

Evaluation of the Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Oxidative Stress Induction and Stimulation of Secondary Metabolite Biosynthesis in *Artemisia annua* L. Cell Suspension Cultures

Pages
05-23

I. Khaldari^{1*}, E. Afshoon² and S. Hoseini Nik³

- 1) Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural and Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran.
- 2) Crop and Horticultural Science Research Department, South Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Birjand, Iran.
- 3) Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Corresponding author: Khaldari.i@ut.ac.ir

Received date: 2025.11.01

Accepted date: 2026.02.01

Abstract

Plant secondary metabolites are recognized as bioactive and valuable compounds in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. Limitations in the natural production of these metabolites, along with ecological risks associated with the overharvesting of medicinal plants, have made the application of biotechnological approaches, such as plant tissue and cell culture and elicitation of biosynthetic pathways, a research and industrial necessity. This study aimed to investigate the effects of concentration and incubation time of green-synthesized copper oxide nanoparticles on oxidative responses and the accumulation of phenolic and flavonoid compounds in *Artemisia annua* L. cell suspension cultures. Cells were treated with three nanoparticle concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for three incubation periods (24, 48, and 72 h), and H_2O_2 content, activities of catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase, as well as total phenolic and flavonoid contents, were quantified. Results demonstrated that 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ induced a controlled increase in H_2O_2 , enhanced catalase and ascorbate peroxidase activities, and led to the highest accumulation of phenolics and flavonoids at 72 h. Treatment with 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ had a stimulatory effect at 24 h; however, prolonged exposure intensified oxidative stress, resulting in marked reductions in phenolic and flavonoid contents. The observed patterns suggest that oxidative stress and H_2O_2 accumulation may contribute to defense responses and regulation of biosynthetic pathways. These findings highlight the importance of precisely controlling nanoparticle concentration and treatment duration to harness stimulatory effects while avoiding oxidative damage, and underscore the potential of plant cell culture systems for secondary metabolite production.

Keywords: Oxidative, Elicitor, Flavonoid, Phenol and Tissue culture.

بررسی اثرات نانوذرات اکسید مس بر القای تنش اکسیداتیو و تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت

سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L.

شماره صفحات

۰۵-۲۳

ایمان خالداری^{۱*}، اسماعیل افشون^۲ و سید سجاد حسینی نیک^۳

- (۱) گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.
(۲) مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بیرجند، ایران.
(۳) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

*Khaldari.i@ut.ac.ir نویسنده مسئول

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۰

چکیده

متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌عنوان ترکیبات زیست‌فعال و ارزشمند در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی شناخته می‌شوند. محدودیت‌های موجود در تولید طبیعی این متابولیت‌ها، همراه با خطرات اکولوژیکی ناشی از برداشت بیش‌ازحد گیاهان دارویی، به‌کارگیری رویکردهای زیست‌فناورانه مانند کشت بافت و سلول گیاهی و تحریک مسیرهای بیوسنتزی را به یک ضرورت پژوهشی و صنعتی تبدیل کرده است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات غلظت و زمان انکوباسیون نانوذرات اکسید مس سنتز شده به‌روش سبز بر پاسخ‌های اکسیداتیو و تجمع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. انجام شد. سلول‌ها با سه غلظت نانوذره (۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در سه دوره انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تیمار شدند و میزان H_2O_2 ، فعالیت‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و همچنین محتوای کل فنول و فلاونوئید اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش کنترل‌شده H_2O_2 ، افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و بیشترین تجمع فنول‌ها و فلاونوئیدها در ۷۲ ساعت شد. تیمار با ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات در ۲۴ ساعت اثر تحریک‌کنندگی داشت؛ اما تیمار طولانی‌مدت در این غلظت باعث تشدید تنش اکسیداتیو و کاهش قابل توجه محتوای فنول‌ها و فلاونوئیدها گردید. الگوهای مشاهده‌شده نشان می‌دهد که تنش اکسیداتیو و تجمع H_2O_2 می‌تواند در پاسخ‌های دفاعی و تنظیم مسیرهای بیوسنتزی نقش داشته باشد. این یافته‌ها اهمیت کنترل دقیق غلظت نانوذرات و مدت تیمار را برای بهره‌گیری از اثرات محرک و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو برجسته می‌کند و ظرفیت سیستم‌های کشت سلولی گیاهی را برای تولید متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اکسیداتیو، الیستور، فلاونوئید، فنل و کشت بافت.

مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز بخش جدایی ناپذیر نظام‌های مراقبت سلامت در سراسر جهان بوده‌اند، زیرا توانایی تولید مجموعه‌ای متنوع از ترکیبات آلی اختصاصی موسوم به متابولیت‌های ثانویه را دارند (Kelly, 2009). این ترکیبات، نه تنها پایه و اساس نظام‌های طب سنتی را شکل می‌دهند، بلکه در زمینه‌های مدرن، نقش مهمی در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی و بهداشتی ایفا می‌کنند (Kinghorn, 2010). از منظر زیست‌شناسی گیاهی، متابولیت‌های ثانویه نقش حیاتی در دفاع گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله عوامل بیماری‌زا، گیاه‌خواران، پرتو فرابنفش و تنش‌های اکسیداتیو^۱ دارند (Xu and Deng, 2017). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها به‌طور موثری در سازگاری و بقای گیاه موثرند و این ترکیبات تا حد زیادی مسئول خواص درمانی گیاهان دارویی نیز به‌شمار می‌روند (Samuelsson, 2004). گونه دارویی درمنه (*Artemisia annua* L.) از خانواده‌ی Asteraceae، گیاهی یک‌ساله و بومی آسیا است که قرن‌ها در طب سنتی شرق آسیا برای درمان و پیشگیری بیماری‌هایی با علائم تب و لرز مورد استفاده قرار گرفته است (Hien and White, 1993). از این گیاه مجموعه‌ای گسترده از ترکیبات شامل سزکوئی‌ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، لیپیدها، ترکیبات فنولی، پورین‌ها، استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها و آرتیمیسینین استخراج شده است (Bhakuni et al., 2001). ترکیب اصلی *A. annua* یعنی آرتیمیسینین، طی دو دهه‌ی اخیر به عنوان مؤثرترین ماده‌ی فعال برای درمان بیماری مالاریا به‌طور گسترده در سطح جهانی به کار گرفته شده و منبع اصلی داروی ضد مالاریا محسوب می‌شود (de Veris and Dien, 1996). تولید طبیعی متابولیت‌های ثانویه معمولاً با بازده پایین، تغییرپذیری مکانی و زمانی در فرآیندهای بیوسنتزی و حساسیت شدید به تغییرات محیطی محدود می‌شود؛ که این موارد از جمله موانع تولید یکنواخت و در مقیاس صنعتی این ترکیبات به‌شمار می‌آیند. همچنین، برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی خطرات جدی زیست محیطی ایجاد کرده و نیاز به رویکردهای زیست فناوریانه جایگزین، نظیر فناوری‌های کشت سلول و بافت گیاهی و مهندسی متابولیک را برجسته می‌سازد (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002; Robert Verpoorte and Alfermann, 2000). در این راستا و عموماً در شرایط کشت بافت، روش‌های مبتنی بر تحریک‌سازی^۲ به‌عنوان راهبردی مؤثر برای تقویت بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مطرح شده است؛ که طی آن عوامل زیستی یا غیرزیستی با سلول‌های گیاهی تعامل کرده و مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه را فعال می‌سازند (Narayani and Srivastava, 2017). در دهه‌های اخیر، به‌کارگیری روش‌های کشت بافت گیاهی و استفاده از محرک‌ها^۳ با اهداف تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه و بررسی سازوکارهای سلولی و مولکولی مرتبط با سنتز این

