

## بررسی تاثیر نانوذره و بالک اکسید روی بر بیان ژن های پراکسیداز و دلتا ۱-پرولین-۵- کربوکسیلات سنتتاز و فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای پرولین در گیاهچه های از مک

علی ریاحی مدوار <sup>۱\*</sup>Ph.D.، مهشید قاضی زاده احسای <sup>۲</sup>M.Sc.، فرشته جدید بنیاد <sup>۳</sup>M.Sc.، احسان نصیری فر <sup>۴</sup>Ph.D.

۱- دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران

۲- دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه بیوتکنولوژی، کرمان، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم دامی، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: riahi.ali@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۵

### چکیده

**هدف:** ارزیابی تاثیر نانوذره اکسید روی در مقایسه با اثرات فرم بالک آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، بیان ژن پراکسیداز، محتوای پرولین و بیان ژن آنزیم ۱-پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در گیاهچه های از مک.

**مواد و روش ها:** گیاهچه های از مک با سه تکرار مستقل و در قالب طرح کاملاً تصادفی بمدت ۷ روز در حضور غلظت های مختلف این ذرات رشد کردند، سپس پارامترهای مذکور اندازه گیری شدند.

**نتایج:** درحالی که فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار با ذرات نانو و بالک به ترتیب در حضور غلظت های بالاتر از ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به نمونه شاهد به طور معنی داری افزایش نشان داد، بیان ژن پراکسیداز در آن ها مشابه نمونه شاهد بود. از طرف دیگر، محتوای پرولین گیاهچه های تیمار شده، هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی داری افزایش یافت، درحالی که تفاوت معنی داری در بیان ژن P5CS در تیمارهای مختلف نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد. در گیاهچه های تیمار شده با فرم بالک، محتوای این اسید آمینه تا غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر به طور معنی داری افزایش و در غلظت های بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر به صورت معنی داری نسبت به نمونه شاهد کاهش نشان داد. بیان ژن P5CS در گیاهچه های تیمار شده با فرم بالک نیز تا غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر مشابه نمونه شاهد بود و در حضور بالاترین غلظت این ذره به صورت معنی داری کاهش نشان داد.

**نتیجه گیری:** از مجموع نتایج چنین به نظر می رسد که نانوذره اکسید روی نسبت به فرم بالک تاثیر کمتری بر پارامترهای ذکر شده داشته است که احتمالاً به دلیل آزاد شدن کمتر یون روی تحت این شرایط باشد.

**واژگان کلیدی:** بیان ژن، پراکسیداز، پرولین، نانو اکسید روی

## مقدمه

کاربرد روزافزون نانو ذرات در شاخه‌های مختلف پزشکی و علوم پایه می‌تواند تا اثرات سمی ممکن آن‌ها علیه سلول‌ها بیشتر مورد بررسی قرار گیرد (۱، ۲ و ۳). نانوذرات به ذراتی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر اطلاق می‌شود و شامل نانو ذرات فلزی و اکسیدی آن‌ها و ... می‌باشند (۴). این ذرات با سطح ویژه بالا و واکنش‌پذیری سطحی بالا نه تنها از طریق تماس فیزیکی جذب می‌شوند بلکه می‌توانند با پروتئین‌های زیستی میان‌کنش دهند و حتی توسط سلول‌ها جذب گردند (۵). اندازه، مهم‌ترین ویژگی نانو ذرات است، به همان میزان که اندازه ذرات کاهش می‌یابد نسبت سطح به حجم آن‌ها افزایش و اجازه می‌دهد تا سهم بزرگ‌تری از اتم‌ها یا مولکول‌ها در سطح نسبت به لایه داخلی ماده ظاهر شود (۶).

مکانیسم‌های مختلفی برای توجیه اعمال آسیب‌رسان نانو ذرات مطرح می‌شوند که در این میان بالا بردن سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) درون سلولی از اهمیت بیشتری برخوردار است. ثابت شده است که ROSها از روش‌های مختلفی نظیر آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیر سیگنالینگ سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن‌ها و غیره می‌توانند به سلول‌ها آسیب وارد کنند (۷). علاوه بر این، تولید ROS در نتیجه حضور نانو ذرات می‌تواند آسیب‌های جدی و قابل وراثتی را به DNA وارد کند. به عنوان مثال تغییرات شیمیایی در هیستون‌ها و یا دیگر پروتئین‌هایی که در شکل‌دهی ساختار DNA نقش دارند، ساختار مارپیچی DNA را از هم باز می‌کند و DNA را در معرض هر گونه تغییر قرار می‌دهد (۸) و (۹).

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تولید ROSها مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مختلفی استفاده می‌کنند. از مهمترین اجزای سیستم آنتی-اکسیدان آنزیمی می‌توان به پراکسیدازها (POD) و

کاتالاز (CAT) که موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ ) در سلول می‌شوند و بدین شکل از تجمع ROSها در سلول جلوگیری می‌کنند (۱۰) و همچنین سوپراکسید دیسموتاز (SOD) که رادیکال‌های سوپراکسید را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کند (۱۱) اشاره نمود. سیستم دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان شامل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند ترکیبات فنلی و رنگیزه‌ها اشاره نمود که به طور مستقیم و غیر آنزیمی باعث دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند (۱۲).

علاوه بر این، مطالعات قبلی نشان داده است که پرولین به عنوان یک اسمولیت مهم در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش‌هایی مانند دمای پایین، کمبود مواد غذایی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و اسیدیته بالا نقش اساسی دارد (۱۳). آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان آنزیم‌های دلتا-۱-پرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) است (۱۴ و ۱۵). در واقع P5CS یک آنزیم دو عملکردی است که دو واکنش ابتدایی را در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان کاتالیز می‌کند (۱۶). نقش مثبت پرولین در تعدیل فشار اسمزی نسبت به شوری و خشکی توسط محققین در گیاهان مختلف مانند ذرت (۱۷)، یونجه (۱۸) و آرابیدوپسیس (۱۹) گزارش شده است.

