment of zinc oxide nanoparticles synthesized by olive extract on growth and pigments in borage (*Echium amoenum*). *Plant Process and Function*, 8(30), 303-315. In Persian.

Husen, A. (2019). Natural product-based fabrication of zinc-oxide nanoparticles and their applications. *Nanomaterials and plant potential*, 193-219.

Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Elsevier.

Mahmoodi Esfanddarani, H., Abbasi Kajani, A., & Bordbar, A. K. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using flower extract of *Malva sylvestris* and investigation of their antibacterial activity. *IET nanobiotechnology*, 12(4), 412-416.

Noohpishch, Z. (2019). *Investigation of the effect of zinc oxide and iron oxide nanoparticles on the morphological, physiological, and biochemical characteristics of fenugreek under salinity stress conditions* Lorestan University]. Iran. In Persian.

Pasandi Pour, A., Farahbakhsh, H., & Saffari, M. (2014). Response of Fenugreek plants to short-term salinity stress in relation to lipid peroxidation, antioxidant activity and protein content. *Journal of ethno-pharmaceutical products*, 1(1), 45-52.

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.

Ram, R. D., Kodandaramaiah, J., Reddy, M., Katiyar, R., & Rahmathulla, V. (2007). Effect of VAM fungi and bacterial biofertilizers on mulberry leaf quality and silkworm cocoon characters under semiarid conditions.

Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in chemistry*, 5, 78.

Shaik, A. M., David Raju, M., & Rama Sekhara Reddy, D. (2020). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using aqueous root extract of *Sphagneticola trilobata* Lin and investigate its role in toxic metal removal, sowing germination and fostering of plant growth. *Inorganic and nano-metal chemistry*, 50(7), 569-579.

Sharma, D., Sabela, M. I., Kanchi, S., Mdluli, P. S., Singh, G., Stenström, T. A., & Bisetty, K. (2016). Biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Jacaranda mimosifolia* flowers extract: synergistic antibacterial activity and molecular simulated facet specific adsorption studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 199-207.

Soto-Robles, C., Luque, P., Gómez-Gutiérrez, C., Nava, O., Vilchis-Nestor, A., Lugo-Medina, E., Ranjithkumar, R., & Castro-Beltrán, A. (2019). Study on the effect of the concentration of *Hibiscus sabdariffa* extract on the green synthesis of ZnO nanoparticles. *Results in Physics*, 15, 102807.

Swafy, H. M., & Abdalh, A. M. (2021). Mitigation of salinity stress in fenugreek plants using zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate. *Journal of Plant Production*, 12(12), 1367-1374.

Vidya, C., Hiremath, S., Chandrababha, M., Antonyraj, M., Gopal, I. V., Jain, A., & Bansal, K. (2013). Green synthesis of ZnO nanoparticles by *Calotropis gigantea*. *Int J Curr Eng Technol*, 1(1), 118-120.

Wang, X., Li, Q., Pei, Z., & Wang, S. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits, and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia plantarum*, 62, 801-808.

Wani, S. A., & Kumar, P. (2018). Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(2), 97-106.

Xu, J., Huang, Y., Zhu, S., Abbas, N., Jing, X., & Zhang, L. (2021). A review of the green synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and their prospects for application in antibacterial textiles. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 16, 15589250211046242.