1. Oxidative

2. Elicitation

1. Elicitor

ترکیبات، مورد توجه گسترده پژوهشگران قرار گرفته است. در این میان، نانوذرات^۴ به‌عنوان نسل جدیدی از محرک‌های مؤثر شناخته می‌شوند که می‌توانند از طریق القای تنش، مسیرهای دفاعی سلول گیاهی را فعال کنند. این تحریک منجر به افزایش فعالیت سامانه‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی و بازآرایی تنظیمی در شبکه‌های زیستی سلول می‌شود. در نتیجه، برانگیختگی این مسیرهای دفاعی با افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه همراه است که یکی از جلوه‌های کلیدی پاسخ سازگارانه گیاه به تغییرات محیطی محسوب می‌شود (Lala, 2021). تاثیر نانوذرات بر فرآیندهای بیوشیمیایی و القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی در مطالعات متعددی به‌طور تجربی اثبات شده است. برای نمونه، تیمار کالوس‌های مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) با نانولوله‌های کربنی چنددیواره موجب افزایش چشمگیر تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گردید (Ghorbanpour and Hadian, 2015). در کالوس‌های استویا (*Stevia rebaudiana* L.) کاربرد نانوذرات مس (Cu NPs) سبب افزایش سنتز استویوزید شد (Hendawey et al., 2015) و در سلول‌های *Caralluma tuberculata* نانوذرات نقره (Ag NPs) تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها را تحریک کرد (Ali et al., 2019). نتایجی از این دست نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند به‌عنوان محرک‌هایی مؤثر عمل کرده و با تنظیم مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیکی، ظرفیت سلول‌های گیاهی را برای تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش دهند؛ پدیده‌ای که بیانگر نقش چندوجهی نانوذرات در بازآرایی شبکه‌های دفاعی و متابولیکی گیاه است. هدف این پژوهش، بررسی سازوکارهای بیوشیمیایی و متابولیکی القاشده توسط نانوذرات سبز اکسید مس (Green CuO NPs) در برانگیختگی پاسخ‌های دفاعی اکسیداتیو و تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی *A. annua* است. در این مطالعه، تلاش شده است تا نقش نانوذرات اکسید مس به‌عنوان الیسیتورهای نانومقیاس در تنظیم شبکه‌های دفاعی سلول از طریق القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن^۵ و به‌ویژه هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تبیین گردد. بررسی تغییرات در فعالیت آنزیم‌های کلیدی آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز (CAT) آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) به‌عنوان شاخصی از شدت پاسخ اکسیداتیو و ارزیابی محتوای فنل و فلاونوئید کل به‌عنوان نمادی از تحریک مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات ثانویه، از محورهای اصلی این پژوهش به‌شمار می‌رود. این تحقیق در پی آن است تا با تحلیل همبستگی میان فعال‌سازی دفاعی اکسیداتیو و تغییرات متابولیکی، ظرفیت نانوذرات سبز اکسید مس را برای بهینه‌سازی تولید ترکیبات دارویی و ارزیابی سازوکارهای تنظیمی سلول‌های گیاهی در سطح متابولیکی آشکار سازد

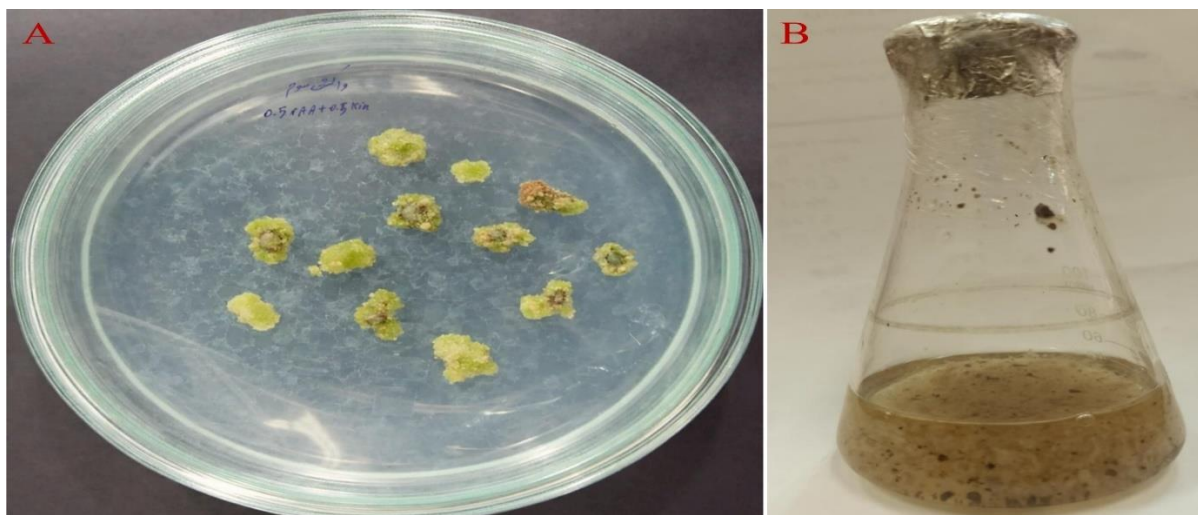
مواد و روش‌ها

بذرهای *A. annua* پس از ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت پنج دقیقه و سه

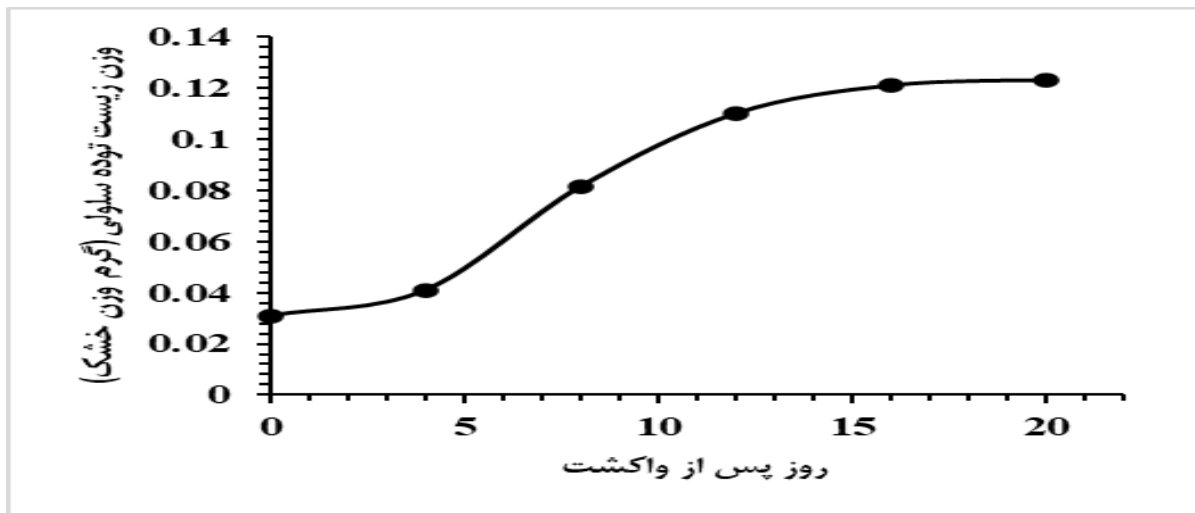
2. Nanoparticles (NPs)