گیاه ازمک (*Lepidium draba*) یک علف هرز چندساله با سیستم ریشه عمیق و متعلق به خانواده براسیکاسه است. این گیاه ویژه مناطق گرم و نواحی آفتاب‌گیر است و خاک‌هایی با بافت سنگین و حاصلخیز را ترجیح می‌دهد (۲۰ و ۲۱). ازمک، مشابه سایر گونه‌های خانواده براسیکا حاوی گلوکوزینولات‌ها می‌باشد (۲۲) و (۲۳) که اثرات پیشگیری و درمانی آنها و مشتقاتشان بر بیماریهای مختلف ثابت شده است (۲۴ و ۲۵).

ZnO یکی از پر استفاده‌ترین نانو ذرات است، به طوری که تولید این نانو ذره رتبه سوم را بعد از سیلیکا ( $SiO_2$ ) و

در داخل ازت مایع قرار گرفتند و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

آنالیز بیان ژن‌های *P5CS* و *POD* بیان ژن‌های *P5CS* و *POD* به این صورت اندازه‌گیری شد که ابتدا استخراج RNA کل از گیاهچه‌های تیمار شده انجام و پس از سنتز کتابخانه cDNA و تکثیر ژن‌های مذکور در حضور پرایمرهای اختصاصی، میزان بیان آنها به صورت نیمه کمی مورد آنالیز قرار گرفت (۲۹).

**استخراج RNA کل:** استخراج RNA کل از گیاهچه‌ها مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت استخراج RNA (RNase-Plus) سیناژن انجام شد. ابتدا مقدار یک گرم از اندام هوایی گیاهچه‌های فریز شده در حضور نیتروژن مایع کاملاً ساییده شده تا پودر سفید رنگی حاصل شود. پودر حاصله به میکروتیوب ۱/۵ میلی-لیتری و فاقد RNase انتقال یافت. سپس یک میلی‌لیتر از محلول RNase-Plus به پودر مذکور اضافه و میکروتیوب ورتکس شد تا سوسپانسیون کاملاً همگن بدست آید. سوسپانسیون بدست آمده به مدت ۶۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به سوسپانسیون اضافه و میکروتیوب بشدت تکان داده شد و پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه) فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد. یکبار دیگر، سانتریفیوژ با شرایط فوق‌الذکر تکرار شد و این بار پس از حذف محلول رویی، به رسوب موجود، یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و میکروتیوب‌ها با ۷۵۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی خارج و درب میکروتیوب باز نگه‌داشته شد تا باقیمانده الکل در دمای اتاق تبخیر شود. در انتها به رسوب حاصله، ۳۰ میکرولیتر آب Diethylpyrocarbonate

تیتانیا ( $TiO_2$ ) را دارد و در آب نامحلول است (۲۶). این نانوذره در صنایع مختلف می‌تواند جانشین ماکرومولکول ZnO شوند و به طور گسترده در تولید لاستیک، سلول‌های خورشیدی، به عنوان یک جاذب uv در محصولات آرایشی مثل کرم‌های ضد آفتاب و محصولات زیبایی و غیره استفاده می‌شود (۲۷). در این تحقیق، فعالیت آنزیم پراکسیداز و بیان ژن پراکسیداز و همچنین محتوای پروتئین و بیان ژن *P5CS* در گیاهچه‌های از مک تیمار شده با فرم نانوذره و بالک اکسید روی مورد آنالیز قرار گرفتند.

### مواد و روش‌ها

**کشت گیاه و تیمار آن‌ها:** بذره‌های مورد استفاده در این تحقیق از گیاهان رشد یافته در اطراف شهر کرمان در اواخر بهار و اوایل تابستان جمع‌آوری گردیدند. به منظور کشت، ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۱۵ دقیقه) و پس از آبکشی با آب مقطر استریل (چهار مرتبه) در معرض الکل ۷۰ درصد (۴۵ ثانیه) قرار داده شدند و سپس آبکشی (چهار مرتبه با آب مقطر استریل) شدند. سپس بذرها در پلیت‌های نه سانتی‌متری حاوی محیط کشت MS (۲۸) (pH برابر ۷) که با آگار (۰/۸ درصد) جامد شده و حاوی فرم‌های مختلف اکسید روی (نانو و بالک) بودند قرار گرفتند. غلظت‌های مورد استفاده از فرم نانو و بالک اکسید روی شامل غلظت صفر (به عنوان شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. ابتدا پلیت‌ها در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $55 \pm 5$  درصد در انکوباتور و در تاریکی مطلق قرار گرفتند. پس از گذشت دو روز پتری دیش‌ها به ژرمیناتور با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (تاریکی/روشنایی) منتقل شدند. پس از گذشت پنج روز گیاهچه جمع‌آوری شدند و بعد از شسته شدن با آب مقطر استریل، اندام‌های هوایی جدا و در داخل فویل آلومینیوم استریل قرار گرفتند. جهت انجماد سریع، بلافاصله فویل‌ها

(DEPC) (0.1%) اضافه شد و نمونه‌ها به فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

جهت تعیین کمیت (میزان غلظت) و کیفیت (نسبت میزان RNA به پروتئین) RNA استخراج شده از دو روش اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۶۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز نمونه بر روی ژل آگارز (یک درصد) استفاده شد.

بمنظور حذف DNA ژنومی از RNA تخلیص شده، از کیت DNase I (Fermentas) استفاده شد. بدین منظور در یک میکروتیوب حاوی ۴ میکروگرم RNA استخراج شده، یک میکرولیتر آنزیم DNase و یک میکرولیتر از بافر آن اضافه گردید و حجم نهایی توسط آب DEPC زده به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور غیرفعال نمودن آنزیم، یک میکرولیتر EDTA (۲۵ میلی‌مولار) به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت نمونه‌ها جهت انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر -۲۰ منتقل شدند.

