

## اثرات نانو ذرات آهن و مس بر فاکتورهای تنشی و سنتز رزمارینیک اسید در گیاه

### بادریشی (*Dracocephalum moldavica* L.)

نفیسه وارسته خانلری<sup>۱</sup>، خدیجه کیارستمی<sup>۱\*</sup>، منیر حسین زاده نمین<sup>۱</sup>، محمد عبدلی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران،

<sup>۲</sup> گروه تولید و زنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

\* [kh.kiarostami@alzahra.ac.ir](mailto:kh.kiarostami@alzahra.ac.ir) پست الکترونی نویسنده مسئول

#### چکیده

بادریشی (*Dracocephalum moldavica* L.) گیاهی یکساله، علفی و معطر از خانواده نعناع (Lamiaceae) است. این پژوهش با هدف بررسی اثر مجزا و توأم غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن (۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm) و مس (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ppm) بر گیاهان ۳ ماهه بادریشی و انتخاب بهترین تیمار جهت افزایش مقدار رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار و سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای به روش افشانه برگی انجام شد. جهت تأیید نفوذ نانوذرات به بافت برگی گیاه بادریشی، عکس TEM گرفته شد. مقدار رزمارینیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اثر تیمارها بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بادریشی بسیار معنی‌دار بود و بهترین نتایج توسط تیمار ترکیبی با غلظت ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن + ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس بدست آمد. در بهترین تیمار، مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید به ترتیب ۹۰/۹، ۱۲۵ و ۹۱/۶ درصد، آنتوسیانین ۷۳/۹ درصد، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها به ترتیب ۷۴/۱ و ۵۷/۱ درصد، MDA،  $H_2O_2$  و پرولین به ترتیب ۱۱۴، ۸۰/۹ و ۴۳/۵ درصد و رزمارینیک اسید ۴۶۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داشتند. همچنین در تیمار ترکیبی مذکور، مقدار  $IC_{50}$  به میزان ۵۶/۹ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین مقدار تولید رزمارینیک اسید و سایر صفات به استثناء مقدار  $IC_{50}$  ( $r = -0.958^{**}$ ) وجود داشت.

کلمات کلیدی: بادریشی، گونه‌های فعال اکسیژن، محرک، متابولیت‌های ثانویه، میکروسکوپ الکترونی گذاره

#### مقدمه

بادریشی با نام علمی *Dracocephalum moldavica* L. گیاهی از خانواده نعناع است (Simea et al., 2023). گیاهان این خانواده پراکندگی وسیعی دارند و به علت دارا بودن ترکیبات فنلی، حائز اهمیت زیادی هستند (Atanasova et al., 2023). بادریشی گیاهی معطر و یکساله با ساقه‌ای مکعبی شکل است که به علت وجود آنتوسیانین، بنفش رنگ است (Simea et al., 2023). برگ‌های این گیاه دندانه‌دار و گل‌ها به رنگ بنفش تیره می‌باشد که این گیاه در طب سنتی کاربرد زیادی دارد. از این گیاه برای از بین بردن نفخ شکم، معده درد و سردرد استفاده می‌شود. بادریشی دارای ترکیبات فنلی بسیاری مانند کافئیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، آپیجین و فرولیک اسید است (Simea et al., 2023).

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

مهمترین ترکیب فنلی بادرشبی رزمارینیک اسید است که در مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می شود (Vafadar et al., 2023). رزمارینیک اسید به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی برای درمان بیماری هایی مانند سرطان اهمیت زیادی دارد (Simea et al., 2023).

کشت و بهره برداری از گیاهان دارویی در طبیعت محدودیت هایی دارد. همچنین در مقیاس وسیع از کشت گیاهان دارویی مقدار ناچیزی متابولیت ثانویه استخراج می شود. محققین در تلاش هستند که بتوانند در مدت زمان کوتاه و با هزینه کمتر مقادیر قابل توجهی از متابولیت های ثانویه را تولید نمایند. یکی از این روش ها، تحریک سنتز متابولیت های ثانویه با استفاده از محرک ها است (Twajj et al., 2022).