3. Reactive oxygen species (ROS)

مرتب‌ه شستشو با آب مقطر اتوکلاو شده، در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک (MS) حاوی ۳٪ ساکاروز و ۰/۷٪ آگار کشت شدند و به اتاقک کشت با شرایط دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۱۵۰۰ لوکس منتقل شدند. پس از گذشت ۲۵ روز از کشت بذور، قطعات برگ برای کالوس‌زایی انتخاب و القای کالوس بر روی محیط پایه MS با میزان ساکارز و آگار مشابه محیط جوانه‌زنی و حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین استیک اسید (NAA) و کینتین (Kin) هر یک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت. در ادامه، ریزنمونه‌های منتقل شده به محیط کالوس‌زایی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کامل نگهداری شدند. واکشت کالوس‌های تشکیل شده در بازه‌های زمانی ۲۱ روز انجام گرفت. به منظور تهیه کشت سوسپانسیون سلولی، مقدار ۰/۵ گرم از کالوس‌های با ساختار خشک و شکننده به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ترکیب ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و Kin منتقل و سپس محیط کشت در شرایط تاریک، در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شد. واکشت سوسپانسیون سلولی هر ۲۱ روز از طریق جایگزینی محیط کشت انجام گرفت (شکل ۱). در واکشت سوم و پس از دستیابی به محیط کشت سلولی همگن و پایدار، به منظور تعیین سرعت رشد سلول‌ها و تعیین فازهای رشدی، منحنی رشد سوسپانسیون سلولی از طریق اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها در بازه‌های چهار روزه ترسیم شد. برای تعیین وزن خشک زیست توده، سلول‌ها با استفاده از کاغذ صافی از محیط کشت جدا و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. بر اساس منحنی رشد ترسیم شده (شکل ۲)، پیش از رسیدن سلول‌ها به مرحله ایستایی^۶ رشد، تیمار با نانوذرات اکسید مس در روز دهم پس از آخرین واکشت اعمال گردید (Mohammadi *et al.*, 2021).



شکل ۱- کشت کالوس (A) و سوسپانسیون سلولی (B) گیاه درمنه (*Artemisia annua* L.)
Figure 1- Callus and Cell Suspension Cultures in *Artemisia annua* L.



شکل ۲- نمودار رشدی زیست توده سلولی گیاه درمنه در بازه زمانی ۲۰ روز

Figure 2- Growth pattern of *Artemisia annua* cell biomass over a 20-day culture period

نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه، پیش‌تر در پژوهش‌های قبلی نویسندگان سنتز و کیفیت ساخت، سطح سمیت آن‌ها بر سلول‌های گیاهی و بازه غلظتی موثر آن در القای پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی مشخص شده است (Khaldari *et al.*, 2021; Khaldari *et al.*, 2024). پیش از انجام تیمارها، به‌منظور پراکندگی بهتر نانوذرات در محیط کشت، محیط کشت حاوی نانوذرات به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک^۷ قرار گرفت. در ادامه، کشت‌های سوسپانسیون سلولی با نانوذرات اکسید مس در سه غلظت صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه^۸ شدند. برای هر تیمار، سه تکرار مستقل در نظر گرفته شد. پس از پایان مدت زمان تیمار، سلول‌های تیمار شده از محیط کشت جدا و زیست‌توده‌ی سلولی جهت اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید کل و تحلیل‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش میزان H₂O₂، مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم از سلول‌های تیمار شده و سائیده شده در ازت مایع، با استفاده از پنج میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA)، با غلظت ۱٪ مخلوط و همگن شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، به ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع شفاف رویی^۹، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم (KI) یک‌مولار افزوده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت H₂O₂ در نمونه‌ها، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف H₂O₂ تهیه و مقدار H₂O₂ نمونه‌ها به صورت میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) بیان گردید (Alexieva *et al.*, 2001). تعیین مقدار کل پروتئین‌های محلول براساس روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام شد. برای استخراج آنزیمی، ۵۰۰ میلی‌گرم از سلول‌های تیمار شده در نیتروژن مایع آسیاب و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با بافر تریس

1. Ultrasonication bath
2. Incubation
1. Supernatant

هیدروکلریک اسید (Tris-HCl) حاوی ۱۰٪ گلیسرول همگن‌سازی گردید. پس از سانتریفیوژ نمونه‌های همگن با سرعت ۱۵ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، مایع شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های CAT، GPX و APX مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم CAT از طریق اندازه‌گیری نرخ تجزیه H_2O_2 و بر پایه روش Scebba و همکاران (۱۹۹۸) ارزیابی شد. برای انجام واکنش، مخلوطی شامل سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، پنج میکرولیتر از محلول H_2O_2 ۳۰٪ و ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی تهیه گردید. کاهش جذب نمونه در طول موج ۲۴۰ نانومتر طی مدت یک دقیقه ثبت شد و فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول H_2O_2 تجزیه‌شده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم وزن تر ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم APX با پایش اکسایش آسکوربات و بر پایه روش Ranieri (۲۰۰۳) ارزیابی شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره خام آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر از محلول $EDTA^{10}$ با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۰/۴ میلی‌لیتر آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۰/۴ میلی‌لیتر از H_2O_2 (۳۰٪) آغاز شد. کاهش جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت چهار دقیقه ثبت گردید و فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول آسکوربات اکسیدشده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین ($\mu\text{mol oxidized ascorbate min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) بیان شد. برای سنجش فعالیت آنزیم GPX، مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی به مخلوط واکنش شامل سه میکرولیتر گایاکول، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 با غلظت ۳۰٪ و سه میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) افزوده شد. تغییر جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر طی یک دقیقه ثبت گردید و فعالیت آنزیم به صورت میکرومول گایاکول اکسیدشده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین ($\mu\text{mol oxidized mg}^{-1} \text{ protein}$) بیان شد (Dionisio-Sese and Tobira, 1998). به منظور سنجش محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل، عصاره‌گیری به روش الکی انجام گرفت. برای این منظور، کشت‌های سوسپانسیون ابتدا به روش انجمادی^{۱۱} خشک و مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت خشک شده ابتدا به خوبی ساییده و در پنج میلی‌لیتر متانول ۹۰٪ همگن شد. به منظور استخراج ترکیبات محلول در متانول، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت تحت ورتکس ملایم قرار گرفتند. در ادامه، نمونه همگن شده حاصل با سرعت شش هزار دور در دقیقه و مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به دست آمده در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تغلیظ گردید و تا زمان انجام آنالیزهای بعدی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های کشت سوسپانسیون با استفاده از واکنشگر Folin-Ciocalteu و بر اساس روش Singleton *et al* و همکاران (1999) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمون، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با دو میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط

2. Ethylenediaminetetraacetic acid

1. Freeze drying

گردید، سپس یک میلی‌لیتر از واکنشگر Folin-Ciocalteu به آن افزوده شد. پس از گذشت سه دقیقه، یک میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲۰٪ به مخلوط اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق با ورتکس پیوسته آنکوبه و سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کل فنول‌ها بر اساس منحنی استاندارد اسیدگالیک (در دامنه غلظتی ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) محاسبه و به صورت میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم وزن خشک ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{DW}$) گزارش شد. تعیین محتوای کل فلاونوئیدها بر اساس روش chang و همکاران (۲۰۰۲) و با اندکی تغییرات انجام شد. برای این منظور، در لوله آزمایش، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ مخلوط شد. سپس ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و حجم کلی به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اختلاط کامل با ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۴ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه مقدار فلاونوئید کل، منحنی استاندارد با استفاده از محلول‌های معادل کوئرستین در بازه غلظتی یک تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک ($\text{mg QE g}^{-1} \text{DW}$) بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۳.۱ انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) بر اساس طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار و به صورت دوعاملی (فاکتوریل) صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد.