**سنتز کتابخانه cDNA:** بدین منظور، ابتدا مقدار لازم از RNA کل (یک میکروگرم) به پرایمر الیگو dT (یک میکرولیتر) و ۰/۵ میکرولیتر از مهار کننده RNase (۴۰ U/μL) اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس میکروتیوب‌ها به روی یخ منتقل شدند و ۲/۵ میکرولیتر از بافر (۱۰ X) Reverse Transcriptase (RT) ۰/۸ میکرولیتر از dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از مهار کننده RNase، ۱ میکرولیتر از آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT) (۲۰۰ U/μL; MMuLV) و در نهایت آب دیونیزه استریل فاقد RNase تا حجم نهایی ۲۵

میکرولیتر به تیوب‌ها اضافه گردید. پس از اسپین کردن ویال‌ها، در حمام آب گرم ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند. در انتهای واکنش به منظور حذف اثر RT، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

#### تکثیر ژن‌ها و اندازه‌گیری بیان آن‌ها:

توالی آغازگرهای مربوط به ژن P5CS بر اساس توالی ثبت شده در سایت NCBI از *Arabidopsis thaliana* با شماره دسترسی NM\_115419 و توالی آغازگرهای مربوط به ژن POD بر اساس توالی ثبت شده در سایت NCBI از گیاه *Lepidium draba* با شماره دسترسی KJ819932 و همچنین توالی آغازگرهای مربوط به ژن کنترل داخلی GAPDH از روی توالی ژن این آنزیم در گیاه *Armoracia rusticana* (جدول ۱) با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی و توسط شرکت MWG ساخته شدند. واکنش تکثیر ژن‌های مذکور با استفاده از آنزیم Taq پلیمرز و در حضور آغازگرهای اختصاصی برای حجم ۲۵ μl طبق جدول ۲ در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf و طبق پروفایل حرارتی در جدول ۳ انجام شد. در پایان، الکتروفورز محصولات واکنش روی ژل آگارز یک درصد انجام شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در زیر نور UV در دستگاه Gel documentation مشاهده شدند.

برای ارزیابی نیمه کمی بیان ژن‌های مذکور در غلظت‌های مختلف فرم نانو و بالک ZnO از مقایسه شدت باند تکثیر شده حاصل از بارگذاری پنج میکرولیتر از محصول PCR مربوط به هر نمونه بر روی ژل آگارز یک درصد، نسبت به کنترل داخلی، توسط نرم افزار TotalLap TL120 استفاده شد.

جدول ۱: توالی آغازگرها.

نام آغازگر	توالی آغازگرها	Tm (C°)	GC (%)
F-GAPDH	5'- AAGAAAGCTGGTATGATCCCTC -3'	60.3	45.4
R-GAPDH	5'-TACCTTAACCGCAGTGCATC-3'	58.4	50
F-P5CS	5'- CTTGTTTCAGATAGCTTCGCTTG -3'	60.3	50
R-P5CS	5'-TTATTCCCACCTCAGCACCAAGTC -3'	65.3	50
F-POD	5'-TGGACAGGTTATACGACTTTAGCAACACTGGTTTAC -3'	59.6	41.7
R-POD	5'- TCTATAAGCTTTTAAGAGTTAGTTCACCACCCTACA - 3'	59.6	77.6

جدول ۲: مقدار و مواد مورد استفاده در واکنش PCR.

مقدار در ۲۵ میکرو لیتر	غلظت محلول پایه	محلول پایه
2.5	10 X	PCR Buffer
1.5	50 mM	Mgcl2
0.6	10 mM	dNTPmix
0.6	10 pmol/μl	Forward Primer
0.6	10 pmol/μl	Reverse Primer
2	30-40ng/μl	Template
0.5	1Unit/ μl	DNATaq Polymerase
Up to 25		Water (ddw)

جدول ۳: پروتکل حرارتی واکنش PCR.

مراحل PCR	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	سیکل
واسرشت سازی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشت سازی هر چرخه	۹۵	۱	
اتصال آغازگر	۵۱	۰/۵	۳۰
بسط	۷۲	۱	
بسط نهایی	۷۲	۱۰	۱

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD; EC.1.11.1.7) با استفاده از روش Plewa و همکاران سنجیده شد. در روش مذکور میزان جذب تتراگایاکل تشکیل شده از گایاکل در نتیجه فعالیت پراکسیداز در مدت زمان ۳ دقیقه و طول موج ۴۷۰ نانومتر محاسبه شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ Mm با pH برابر ۷/۵، گایاکل ۴ درصد و یک درصد  $H_2O_2$  و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئین محلول بود. از ضریب خاموشی تتراگایاکل  $25.5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  = جهت محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین محلول گزارش شد (۳۲).

#### آنالیز آماری

کلیه آزمایشات با سه تکرار مستقل انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS توسط آزمون چند دامنه ای دانکن با در نظر گرفتن سطح اطمینان پنج درصد مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد

#### نتایج

#### آنالیز بیان ژن‌های P5CS و POD

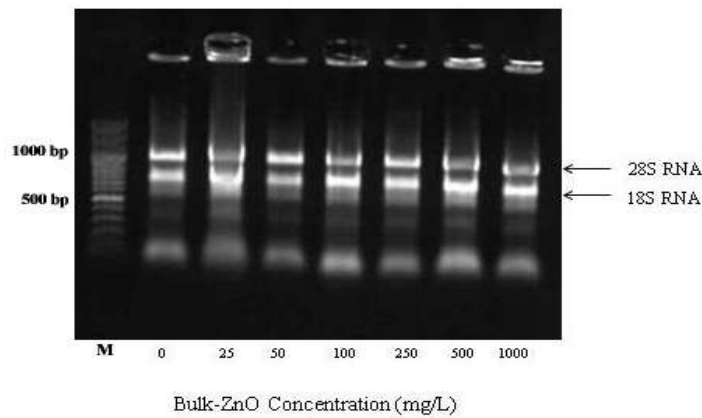
#### استخراج RNA و سنتز کتابخانه cDNA

کیفیت RNA کل استخراج شده از گیاهچه‌های بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی گردید. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد دو باند ۲۸S و ۱۸S مربوط به RNA ریپوزومی به وضوح برای تمامی نمونه‌ها قابل مشاهده است که نشان دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده می‌باشد. به منظور تکثیر ژن‌های مذکور، از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای Oligo dT و آنزیم رونوشت بردار معکوس (RT)، کتابخانه cDNA مربوط به هر نمونه ساخته شد.