محرک های زیستی و غیر زیستی ترکیباتی هستند که در غلظت های بسیار کم می توانند متابولیت های ثانویه را در مقیاس وسیعی تولید نمایند. مقدار متابولیت های ثانویه در گیاهان تیمار نشده بسیار ناچیز است، در حالی که در گیاهان تیمار شده با انواع محرک ها مقدار متابولیت های ثانویه به شدت افزایش می یابد (Ghosh & Pal, 2023). محرک های زیستی با فعال نمودن سازوکارهای دفاعی منجر به سنتز متابولیت های ثانویه و همچنین منجر به پاسخ های فوق حساسیتی در گیاهان می شوند. سلول های گیاهی با درک محرک ها، پاسخ های دفاعی سریع مانند تولید انواعی از گونه های فعال اکسیژن (ROS)، فعال نمودن ژن های دخیل در دفاع، سنتز فیتواکسین ها، ایجاد تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و همچنین افزایش جریان های یونی از عرض غشای پلاسمایی پاسخ می دهند (Ghosh & Pal, 2023).

یکی از مهمترین محرک ها، نانوذرات هستند. این ذرات با داشتن سطح کوچک، بسیار واکنش پذیر هستند و از آنجایی که حلالیت پذیری بالایی دارند، در کوتاه ترین زمان ممکن می توان به بهترین نتیجه دست یافت (Selmani et al., 2022). مطالعات بسیاری در زمینه اثر نانوذرات بر رشد و متابولیسم گونه های گیاهی مختلف صورت گرفته است. به عنوان مثال، استفاده از نانوذرات آهن با غلظت 90 ppm در گیاه بادرشبی (Moradbeygi et al., 2020) و باغلظت 0/2 ppm در گیاه ریحان (Tavallalia et al., 2020) موجب افزایش مقدار رزمارینیک اسید شد.

بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات آهن و مس بصورت مجزا و توأم روی گیاهان بادرشبی انجام شد تا بهترین تیمارها جهت افزایش تولید رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی اکسیدانی انتخاب شوند و از آنجایی که استفاده از نانوذرات منجر به ایجاد تنش در گیاهان می شود در نتیجه انتظار می رود که میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین، MDA، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و پرولین نیز افزایش یابند. در این پژوهش برای نخستین بار اثر ترکیبی نانوذرات مس و آهن در گیاه بادرشبی مورد بررسی قرار گرفته است و علت استفاده این نانوذرات، نقش کاربردی آن ها در بسیاری از آزمون های کلیدی در مسیر فتوسنتز و زنجیره انتقال اکترون می باشند.

### مواد و روش ها

#### مواد گیاهی

بذرهای گیاه دارویی بادرشبی از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) (<http://www.Pakanbazar.com>) و نانوذرات آهن و مس با اندازه های به ترتیب 35 تا 45 و 40 نانومتر از شرکت نانو صدرا (مشهد، ایران) خریداری شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه ای انجام شد. 48 عدد گلدان اندازه شماره 4 با ارتفاع

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.



## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

برش عرضی با ضخامت ۶۰ نانومتر تهیه شد. نمونه‌ها با محلول اورانیل‌استات و سیترات‌سرب رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ الکترونی با ولتاژ ۶۰ کیلو وات عکس‌برداری انجام شد (Moazzami Farida *et al.*, 2020).

### سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

مقدار ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ‌گی در حجم ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی سائیده شد. همگنای به دست آمده با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه (rpm) و به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ مدل Tixelle سانتریفیوژ شدند. روشن‌اور جدا شده و جذب آن در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان قرائت شد. سپس با توجه به فرمول زیر مقدار هر کدام از رنگیزه‌ها محاسبه شد (Lichthentalel, 1987).

$$a \text{ کلروفیل } (mgg^{-1}FW) = ((11.75 * A_{663}) - (2.35 * A_{645})) * V / 1000W$$

$$b \text{ کلروفیل } (mgg^{-1}FW) = ((18.61 * A_{645}) - (3.96 * A_{663})) * V / 1000W$$

$$\text{کاروتنوئیدها } (mgg^{-1}FW) = ((1000 * A_{480}) - (2.27 * Chla) - (81.4 * Chlb)) / 227 * V / 1000W$$

$W$  = وزن تر نمونه،  $V$  = حجم محلول صاف شده و  $A$  = جذب نور در طول موج‌ها

### سنجش محتوای آنتوسیانین کل

مقدار ۱ گرم بافت تازه برگ‌گی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (حاوی ۱ ml + ۹۹ ml 100% HCl) به خوبی سائیده و به مدت ۲۴ ساعت خیس‌انده شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس جذب هر یک از نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول موج ۵۱۱ نانومتر قرائت شد (Hara *et al.*, 2003).

### سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA)

جهت بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون‌دی‌آلدهید در واکنش با تیوباربیتوریک‌اسید سنجش شد. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت تازه برگ‌گی در محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱ درصد (TCA) به حجم ۵ میلی‌لیتر در هاون سائیده شدند. همگنای بدست آمده با سرعت ۱۰۰۰g (۴۰۰۰ rpm) و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از روشن‌اور به ۴ میلی‌لیتر از محلول TCA ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۰/۵ ساعت در بن ماری با دمای ۹۵ °C قرار گرفت. بعد از این زمان به حمام یخ منتقل شد. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰g (۴۰۰۰ rpm) و به مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان قرائت شدند. مقدار مالون‌دی‌آلدهید با ضریب خاموشی  $cm^{-1}$   $1 \mu M^{-1}$  و بر اساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ( $\mu M/gFw$ ) و بر اساس فرمول  $A = \epsilon bc$  گزارش شد که در این فرمول  $A$  جذب خوانده شده،  $\epsilon$  ضریب خاموشی،  $b$  عرض کووت ۱ cm و  $c$  غلظت کمپلکس می‌باشد (Heath and Paker, 1968).

### سنجش محتوای پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

جهت بررسی محتوای پراکسید هیدروژن ۰/۴ گرم بافت تازه برگ‌گی در حمام یخ با ۴ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از روشن‌آور هر یک از نمونه‌ها بافر فسفات‌پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=۷ به مقدار ۱ میلی‌لیتر و یدیدپتاسیم یک مولار به اندازه ۲ میلی‌لیتر اضافه گردید و در نهایت جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان قرائت گردید. مقدار  $H_2O_2$  موجود در هر یک از نمونه‌ها بر حسب  $\mu\text{mg}^{-1}\text{FW}$  گزارش شدند (Velikova et al., 2000).

### سنجش محتوای پرولین

#### الف: آماده سازی معرف پرولین

نین هیدرین به مقدار ۱/۲۵ گرم به همراه ۳۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال و ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار در دمای  $40^\circ\text{C}$  مخلوط شدند. تمامی مراحل در زیر هود انجام شد. این معرف به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $4^\circ\text{C}$  پایدار است.

#### ب: سنجش پرولین

مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه برگ در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به خوبی سائیده شد تا ترکیب همگنی ایجاد شود. سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۲ صاف شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول صاف شده هر نمونه، ۲ میلی‌لیتر معرف پرولین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط و در بن ماری در دمای  $100^\circ\text{C}$  به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در حمام یخ قرار گرفتند. مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به نمونه‌ها در زیر هود اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. بعد از تفکیک فاز تولوئن از فاز آبی جذب فاز تولوئن نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان قرائت و مقدار پرولین بر حسب  $\mu\text{g/g FW}$  گزارش شد (Bates et al., 1973).

### سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها

#### الف: آماده سازی عصاره

مقدار ۲ گرم از برگ‌های تازه به همراه ۳ میلی‌لیتر از اتانول ۷۰ درصد بخوبی سائیده و یک شب خیسانده شد. پس از سانتریفیوژ عصاره بدست آمده برای سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت (Heimler et al., 2009).

#### ب: سنجش میزان ترکیبات فنلی

مقدار ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره، ۲۵ میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالتو و ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. بعد از ۶ دقیقه به نمونه‌ها مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷ درصد اضافه شد و با آب مقطر حجم نمونه‌ها به ۳ میلی‌لیتر رسید. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان قرائت گردید. با استفاده از معادله خطی بدست آمده از منحنی استاندارد گالیک اسید میزان ترکیبات فنلی موجود در هر نمونه بر حسب میکروگرم گالیک اسید در گرم وزن تر محاسبه شد (Heimler et al., 2009).

#### ب: سنجش میزان فلاونوئید کل

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

مقدار ۰/۲۵ میلی لیتر از عصاره، ۷۵ میکرو لیتر محلول سدیم نیترات ۵ درصد، ۷۵ میکرو لیتر آمونیوم کلراید ۱۰ درصد تازه و ۰/۵ میکرو لیتر محلول سدیم هیدروکساید ۱ مولار با هم مخلوط و حجم محلول با استفاده از آب مقطر به ۲/۵ میلی لیتر رسانیده شدند. پس از ۵ دقیقه جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول موج ۴۱۴ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از نمودار خطی حاصل از منحنی استاندارد کوئرتستین میزان فلاونوئید کل موجود در هریک از نمونه‌ها به صورت میلی گرم در کوئرتستین در گرم وزن تر محاسبه گردید (Heimler *et al.*, 2009).

### سنجش محتوای فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون (DPPH)

مقدار ۱ گرم از بافت تازه برگگی با ۱ میلی لیتر از اتانول ۹۰ درصد بخوبی سائیده شد. از هر یک از نمونه‌ها غلظت‌های ( $200, 150, 100, 50, 0$ )  $\mu\text{gml}^{-1}$  تهیه شد و به هر یک از نمونه‌ها مقدار ۱ میلی لیتر محلول متانولی DPPH (۴۰ میکروگرم DPPH در میلی لیتر متانول) اضافه و حجم نهایی با استفاده از متانول به ۴ میلی لیتر رسانیده شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی جذب آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شدند (Brand- Williams *et al.*, 1995).

### سنجش مقدار رزمارینیک اسید به روش HPLC

آماده سازی استاندارد رزمارینیک اسید:

ابتدا ۲۰ میلی گرم از استاندارد رزمارینیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد حل شد. ۲۰ میلی لیتر از این محلول با استفاده از اتانول ۵۰ درصد به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و در نهایت با استفاده از فیلتر با قطر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. روش آماده سازی نمونه‌ها:

نمونه‌ها در دمای  $45^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک شدند. به ۰/۲ گرم از هر یک از نمونه‌های پودر شده، ۵۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد اضافه و در آن حل شدند و با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شدند. مقدار ۲۰ میکرو لیتر از هر نمونه جهت تعیین مقدار رزمارینیک اسید به دستگاه تزریق شد.

مشخصات سیستم مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل کمی رزمارینیک اسید:

بررسی کمی رزمارینیک اسید در نمونه‌ها توسط Knauer مجهز به ستون Eclipse- XBD- C18 (25cm\*4.6cm\*5cm) در دمای  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  انجام پذیرفت.

سیستم حلال مورد استفاده در این مطالعه شامل:

حلال A (اسید فسفریک، استونیتیل، آب به نسبت ۱:۱۹:۸۰ v/v/v) و حلال B (اسید فسفریک، متانول، استونیتیل به نسبت ۱:۴۰:۵۹ v/v/v).