نتایج و بحث

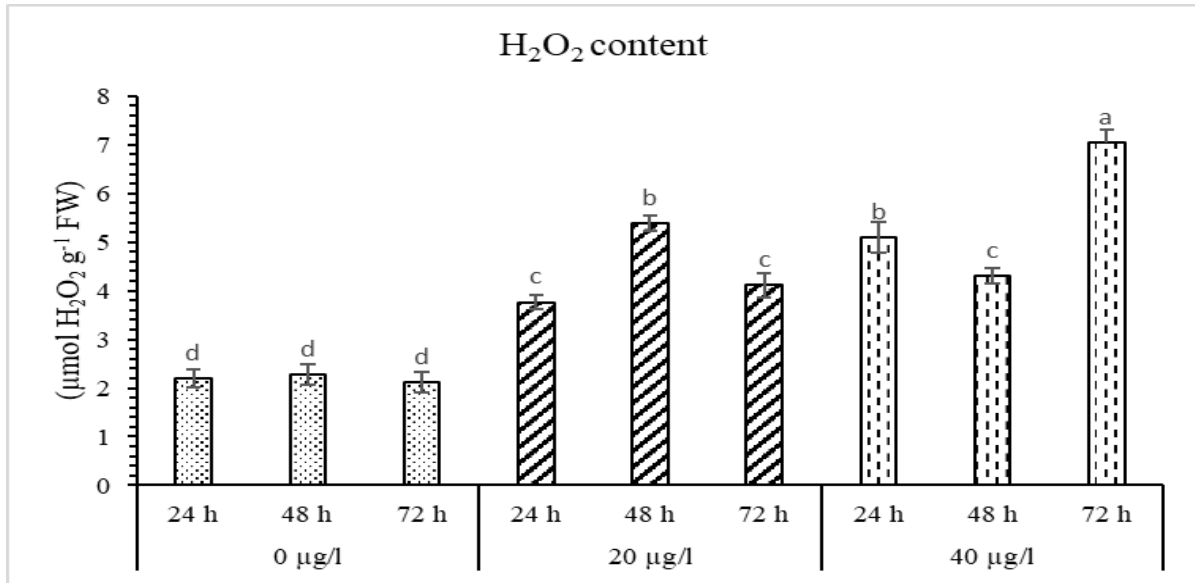
نتایج تحلیل واریانس نشان داد که غلظت نانوذرات، زمان تیمار و اثر متقابل آن‌ها بر خصوصیات بیوشیمیایی و متابولیکی مورد مطالعه در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه درمنه اثر معنی‌داری داشتند. به طور خاص، میزان H_2O_2 تحت تأثیر معنی‌دار غلظت و اثر متقابل آن با مدت زمان تیمار قرار گرفت، در حالی که فعالیت آنزیم‌های CAT و APX هر دو به شدت از هر سه عامل (غلظت نانوذرات، مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها) متأثر بودند ($p < 0.01$). فعالیت GPX تنها تحت تأثیر غلظت معنی‌دار بود، در حالی که تغییر در محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل در سطح ۵٪ به تغییرات غلظت و اثر متقابل آن با زمان پاسخ نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات در القای تنش اکسیداتیو و فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی و مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه، تحت تأثیر اثرات متقابل غلظت نانوذرات و زمان تیمار قرار گرفتند، که نشان‌دهنده وابستگی پاسخ سلول‌ها به تعامل هم‌زمان این دو عامل است (جدول ۱). با توجه به نتایج مقایسه میانگین، غلظت نانوذرات به طور معنی‌داری بر میزان تجمع H_2O_2 تأثیر داشته و این اثر به صورت وابسته به زمان بروز کرده است. در تیمار شاهد (صفر میکروگرم در میلی‌لیتر)، مقدار H_2O_2 در تمامی زمان‌ها در سطحی پایین‌تر و نسبتاً ثابت قرار گرفت که نشان‌دهنده وضعیت پایدار اکسیداتیو در سلول‌های بدون نانوذرات است. با افزایش غلظت نانوذرات به ۲۰ میکروگرم

در میلی لیتر، محتوای H_2O_2 به طور محسوسی افزایش یافت و در زمان ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار در این سطح غلظتی رسید، سپس در ۷۲ ساعت اندکی کاهش نشان داد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه کشت سوسپانسیون سلولی درمنه تحت تأثیر غلظت نانوذرات و مدت زمان تیمار
Table1- Analysis of variance results for the studied traits of *Artemisia* cell suspension culture under the effects of nanoparticle concentration and treatment duration.

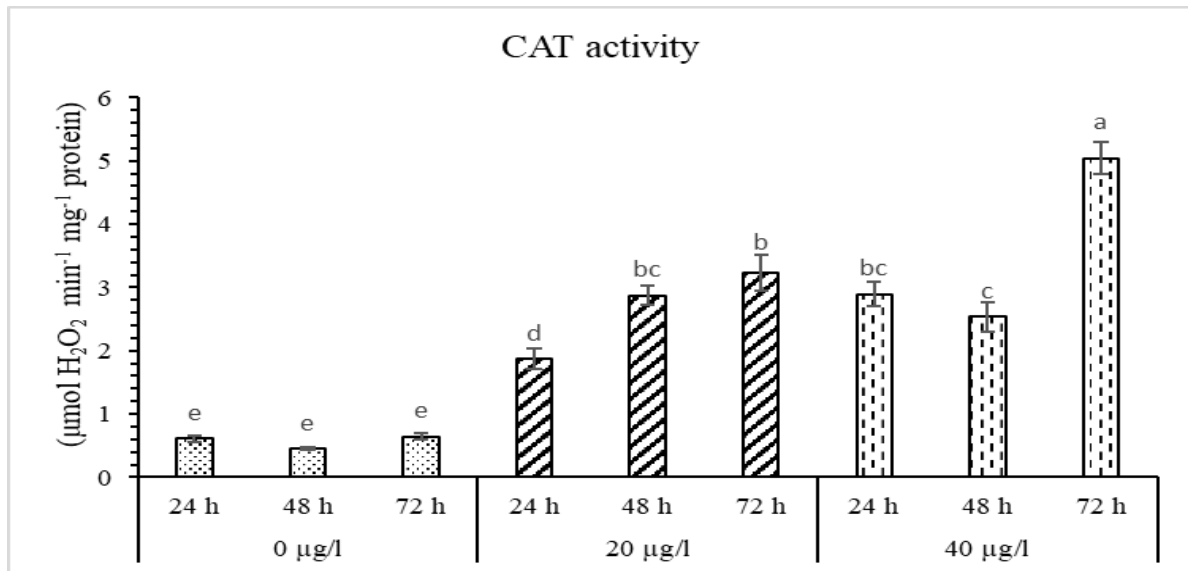
میانگین مربعات Mean Square (MS)						درجه آزادی Degrees of freedom	منابع تغییر Source of Variation
فلاونوئید کل Total Flavonoids	فنل کل Total Phenols	گایاکول پراکسیداز GPX	آسکوربات پراکسیداز APX	کاتالاز CAT	هیدروژن پراکسید H_2O_2		
۱۷۰/۳*	۳۳۴/۱۱*	۰/۳۹۲۵**	۱/۰۹۴**	۳۴/۴**	۴۸/۷۱**	۱	غلظت نانوذرات Concentration
۳/۸۱ ^{NS}	۱۱/۰۸ ^{NS}	۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۰/۱۹۴**	۶/۳۷**	۲/۴۶ ^{NS}	۱	مدت زمان تیمار Treatment duration
۱۲۷/۴*	۳۹۰/۷۷*	۰/۰۰۲۵ ^{NS}	۰/۰۹۹**	۳/۳۵**	۳/۰۹*	۱	اثر متقابل غلظت × زمان Concentration × Time
۲۸/۴۶	۶۶/۵۳	۰/۰۰۵۱	۰/۰۰۲	۰/۳۷	۰/۶۷	۲۳	خطا Error
۴۳/۴۸	۳۶/۵۱	۳۱/۴۶	۱۴/۴۲	۲۷/۲۷	۲۰/۳۲		ضریب تغییرات Coefficient of Variation