**اندازه گیری مقدار پرولین:** برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران استفاده شد (۳۰). بدین‌منظور مقدار نیم گرم از برگ گیاهچه‌های از مک در ۱۵ میلی‌لیتر محلول سه درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتی‌فیوژ شد. سپس دو میلی‌لیتر از مایع رویی با دو میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط شد و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آبگرم قرار گرفت. سپس بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد شد. در ادامه، چهار میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه شد و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه‌داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه رنگی فوقانی که حاوی پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

#### سنجش فعالیت پراکسیداز: عصاره‌گیری آنزیمی و

سنجش محتوای پروتئین محلول کل عصاره‌گیری پروتئین‌های محلول از گیاهچه‌ها به این صورت انجام شد که مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از اندام هوایی (بافت فریز شده) در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM (pH ۷/۵) حاوی ۱ درصد پلی وینیل پیرولیدین (PVP)، یک میلی‌مولار EDTA و یک میلی‌مولار PMSF ساییده شد. سوسپانسیون بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (۲۹). محلول رویی پس از تعیین غلظت جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین استخراج شده توسط روش Bradford (۳۱) محاسبه گردید. بدین منظور، از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm اندازه‌گیری شد.

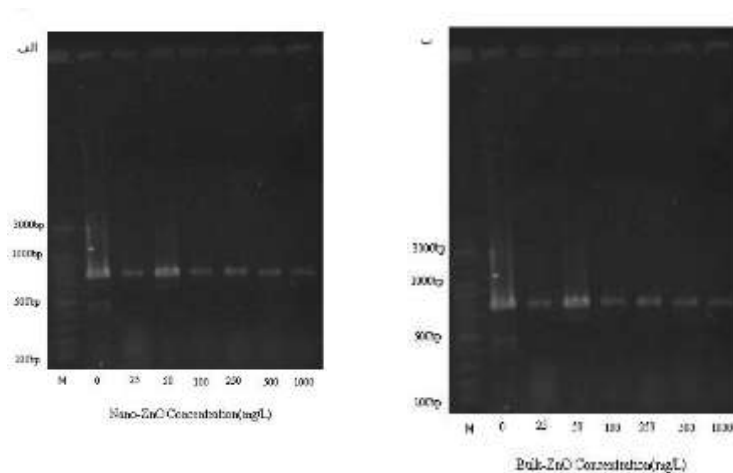


شکل ۱: نمونه‌ای از ژل آگارز یک درصد از RNAهای استخراج شده از گیاهچه‌های *L. draba* تیمار شده با ZnO M مارکر وزن مولکولی می‌باشد.

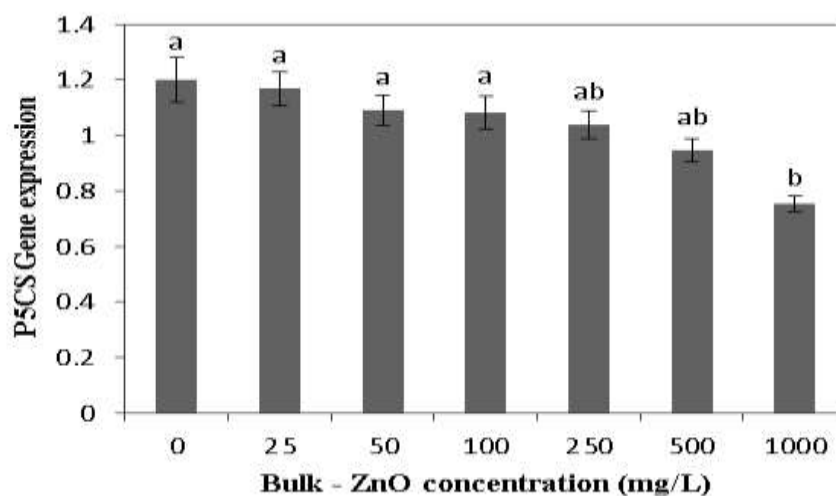
نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف فرم بالک و میزان بیان ژن P5CS در گیاهچه‌های *L. draba* تیمار شده با نانو ذره ZnO در مقایسه با نمونه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نداد. همان طور که در شکل ۳، قابل مشاهده است تغییر بیان این ژن در تیمار با فرم بالک ZnO نیز مشابه نمونه شاهد بود و تنها در حضور بالاترین غلظت این ذره نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌دار بیان مشاهده گردید.

### بیان ژن P5CS

تکثیر ژن‌های P5CS و GAPDH با استفاده از cDNA سنتز شده در حضور پرایمرهای اختصاصی و آنزیم Taq پلیمرز صورت گرفت. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن P5CS، ۷۵۷ bp به دست آمد.



شکل ۲: نمونه‌ای از ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن P5CS در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO (الف) و فرم بالک ZnO (ب). M مارکر وزن مولکولی می‌باشد.

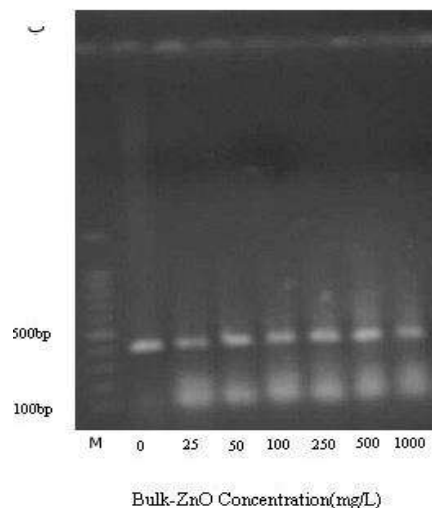
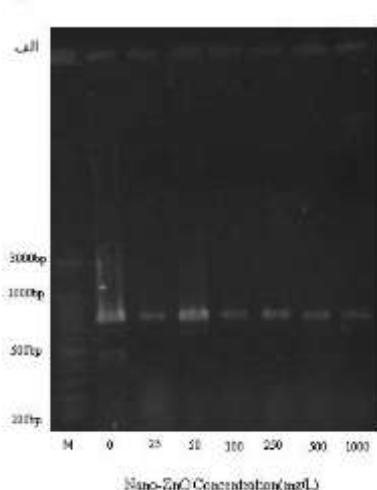


شکل ۳: مقایسه میزان نسبی بیان ژن P5CS در گیاهچه‌های تیمار شده *L. draba* با غلظت‌های مختلف فرم بالک ZnO. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی داری در سطح پنج درصد است.

### بیان ژن POD

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن POD در ژل یک درصد، ۳۶۷ bp به دست آمد. غلظت‌های مختلف فرم بالک و نانو ذره ZnO

بر میزان بیان ژن POD گیاهچه‌های هفت‌روزه *L. draba* تاثیری نداشتند.