در سطح غلظت بالاتر یعنی ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر، روند تجمع H_2O_2 شدت بیشتری یافت و پس از افزایش تدریجی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، در زمان ۷۲ ساعت به بیشترین مقدار کل ($7.05 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) رسید، که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل بین دو عامل غلظت و زمان معنی‌دار مشاهده شد؛ که بیانگر پاسخ تعاملی سلول‌ها به تنش نانوذرات در گذر زمان است. افزایش تجمع H_2O_2 در غلظت‌های بالا و در زمان‌های طولانی‌تر، نشان‌دهنده تقویت فرآیندهای القای تنش اکسیداتیو و افزایش ROS می‌باشد. این الگو بیانگر آن است که نانوذرات در سطح غلظتی بالاتر، به‌ویژه پس از گذشت ۷۲ ساعت، موجب فعال شدن مسیره‌های تولید ROS و در نتیجه افزایش محسوس H_2O_2 می‌گردند. به‌طور خلاصه، اثر نانوذرات بر شاخص H_2O_2 در کشت سوسپانسیون سلولی درمنه هم وابسته به غلظت و هم به زمان تیمار است و اثر متقابل این دو عامل به‌صورت معنی‌داری موجب تشدید تنش اکسیداتیو در سلول‌ها شده است (شکل ۳). فعالیت آنزیم CAT به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت نانوذرات و زمان تیمار قرار گرفت و اثر متقابل بین دو عامل نیز از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). همان‌گونه که در نمودار مشاهده می‌شود (شکل ۴)، در تیمار شاهد سطح فعالیت کاتالاز در تمام سطوح زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پایین و تقریباً ثابت باقی ماند. با افزایش غلظت نانوذرات به ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر، فعالیت آنزیم به‌طور محسوسی افزایش یافت و در زمان ۷۲ ساعت به بیشینه مقدار خود ($3.23 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) در این سطح رسید، که اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد. در بالاترین سطح غلظتی نانوذرات نیز فعالیت کاتالاز در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود و پس از روند افزایشی ملایم تا ۷۲ ساعت، به بیشترین سطح کل ($5.04 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) رسید.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر محتوای H₂O₂ در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

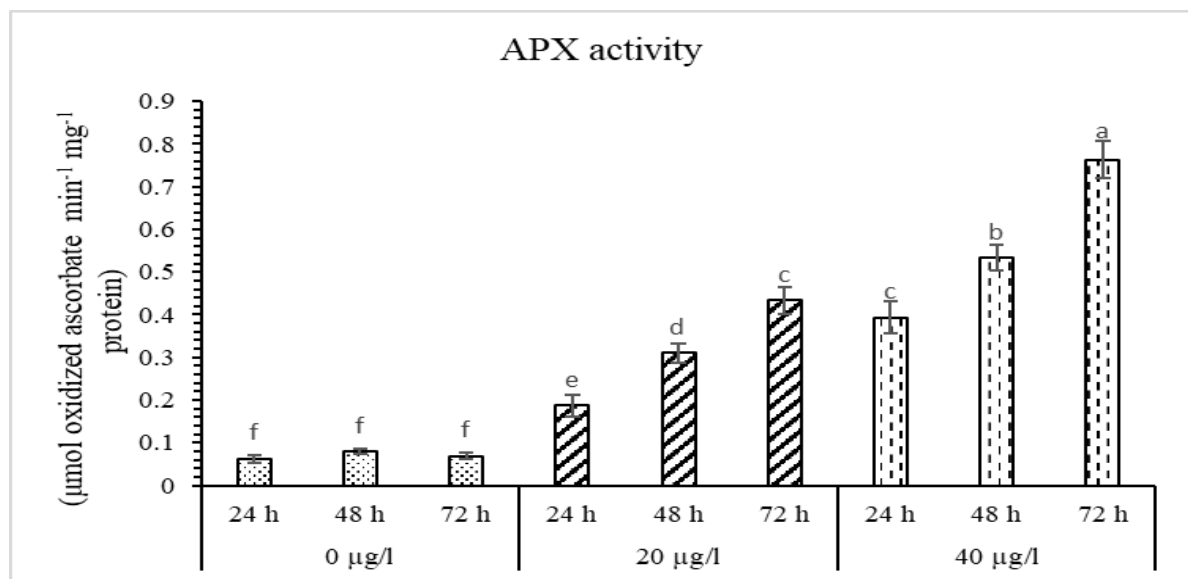
Figure 3- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 µg mL⁻¹) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on H₂O₂ content in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates ± SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین سه تکرار ± انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 4- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 µg mL⁻¹) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on catalase activity in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates ± SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

نتایج نشان داد که پویایی فعالیت آنزیم APX الگوی مشابه با فعالیت آنزیم CAT از خود بروز می‌دهد. به گونه‌ای که در تیمار شاهد سطح فعالیت آنزیم در تمامی زمان‌ها پایین و تقریباً ثابت باقی ماند، که معرف وضعیت پایه سامانه آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های بدون تنش است. در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات، مقدار فعالیت APX با گذشت زمان به صورت پویایی افزایش یافت و در زمان ۷۲ ساعت به بیشترین مقدار خود ($0.43 \mu\text{mol oxidized ascorbate min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) در این سطح غلظتی رسید. با افزایش غلظت به ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، روند فعالیت آنزیم به شکل چشمگیری افزایش یافت؛ به طوری که پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌ها، فعالیت APX به بیشترین مقدار فعالیت خود ($0.76 \mu\text{mol oxidized ascorbate min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) نسبت به سایر ترکیبات تیماری رسید (شکل ۵). اثر متقابل معنی‌دار غلظت نانوذرات و زمان تیمار مشاهده شده در شاخص‌های CAT و APX، نشان‌دهنده‌ی پاسخ تعاملی و وابسته به هر دو عامل در تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو تحت شرایط تنش نانوذرات است. این نتیجه بیانگر نقش هماهنگ و زمان‌مند سامانه‌های دفاعی در مقابله با پراکسید هیدروژن و گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده در اثر تیمار نانوذرات می‌باشد.

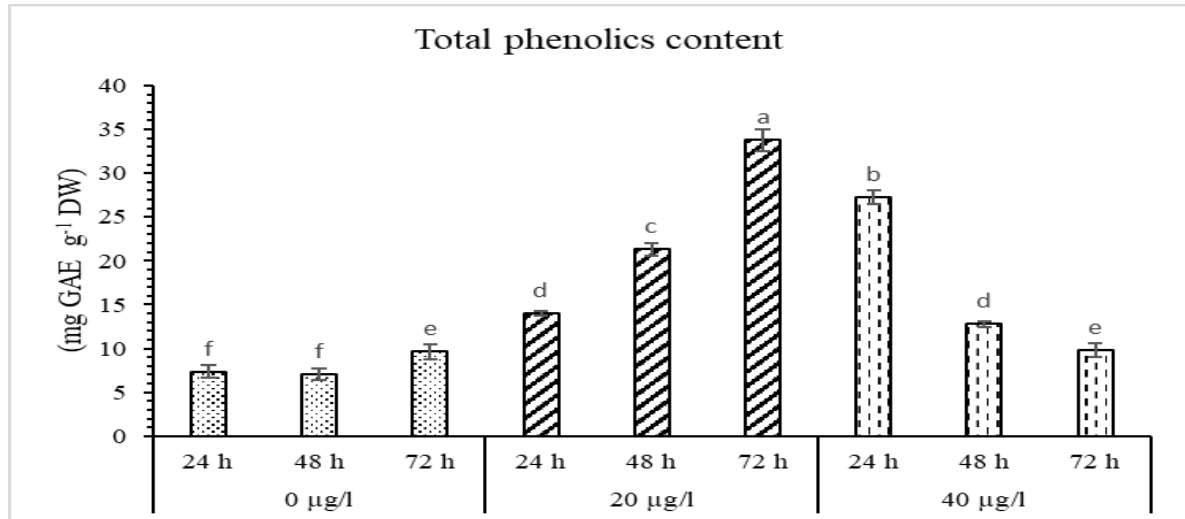


شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر فعالیت آنزیم آسکوپارت پراکسیداز در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین سه تکرار \pm انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 5- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on ascorbate peroxidase activity in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates \pm SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

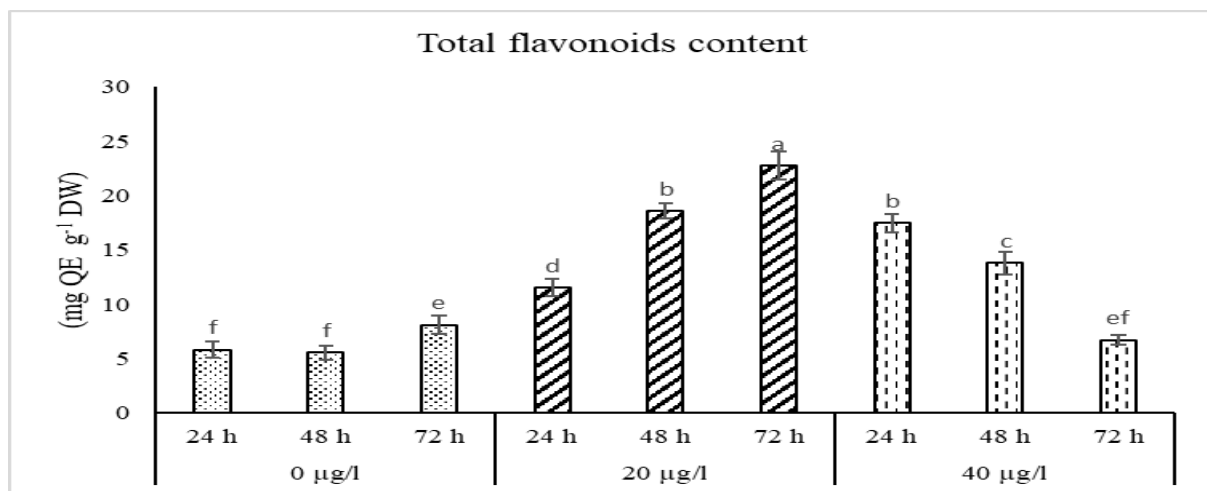
به طور کلی الگوی پویایی بروز تنش اکسیداتیو و فعالیت سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی بیانگر آن است که افزایش غلظت نانوذرات، به‌ویژه در دوره‌های زمانی طولانی‌تر، موجب القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌منظور مهار تجمع ROS از جمله H_2O_2 می‌شود. مشاهده‌ی بیشترین فعالیت آنزیم CAT و APX در تیمار با بیشترین سطوح غلظتی و زمانی، نشان‌دهنده‌ی پاسخ سازگاران سلول‌های سوسپانسیون در برابر تنش نانوالیسیستورها و تلاش سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانی برای حفظ تعادل اکسایش-کاهش^{۱۲} سلولی است. به‌طور کلی، روند تغییرات هر دو آنزیم CAT و APX تأیید می‌کند که فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده ماهیتی وابسته به غلظت و زمان دارد و نقش چشمگیری در تعدیل تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات ایفا می‌کند. نتایج حاصل از بررسی محتوای فنول و فلاونوئید کل در کشت سوسپانسیون درمنه نشان داد که هر دو شاخص به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت نانوذرات و برهم‌کنش دو عامل غلظت و زمان تیمار قرار گرفتند. در هر دو شاخص، کمترین مقادیر در تیمار شاهد فاقد نانوذرات مشاهده شد که در تمامی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در کمترین میزان خود قرار گرفتند. با افزایش غلظت نانوذرات تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان بیوسنتز هر دو گروه متابولیت روندی افزایشی و وابسته به زمان نشان داد؛ مقدار فنول کل از حدود $14 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۲۴ ساعت به $33.8 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۷۲ ساعت افزایش یافت. از سوی دیگر محتوای فلاونوئید نیز از حدود $11.5 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۲۴ ساعت به $22.8 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۷۲ ساعت افزایش یافت (شکل ۶ و ۷). با افزایش غلظت نانوذرات تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بیوسنتز متابولیت‌های مورد مطالعه روندی کاملاً متفاوت از خود نشان داد. به طوری که در اولین نمونه برداری (۲۴ ساعت) افزایش چشم‌گیر بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنل و فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد قابل مشاهده بود ($27.2 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ و $17.45 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$). در مقابل با افزایش مدت زمان تیمار، روندی کاهشی از تجمع متابولیت‌های مذکور مشاهده شد؛ به‌گونه‌ای که در بیشترین مدت زمان تیمار (۷۲ ساعت) میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب تا $9.8 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ و $6.7 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$ کاهش یافت (شکل ۶ و ۷). ارزیابی فاکتورهای تولید ROS و فعالیت سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول‌ها، از موثرترین روش‌های درک بروز تنش اکسیداتیو ناشی از عوامل تنش‌زا محسوب می‌شوند (Anjum *et al.*, 2012). تولید ROS به‌ویژه H_2O_2 در سلول‌های گیاهی، بیانگر وقوع تنش اکسیداتیو است که به‌دنبال آن سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به شرایط تنش فعال می‌شوند (Low and Merida, 1996). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که اعمال تیمار نانوذرات موجب القای تنش اکسیداتیو و برانگیختگی چشمگیر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود؛ واکنشی که به‌عنوان یکی از مؤلفه‌های اصلی سامانه دفاعی گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو شناخته می‌شود. برای مثال، در گیاهچه‌های گندم، تیمار نانوذرات اکسید روی و مس سبب افزایش فعالیت آنزیم CAT شده است

(Dimkpa *et al.*, 2012)؛ همچنین در آرابیدوپسیس تیمار با نانوذرات اکسید مس منجر به القای فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و GPX و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش اکسیداتیو گردیده است (Nair and Chung, 2014).