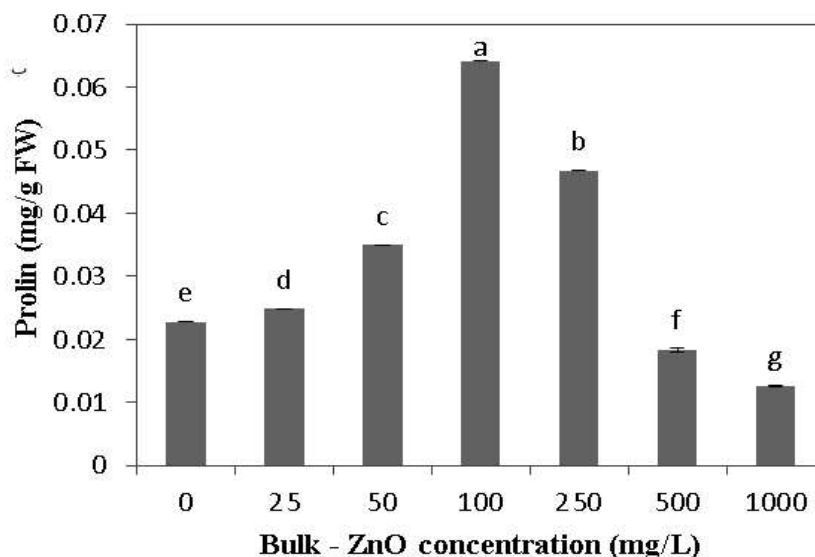
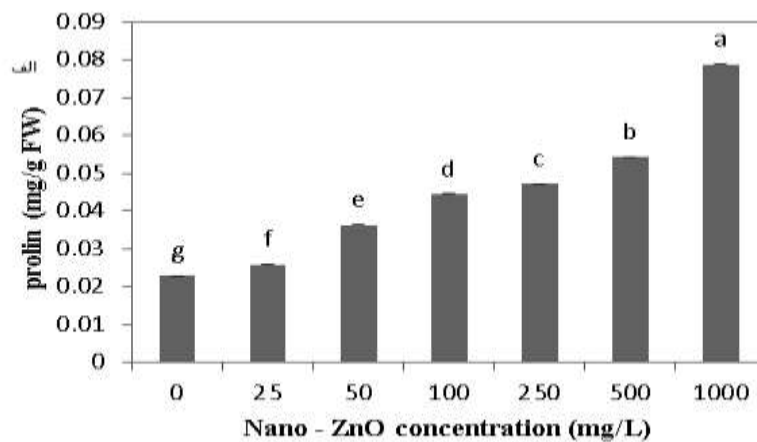
شکل ۴: نمونه‌ای از ژل آگارز مربوط به تکثیر ژن POD در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO (الف) و فرم بالک ZnO (ب). M. مارکر وزن مولکولی می‌باشد.



**محتوی پرولین**

همان طور که در شکل ۵، الف مشاهده می‌شود محتوای پرولین گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف فرم نانو با افزایش میزان غلظت نانوذره در محیط به طور معنی داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته است به طوری که محتوی پرولین در غلظت ۱۰۰۰ mg/L این ذره بیش از سه برابر نمونه شاهد می‌باشد. بر اساس شکل

۵، ب محتوی پرولین گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف فرم بالک تا غلظت ۱۰۰ mg/L در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافته است و بالاترین میزان پرولین در حضور غلظت ۱۰۰ mg/L این ذره مشاهده گردید. با افزایش غلظت این ذره در محیط محتوی پرولین کاهش یافت بطوریکه در حضور غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ mg/L کاهش معنی‌داری در سطح پنج درصد با نمونه شاهد مشاهده شد.

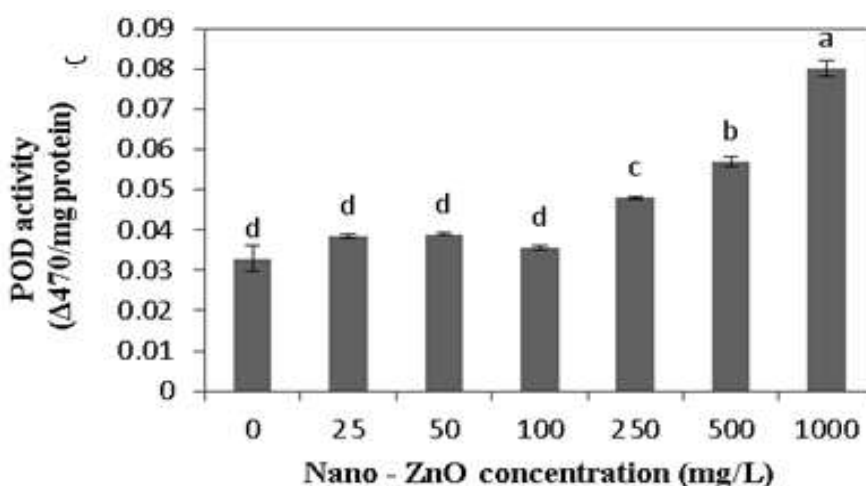
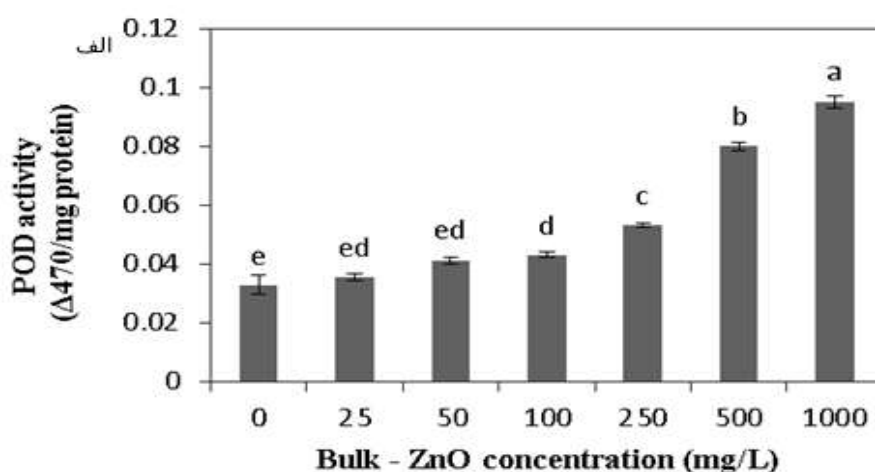


شکل ۵: محتوی پرولین گیاهچه‌های *L. draba* تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذره ZnO (الف) و فرم بالک ZnO (ب). حرف‌های متفاوت بالای نمودارها سطح معنی‌داری را در سطح پنج درصد نشان می‌دهند.