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر بیوسنتز و تجمع محتوای فنل کل در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده میانگین سه تکرار \pm انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 6- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on biosynthesis and accumulation of total phenolics content in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates \pm SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر بیوسنتز و تجمع محتوای فلاونوئید کل در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده میانگین سه تکرار \pm انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 7- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on biosynthesis and accumulation of total flavonoids content in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates \pm SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

علاوه بر این، در سیستم‌های کشت بافت و سلول نیز گزارشات مشابهی نظیر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کالوس‌های مرزه خوزستانی تیمار شده با نانوذرات بر پایه کربن (Ghorbanpour and Hadian, 2015) و القای تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاه شقایق شرقی (*Papaver orientale* L.) تحت تیمار نانوذرات اکسید مس در دسترس است (Khaldari *et al.*, 2024). چنین مطالعاتی نشان داده‌اند که سلول‌های گیاهی در مواجهه با نانوذرات، مجموعه‌ای متنوع، پیچیده و درهم‌تنیده از پاسخ‌ها را در سطوح مولکولی و بیوشیمیایی بروز می‌دهند. برخی از این پاسخ‌ها در مراحل اولیه ظاهر می‌شوند؛ مانند بروز تنش اکسیداتیو؛ درحالی‌که بخشی دیگر به‌واسطه انتقال سیگنال‌های ناشی از تنش ایجاد شده، منجر به تغییر در الگوهای بیوسنتزی مرتبط با متابولیت‌های ثانویه و بروز تغییرات کمی و کیفی در محتوای این متابولیت‌ها می‌شوند. بر اساس یافته‌های این پژوهش و مطالعات پیشین درباره نقش نانوذرات در القای مسیرهای منتهی به تولید متابولیت‌های ثانویه (Tan *et al.*, 2009; Fazal *et al.*, 2019)، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید مس به طور چشمگیری سبب افزایش تولید H_2O_2 و ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شوند. به دنبال وقوع این وضعیت، سلول‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر APX و CAT تلاش می‌کنند اثرات زیان‌بار تجمع H_2O_2 را خنثی کنند. مطالعات مرتبط با فرایندهای انتقال سیگنال و پاسخ به تنش نشان داده‌اند که القای تنش اکسیداتیو و افزایش تجمع مولکول‌هایی نظیر H_2O_2 ، نقش محوری در مسیرهای دفاعی گیاه و القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارد. این مولکول‌ها، چه به صورت مستقل و چه در تعامل شبکه‌ای با سایر پیام‌رسان‌های سلولی، با فعال‌سازی مکانیسم‌های حفاظتی، مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی ارتقاء می‌دهند. چنین پاسخ‌هایی با تعدیل مسیرهای متابولیکی همراه بوده و به افزایش انباشت ترکیبات سودمند منجر می‌گردند. به‌عنوان نمونه، پرولین، کاروتنوئیدها، گلوکاتینون، اسید آسکوربیک و ترکیبات فنولی از مهم‌ترین مواد تولید شده برای مهار و جبران صدمات ناشی از تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Chen *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021). هر چند H_2O_2 به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان کلیدی در تنظیم مسیرهای مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی شناخته شده است، اما هنوز نقش دقیق آن در انتقال پیام به مسیرهای پایین‌دستی، برنامه‌ریزی مجدد الگوهای بیان ژنی و در نهایت کنترل سطوح تولید ترکیبات ثانویه به‌طور کامل روشن نیست. با این حال، تا حدودی مشخص شده است که چنین مولکول‌هایی در انتقال سیگنال‌های القاشده توسط نانوذرات به مسیرهای پایین‌دستی دخیل هستند؛ فرآیندی که به نظر می‌رسد با افزایش لحظه‌ای غلظت یون‌های کلسیم (Ca^{2+}) و فعال‌سازی مسیرهای کیناز فعال‌شونده با میتوژن^{۱۳} (MAPK) ارتباط دارد (Fazal *et al.*, 2019). در پشتیبانی از این فرضیه، مطالعاتی افزایش سطح Ca^{2+} و پروتئین‌های مرتبط با مسیر سیگنال‌دهی MAPK را در ریشه‌های برنج تیمار شده با نانوذرات نقره گزارش کرده‌اند. همچنین، در این پژوهش مشخص شده است که آبشارهای MAPK و فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی پایین‌دستی نقش کلیدی در بازبرنامه‌ریزی رونویسی ژن‌های

1. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

دخیل در متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند (Mirzajani *et al.*, 2014). برخی پژوهش‌های متمرکز بر القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق الیستورها به وضوح نشان می‌دهند که بسیاری از الیستورهای کارا نظیر فیتوهورمون‌های متیل جاسمونات یا سالیسیلیک اسید نیز حداقل بخشی از فرآیندهای منتهی به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی را از طریق القای تنش اکسیداتیو و تجمع مولکول‌های نظیر H_2O_2 به سرانجام می‌رسانند. از این موارد می‌توان به همبستگی مثبت در بروز تنش اکسیداتیو و افزایش تولید H_2O_2 با بیوسنتز ترکیبات ترپنوئید در گیاه نعنا فلفلی تحت تیمار الیستورهای فیتوهورومونی اشاره کرد (Khaldari *et al.*, 2025; Afkar and Karimzadeh, 2025). بنابراین، شواهد تجربی فزاینده به‌روشنی بر نقش محوری القای تنش اکسیداتیو و تجمع H_2O_2 در تنظیم و کنترل مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دلالت دارند. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که در این پژوهش، غلظت پایین نانوذرات اکسید مس (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) باعث القای تنش اکسیداتیو کنترل‌شده در سلول‌های *A. annua* می‌شود؛ به‌گونه‌ای که تجمع H_2O_2 محدود و فعالیت آنزیم‌های CAT و APX در حد متعادلی باقی می‌ماند. مولکول‌های H_2O_2 حاصل، نقش حساسی در آغاز مسیرهای سیگنال‌دهی پایین‌دستی ایفا می‌کنند که در نهایت موجب فعال‌سازی مکانیزم‌های دفاعی و القای بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌شود. افزایش مدت تیمار (تا ۷۲) باعث تشدید و تداوم انتقال سیگنال شده و در نتیجه انباشت بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را به دنبال دارد. بنابراین، می‌توان گفت که غلظت نانوذرات و زمان تیمار هر دو از عوامل تعیین‌کننده در افزایش میزان بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به شمار می‌روند. در سطوحی غلظتی بالاتر نانوذرات (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گرچه در ابتدا (۲۴ ساعت) شاهد القای تنش اکسیداتیو (افزایش محتوای H_2O_2) و بروز پاسخ‌های دفاعی (فعالیت CAT و APX) متعادل هستیم، اما با گذشت مدت زمان تیمار (۷۲ ساعت)، شدت تنش اکسیداتیو در قیاس با تیمارهای با غلظت کمتر، به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد که با افزایش چشمگیر مقدار H_2O_2 و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قابل مشاهده است (اشکال ۳ تا ۵). این در حالی است که گرچه غلظت بالاتر نانوذرات در ابتدا (۲۴ ساعت) افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را به دنبال دارد، اما در ادامه و با افزایش مدت زمان تیمار سلول‌ها، محتوای فنلی و فلاونوئیدی به‌طور محسوسی کاهش یافته تا به پایین‌ترین میزان خود در ۷۲ ساعت پس از تیمار برسند (شکل ۶ و ۷). براساس مطالعات Lin و همکاران (2009) و Khaldari و همکاران (۲۰۲۱)، استفاده از نانوذرات در غلظت‌های بالا می‌تواند به‌جای ایجاد پاسخ تحریکی، موجب بروز تنش اکسیداتیو شدید در سلول‌های گیاهی شود. چنین سطحی از تنش، با تولید بیش از حد ROS از جمله H_2O_2 همراه است که با غشاهای سلولی و اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست و میتوکندری برهم‌کنش مستقیم دارد و به تدریج منجر به تخریب ساختار و عملکرد آن‌ها می‌گردد. با توجه به مشاهدات این پژوهش، به نظر می‌رسد در ابتدا، سلول‌های *A. annua* در مواجهه با غلظت‌های متعادل‌تر نانوذرات (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، با فعال‌سازی مسیرهای دفاعی و آنتی‌اکسیدانی و همچنین تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه (فنول‌ها و فلاونوئیدها) سعی در حفظ تعادل