**فعالیت پراکسیداز**

همان‌طور که در شکل ۶، الف و ب مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف فرم بالک تا غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد نشان نداد ولی در غلظت‌های بالاتر به صورت گرادیان هماهنگ با افزایش غلظت این ذره در محیط به طور معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش نشان داد. همچنین فعالیت

این آنزیم در حضور نانوذره اکسید روی تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت ولی در غلظت‌های بالاتر به صورت گرادیان هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط به طور معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش نشان داد. فعالیت این آنزیم در حضور بالاترین غلظت فرم بالک نزدیک به ۳ برابر و در حضور نانوذره نزدیک به ۲/۵ برابر نمونه شاهد افزایش یافت



شکل ۶- فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهچه‌های *L. draba* تیمار شده با غلظت‌های مختلف فرم بالک ZnO (الف) و نانو ذره ZnO (ب). حرف‌های متفاوت بالای نمودار، معنی‌داری را در سطح پنج درصد نشان می‌دهند.

## بحث

استفاده روزافزون از نانوذرات در نهایت منجر به رها شدن این مواد به طبیعت می‌شود (۳۳ و ۳۴). درحالی‌که مطالعات مختلف حاکی از تحت تاثیر قرار گرفتن موجودات زنده پس از در معرض قرار گرفتن این مواد می‌باشد، هنوز مکانیسم اصلی عملکرد نانو ذرات شناخته نشده است (۶). مطالعات مختلف در محیط‌های *in vitro* و *in vivo* پیشنهاد می‌کنند که آن‌ها قادرند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند و روی غلظت کلسیم درون سلولی، فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سیتوکینین‌ها نقش داشته باشند (۷). بر حسب میزان تنش، گیاهان ممکن است با تولید متابولیت‌های سازگاری نظیر اسیدآمین، آنتی‌اکسیدانت‌های و هورمون‌ها اثرات تنش را خنثی نموده و به رشد خود ادامه دهند (۱۳). در این تحقیق، بمنظور بررسی اثرات نانو ذره اکسید روی بر گیاه از مک، فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوی پرولین و همچنین بیان ژن‌های آنزیم‌های POD و P5CS که در سنتز آنها درگیر هستند در مقایسه با اثرات فرم بالک این ذره مورد آنالیز قرار گرفتند.

همانطور که در نتایج قابل مشاهده است، فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های تیمار شده با نانوذره در حضور غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و در حضور فرم بالک در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت معنی‌داری در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته است. همچنین در حضور بالاترین غلظت این ذرات بیشترین فعالیت آنزیم در حضور فرم بالک مشاهده گردید (حدود ۳ برابر نسبت به شاهد). آنزیم پراکسیداز در گیاهان نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی دارد و یکی از آنزیم‌های کلیدی در جاروب کردن  $H_2O_2$  می‌باشد (۳۵). افزایش فعالیت آنزیم‌های جاروب کننده  $H_2O_2$  تحت تنش با فلزات سنگین از قبیل آهن و مس و همچنین نانوذرات اکسید آهن و اکسید مس در این گیاه مشاهده شده است (۳۶ و ۳۷). همچنین مطالعات انجام

شده بر روی این گیاه نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (جاروب کننده  $H_2O_2$ ) و SOD (جاروب کننده سوپر اکسید) در تیمار با یون روی افزایش می‌یابد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد (۳۸).

در مقابل با تغییر فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار با هر دو ذره، تغییر معنی‌داری در بیان ژن آنزیم پراکسیداز در تیمار با هر دو فرم این ذره در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نشد. بنابراین بنظر می‌رسد که افزایش فعالیت پراکسیداز می‌تواند به دلیل پایداری حضور این آنزیم در سلول بوده که می‌تواند سبب حذف  $H_2O_2$  شود و یا به دلیل وجود ایزوآنزیم‌های دیگری از این آنزیم. مطالعات گذشته نشان داده است که در گیاه ترب وحشی (Horseradish) از خانواده براسیکاسه هم‌خانواده گیاه از مک بیش از ۱۵ ایزوآنزیم وجود دارد (۳۹). بیان ژن آنزیم پراکسیدازی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت مربوط به ایزوآنزیم خنثی LDP بوده که اخیراً ژن آن از این گیاه استخراج و در بانک جهانی ژن ثبت شده است و ویژگی‌های آن مورد آنالیز قرار گرفته است (۴۰). ثابت شده است که پرولین پایدارترین اسیدآمین‌های است که در برابر تنش‌های اکسیداتیو مقاومت کرده و کمترین اثر بازدارندگی را بر رشد سلول‌ها در بین تمام اسیدآمین‌ها دارد (۱۳) و تولید آن تحت تنش‌های مختلف افزایش یافته است (۴۱ و ۴۲). بر اساس نتایج حاصله، تولید پرولین در گیاهچه‌های تحت تیمار با هر کدام از فرم نانو و بالک بسته به نوع و غلظت تحت تاثیر قرار گرفته است. نکته قابل توجه در ارتباط با تولید پرولین تحت شرایط تنش با این ذرات این است که در حضور نانوذره، محتوای این اسید آمینه به صورت گرادیان همزمان با افزایش غلظت نانوذره در محیط افزایش می‌یابد، در حالی‌که در حضور فرم بالک تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت گرادیان افزایش و در غلظت‌های بالاتر، محتوای آن کاهش یافته بطوریکه کاهش معنی‌دار آن در حضور غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

ذره شود. این نتیجه احتمالاً به دلیل حضور یون روی و یا آزاد شدن سریعتر یون روی بیشتر در فرم بالک نسبت به نانو بوده است و در نتیجه در حضور فرم بالک در غلظت‌های به‌کاربرده شده ایجاد رادیکال‌های آزاد بیشتر سبب تنش اکسیداتیو می‌شود. با این وجود مطالعات بیشتری لازم است تا اثرات فرم نانو و بالک ZnO بر بیان این ژن‌ها و همچنین سایر پارامترهای گیاهان اثبات شود.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته با قرارداد شماره ۱۳۹۵/۲/۲۶ مورخ ۷/۹۵/۴۰۱ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

#### منابع

1. Li JJ, Muralikrishnan S, Ng CT, Yung LY, et al. Nanoparticle-Induced Pulmonary Toxicity. *Exp Biol Med*. 2010; 235(9): 1025-1033.
2. Kaur S, Singhal B. When Nano Meets Stem: The Impact Of Nanotechnology In Stem Cell Biology. *J Biosci Bioeng*. 2012; 113(1): 1-4.
3. Kim JA, Lee N, Kim BH, Rhee WJ, et al. Enhancement Of Neurite Outgrowth In PC12 Cells By Iron Oxide Nanoparticles. *Biomaterials*. 2011; 32(11): 2871-2877.
4. Roco MC, Bainbridge WS. Societal Implications Of Nanoscience And Nanotechnology: Maximizing Human Benefit. *J Nanoparticle Res*. 2005; 7(1): 1-13.
5. Badawyame, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, et al. Impact Of Environmental Conditions (Ph, Ionic Strength, And Electrolyte Type) On The

قابل مشاهده است. هماهنگ با این نتایج، گزارشات قبلی نیز نشان داده است که برخی ترکیبات آنتی‌اکسیدان از قبیل محتوای فلاونوئیدی کل گیاهچه‌های از مک در تیمار با یون روی افزایش یافته است (۳۸).

همانطور که در نتایج نشان داده شده است، بیان ژن P5CS در تیمار گیاهچه‌های *L. draba* با غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO نسبت به نمونه شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. در حالیکه در تیمار گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف فرم بالک ZnO بیان این ژن تا غلظت ۱۰۰ mg/L مشابه نمونه شاهد بود و با افزایش غلظت این ذره در محیط کاهش بیان آن مشاهده شد بطوریکه کاهش معنی‌دار آن تنها در بالاترین غلظت این ذره در محیط مشاهده گردید. این نتایج با تغییرات محتوای پرولین گیاهچه‌های تیمار شده با فرم بالک این ذره مطابقت دارد. نشان داده شده است که افزایش سطح پرولین، حتی پس از حذف شرایط تنش تا مدتی حدود یک ماه باقی می‌ماند. در واقع تجمع افزایشی پرولین در سلول به دلیل القاء فعالیت آنزیم‌های P5CS و پرولین ۵- کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) در چرخه تولید این ماده و نیز ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده پرولین مانند پرولین دهیدروژناز (ProDH) و پرولین ۵- کربوکسیلات دهیدروژناز (P5CDH) در سلول است (۴۳).

#### نتیجه‌گیری

از مجموع نتایج چنین بر می‌آید که هر دو فرم بالک و نانو ذره ZnO بر محتوای پرولین و فعالیت آنزیم پراکسیداز تاثیر داشته‌اند. افزایش محتوای پرولین و همچنین فعالیت این آنزیم می‌تواند دلیلی بر بروز تنش اکسیداتیو تحت این شرایط باشد. اما فرم بالک در مقایسه با نانو اثر سمیتی بیشتری داشته است که سبب افزایش بیشتر فعالیت آنزیم پراکسیداز و همچنین کاهش محتوای پرولین و بیان ژن P5CS در مقایسه با نمونه شاهد در غلظت‌های بالای این

- Surface Charge And Aggregation Of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ Sci Technol.* 2010; 44(4): 1260-1266.
6. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic Potential Of Materials At The Nanolevel. *Science.* 2006; 311(5761): 622-627.
7. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials And Nanoparticles: Sources And Toxicity. *Biointerphases.* 2007; 2(4): 17-71.
8. Singh SV, Warin R, Xiao D, Powolny AA, et al. Sulforaphane Inhibits Prostate Carcinogenesis And Pulmonary Metastasis In TRAMP Mice In Association With Increased Cytotoxicity Of Natural Killer Cells. *Cancer Res.* 2009; 69: 2117-2125
9. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage And Genetic Instability In Vivo In Mice. *Cancer Res.* 2009; 69(22): 8784-8789.
10. Fang WC, Kao CH. Enhanced Peroxidase Activity In Rice Leaves In Response To Excess Iron, Copper And Zinc. *Plant Sci.* 2000; 158(1): 71-76.
11. Dong B, Sang WL, Jiang X, Zhou JM, et al. Effects Of Aluminum On Physiological Metabolism And Antioxidant System Of Wheat (*Triticum Aestivum* L). *Chemosphere.* 2002; 47: 87-92.
12. Foyer CH, Noctor G. Ascorbate And Glutathione: The Heart Of The Redox Hub. *Plant Physiol.* 2011; 155(1): 2-18.
13. Delauney AJ, Verma DPS. Proline Biosynthesis And Osmoregulation In Plants. *The Plant Journal.* 1993; 4(2): 215-223.
14. Sharma S, Villamor JGC, Verslues PE. Essential Role Of Tissue Specific Proline Synthesis And Catabolism In Growth And Redox Balance At Low Water Potential. *Plant Physiol.* 2011; 157(1): 292-304.
15. Chaitanya KV, Rasineni GK, Reddy AR. Biochemical Responses To Drought Stress In Mulberry (*Morus Alba* L.): Evaluation Of Proline, Glycine Betaine And Abscisic Acid Accumulation In Five Cultivars. *Acta Physiol Plant.* 2009; 31 (3):437-443.
16. Orcutt DM, Nilsen ET. The physiology of plants under stress: soil and biotic factors, John Wiley & Sons. 2000; 696.
17. Rayapati PJ, Stewart CR. Solubilization Of A Proline Dehydrogenase From Maize (*Zea Mays* L.) Mitochondria. *Plant Physiol.* 1991; 95(3): 787-791.
18. Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, Szabados L, et al. Isolation And Characterization Of Two Different Cdnas Of 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthase In Alfalfa, Transcriptionally Induced Upon Salt Stress. *Plant Mol Biol.* 1998; 38(5): 755-764.
19. Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A Nuclear Gene Encoding Mitochondrial Proline Dehydrogenase, An Enzyme Involved In Proline Metabolism, Is Upregulated By Proline But Downregulated By Dehydration In *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 1996; 8(8): 1323-1335.
20. King LJ. Weeds of the world: biology and control. *Plant Science Monographs.* London : Leonard Hill, - Plant science monographs 1966; 526.
21. Scurfield G. *Cardaria Draba* (L.) Desv. *The Journal Of Ecology.* 1962; 489-499.
22. Frécharde A, Fabre N, Hannedouche S, Fourasté I. Glucosinolates From *Cardaria Draba*. *Fitoterapia.* 2002; 73(2): 177-178.
23. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The Chemical Diversity And Distribution Of Glucosinolates And Isothiocyanates