بیوشیمیایی و پایداری سلولی را دارند. اما در غلظت‌های بحرانی‌تر (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و با گذشت زمان بیشتر تیمار (۴۸ تا ۷۲ ساعت)، افزایش ROS از مرز ظرفیت حفاظتی سلول عبور می‌کند و سیستم آنتی‌اکسیدانی (GPX و APX، CAT) دیگر قادر به مهار مؤثر آن نیست. در این شرایط، سلول از حالت پاسخ سازگارانه به حالت تنش مخرب گذر می‌کند. این تغییر فاز منجر به اختلال در عملکرد پایداری سلولی، آنزیم‌های کلیدی و مجموعه سیستم متابولیکی و در نتیجه کاهش سنتز ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌شود. علاوه بر این، افزایش شدید ROS خود باعث تجزیه و اکسیداسیون ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود می‌گردد؛ زیرا این ترکیبات به‌عنوان بخشی از سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی، مستقیماً در حذف ROS مصرف می‌شوند (Agati *et al.*, 2012; Michalak, 2006). بنابراین، کاهش مشاهده‌شده در مقادیر فنلی و فلاونوئیدی در تیمارهای مذکور، نه تنها بازتابی از کاهش بازدهی مسیرهای بیوسنتزی است، بلکه ناشی از مصرف دفاعی و تخریب اکسیداتیو ترکیبات تولیدشده نیز می‌باشد. این پدیده چرخشی از پاسخ تحریکی به پاسخ بازدارنده، پدیده‌ای شناخته‌شده در تعامل گیاه و نانوذرات است و در چارچوب مفهوم وابستگی دوز و زمان قابل توضیح است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز، به‌عنوان ایسیتورهای نانومقیاس، می‌توانند پاسخ‌های دفاعی سلول‌های *A. annua* را از طریق القای تنش اکسیداتیو و تجمع H_2O_2 فعال کنند. در غلظت‌های پایین‌تر (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، این محرک موجب افزایش متعادل فعالیت آنزیم‌های CAT و APX و به‌دنبال آن بیوسنتز وابسته به زمان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شد. در مقابل، غلظت‌های (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) هرچند در مراحل اولیه تولید این ترکیبات را افزایش دادند، اما با تداوم تیمار، تنش اکسیداتیو شدید از ظرفیت حفاظتی سلول فراتر رفت و کاهش معنی‌دار مقادیر این متابولیت‌ها رخ داد. بر اساس الگوهای مشاهده شده و مطالعات پیشین، به‌نظر می‌رسد H_2O_2 به‌عنوان یکی از اجزای کلیدی پاسخ دفاعی، در فعال‌سازی فرآیندهای بیوسنتزی نقش داشته باشد، هرچند بررسی دقیق سازوکارهای سیگنال‌دهی آن و مسیرهای پایین‌دستی، نیازمند پژوهش‌های تکمیلی است. نتایج این مطالعه بر اهمیت مدیریت دقیق غلظت و زمان تیمار برای بهره‌گیری از اثرات تحریکی نانوذرات و جلوگیری از اثرات مخرب تأکید دارد.

منابع

- Afkar, S., & Karimzadeh, G. (2025). Changes in Physiological Traits, Gene Expression and Phytochemical Profile of *Mentha piperita* in Response to Elicitor. *Biochemical Genetics*, 63(3), 2025-2039. <https://doi.org/10.1007/s10528-024-10805-6>.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant. Cell. Environ.* 24, 1337–1344 (2001). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>.

Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z. U. R. (2019). Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 715-724. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577884>.

Anjum, N. A., Gill, S. S., Duarte, A. C., Pereira, E. & Ahmad, I. Silver nanoparticles in soil-plant systems. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1896 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1896-7>.

Bhakuni, R. S., Jain, D. C., Sharma, R. P., & Kumar, S. (2001). Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current science*, 35-48.

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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis* 10: 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.

Chen, H., Bullock, D. A.Jr., Alonso, J. M., and Stepanova, A. N. (2022). To fight or to grow: the balancing role of ethylene in plant abiotic stress responses. *Plants* 11, 33. <https://doi.org/10.3390/plants11010033>.

de Vries, P. J., & Dien, T. K. (1996). Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. *Drugs*, 52(6), 818-836. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652060-00004>.

Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P., ... & Anderson, A. J. (2012). CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of nanoparticle research*, 14(9), 1125. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>.

Dionisio-Sese, M. L. & Tobita, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135, 1-9 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00025-9).

Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, M., Shujait Ali, S., Khan, A., & Wei, D. Q. (2019). Sustainable production of biomass and industrially important secondary metabolites in cell cultures of selfheal (*Prunella vulgaris* L.) elicited by silver and gold nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2553-2561 <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1625913>.

Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749-759. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.056>

Hendawey, M. H., FADL, R., & El-Din, T. S. (2015). Biochemical role of some nanoparticles in the production of active constituents in *Stevia rebaudiana* L. callus. *Life Science Journal*, 12(7), 144-156.

Hien, T. T., & White, N. J. (1993). Qinhaosu. *The Lancet*, 341(8845), 603-608.

Kelly, K. (2009). History of medicine, facts on file. *New York NY*, 10001.

Khaldari, I., Afshoon, E., & Nik, S. H. (2025). Phytohormonal elicitation triggers oxidative stress and enhances menthol biosynthesis through modulation of key pathway genes in *Mentha piperita* L. *Scientific Reports*, 15(1), 30495. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-16667-1>.

Khaldari, I., Naghavi, M. R., & Motamedi, E. (2021). Synthesis of green and pure copper oxide nanoparticles using two plant resources via solid-state route and their phytotoxicity assessment. *RSC advances*, 11(6), 3346-3353. <https://doi.org/10.1039/D0RA09924D>.

Khaldari, I., Naghavi, M. R., Motamedi, E., & Zargar, M. (2024). The effects of green and chemically-synthesized copper oxide nanoparticles on the production and gene expression of morphinan alkaloids in *Oriental poppy*. *Scientific Reports*, 14(1), 6000. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56709-8>.

Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(2), 135-148.

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/nbt2.12005>.

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y., & Watari, F. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials*, 170(2-3), 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.025>.

Low, P. S., & Merida, J. R. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 96(3), 533-542. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00469.x>.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish journal of environmental studies*, 15(4), 523-530.

Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Schober, Y., Römpp, A., Ghassempour, A., & Spengler, B. (2014). Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 108, 335-339. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.013>.

Mohammadi, F., Naghavi, M. R., Peighambari, S. A., Khosravi Dehaghi, N., Khaldari, I., Bravi, E., ... & Perretti, G. (2021). Abscisic acid crosstalk with auxin and ethylene in biosynthesis and degradation of inulin-type fructans in chicory. *Plant Biology*, 23(4), 636-642. <https://doi.org/10.1111/plb.13252>.

Nair, P. M. G., & Chung, I. M. (2014). Impact of copper oxide nanoparticles exposure on Arabidopsis thaliana growth, root system development, root lignification, and molecular level changes. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(22), 12709-12722. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3210-3>.

Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry reviews*, 16(6), 1227-1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>.

Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1).

Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A., & Soldatini, G. F. (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2529-2540. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg270>

Robert Verpoorte, & A. W. Alfermann. (2000). *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (R. Verpoorte & A. W. Alfermann, Eds.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9423-3>.

Samuelsson, G. (2004) Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy, *5th Swedish Pharmaceutical Press*.

Scebba, F., Sebastiani, L., & Vitagliano, C. (1998). Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 747-752. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040433.x>.

Tan, X. M., Lin, C., & Fugetsu, B. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon*, 47(15), 3479-3487. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.08.018>.

VI, S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

Xu, Z., & Deng, M. (2017). Identification and Control of Common Weeds: Volume 2 (Vol. 2). Springer.

Zhang, J., Zhou, M., Zhou, H., Zhao, D., Gotor, C., Romero, L. C., et al. (2021). Hydrogen sulfide, a signaling molecule in plant stress responses. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 146-160. <https://doi.org/10.1111/jipb.13022>.