- Among Plants. *Phytochemistry*. 2001; 56(1): 5-51.
24. Yeh CT, Yen GC. Chemopreventive Functions Of Sulforaphane: A Potent Inducer Of Antioxidant Enzymes And Apoptosis. *J Funct Foods*. 2009; 1: 23-32.
25. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane Inhibits Extracellular, Intracellular, And Antibiotic-Resistant Strains Of *Helicobacter Pylori* And Prevents Benzo [A] Pyrene-Induced Stomach Tumors. *PNAS*. 2002; 99: 7610-7615.
26. Lin D, Xing B. Phytotoxicity Of Nanoparticles: Inhibition Of Seed Germination And Root Growth. *Environ Pollut*. 2007; 150:243-250.
27. Ji S, Ye C. Synthesis, Growth Mechanism, And Applications Of Zinc Oxide Nanomaterials. *J Mater Sci Technol*. 2008; 24(4): 457.
28. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium For Rapid Growth And Bio Assays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plantarum*. 1962; 15, 473-497.
29. Nasiri-Bezenjani M, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A, Ahmadi A. Rosmarinic Acid Production And Expression Of Tyrosine Aminotransferase Gene In *Melissa Officinalis* Seedlings In Response To Yeast Extract. *JAST*. 2014; 16(4): 921-930
30. Bates L, Waldren R, Teare I. Rapid Determination Of Free Proline For Water-Stress Studies. *Plant And Soil*. 1973; 39(1): 205-207.
31. Bradford MM. Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 1967; 72: 248-254.
32. Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. Diethyldithiocarbamate Suppresses The Plant Activation Of Aromatic Amines Into Mutagens By Inhibiting Tobacco Cell Peroxidase. *Mutat Res-Fund Mol M*. 1991; 247(1): 57-64.
33. Owen R, Handy R. Formulating the problems for environmental risk assessment of nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 2007; 41: 5582-5588.
34. Behra R, Krug H. Nanoecotoxicology-Nanoparticles at large. *Nat Nanotechnol*. 2008; 3: 253-254.
35. Swathy Lekshmi S, Jayadev A. Influence of salt stress on the morphological physiological activity and anatomy of Cow pea plant (*Vigna unguiculata*). *IJAR*. 2017; 3 (8): 281-288.
36. Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M. Effects of iron and copper ions on sulforaphane content and peroxidase activity in *Lepidium draba* seedlings. *EPP*. 2014; 1: 8-14.
37. Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M. Nano-Metal oxides induced sulforaphane production and peroxidase activity in seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). *PBS*. 2016; 6(1): 75-83.
38. Riahi-Madvar A, Nasiri-Bezenjani MA, Yousefi K, Mohammadi M. Investigation of the ability of *Lepidium draba* L. seedlings in zinc and silver ions absorption and effect of the ions on morphological and biochemical characteristics of the seedlings. *Journal of Cell & Tissue*, 2015; 6(1): 59-70.
39. Welinder KG. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Med Res Opin*. 1992; 2(3): 388-393.

40. Fattahian Y, Riahi-Madvar A, Mirzaee R, Torkzadeh-Mahani M, et al. Heterologous expression, purification and characterization of a peroxidase isolated from *Lepidium draba*. Protein J. 2017; 36(6): 461-471.
41. Ashraf M. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. Flora-Morphology, Distribution. Funct Ecol. 2004; 199 (5): 361-376.
42. Hong Z, Lakkinen, K, Zhang Z, Verma DPS. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. 2000; 122 (4):1129-1136.
43. Solomon A, Beer S. Effect of NaCl on the carboxylating activity of rubisco and absence of proline related compatible solutes. Plant Physiol. 1994; 108: 1387-1394.

# Investigation of nano- and bulk ZnO particles effects on genes expression level of peroxidase and $\Delta$ 1- pyrroline-5-carboxylate synthetase and peroxidase activity and proline content in *Lepidium draba* seedlings

Riahi-Madvar A, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Ghazizadeh Ahsaei M, M.Sc.<sup>2</sup>, Jadid Bonyad F, M.Sc.<sup>2</sup>, Nasirifar E, Ph.D.<sup>3</sup>

1. Department of Biotechnology,, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
2. Department of Biotechnology, Faculty of Science and Modern Technology, Technology and Advanced Technology University, Kerman, Iran
3. Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: riahi.ali@gmail.com

Received: 27 Jul. 2019

Accepted: 3 Dec.2019

---

## Abstract

**Aim:** Evaluation effects of ZnO nanoparticles on peroxidase activity, gene expression of peroxidase enzyme, proline content and expression of proline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene in *L. draba* seedlings in compared to the effects of its bulk form.

**Material and Methods:** *L. draba* seedlings were grown in the presence of different concentrations of these particles for 7 days in fully-random designs with three repetitions; thereafter the mentioned parameters were measured.

**Results:** While the peroxidase activity was significantly evaluated in the presence of nano and bulk particle in the concentration more than 100 and 50 mg/L respectively, in them, the gene expression level of peroxidase was the same as the control. On the other hand, in the treated seedlings, proline content was significantly increased in accordance to the rising nanoparticle doses in media, while, no significant difference was seen in the P5CS gene expression in different treatments rather than control sample. In the bulk treated seedlings, content of this amino acid were significantly increased up to 100 mg/L concentrations and dramatically decreased in the presence of doses more than 250 mg/L in compared to the control sample. Gene expression level of P5CS was the same as the control in the presence of the bulk form up to 500 mg/L and significantly decreased at the highest concentration.

**Conclusion:** Based on the results, it seems that nanoparticle has fewer effects rather than the bulk form on the mentioned parameters, which may be due to release less Zn ion in this condition.

**Keywords:** gene expression, nano ZnO, peroxidase, proline