برنامه شستشو به شرح زیر بود:

A (v/v) 55-100% در ۲۰-۰ دقیقه، A (v/v) 0-55% در ۲۰-۲۵ دقیقه، B (v/v) 45-0% در ۲۰-۰ دقیقه، B (v/v) 100-

45% در ۲۰-۲۵ دقیقه.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.



## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

نرخ جریان مورد استفاده جهت شستشوی ستون  $1 \text{ ml min}^{-1}$  و حجم نمونه تزریق شده به دستگاه ۲۰ میکرولیتر می باشد و پیکها در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. رزمارینیک اسید در کروماتوگرام با تطبیق نمونه استاندارد شناسایی شدند و رزمارینیک اسید موجود در هر نمونه با استفاده از منحنی کالیبراسیون کمی سازی شدند.

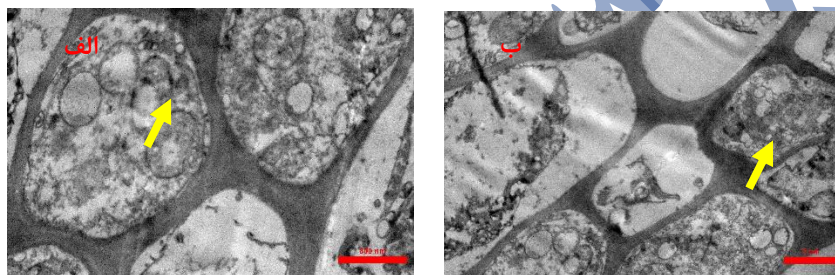
### تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نرم افزار SPSS19 و جهت مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. همبستگی ساده (t) بین صفات از روش پیرسون برآورد گردید.

### نتایج

#### بررسی میکروسکوپی

شکل ۲ عکس‌های میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission Electron Microscopy: TEM) را نشان می‌دهد که نفوذ نانوذرات آهن و مس به درون بافت‌های برگ گیاه بادرشبی را تایید می‌کند.



شکل ۲: نمایش نفوذ نانوذرات به درون بافت‌ها، الف: تصویر نفوذ نانو ذره آهن به درون بافت برگ گیاه بادرشبی ب: تصویر نفوذ نانو ذره مس به درون بافت برگ گیاه بادرشبی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

#### رنگیزه‌های فتوسنتزی

کمبرود آهن می‌تواند اثرات نامطلوبی بر گیاهان گذاشته، باعث کاهش سطح کلروفیل و کاهش ظرفیت فتوسنتزی در آنها شود (Wang et al., 2022) از طرف دیگر کمبود آهن اثر منفی بر برگ‌های جوان گذاشته و منجر به کلروز شدن آنها می‌شود. مس یکی از اجزای تشکیل دهنده پلاستوسیانین است که از کمپلکس‌های کلروپلاست می‌باشد و کمبود آن می‌تواند باعث کاهش میزان کلروفیل شود (Wang et al., 2023).

کاروتنوئید یک ترکیب تتراترپنی بوده که از کلروفیل در مقابل اکسیداسیون نوری محافظت کرده و همچنین وظیفه جذب نور و انتقال انرژی را به صورت رزونانس به کلروفیل مرکز فتوسیستم‌های I و II دارد. همچنین کاروتنوئیدها حاوی رنگیزه‌های غیرفتوسنتزی بوده که انرژی اضافی طول‌موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن یکتا را تبدیل به اکسیژن سه‌تایی می‌نماید و رادیکال‌های اکسیژن ایجاد شده را گرفته و به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌نماید (Collini, 2019).

در طی تنش‌های زیستی و غیرزیستی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد (Sachdev et al., 2021). سلول‌های گیاهی برای کاهش اثرات منفی تنش‌ها از یکسری مکانیسم‌های دفاعی برخوردار می‌باشند که یکی از این ساز و کارها استفاده

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

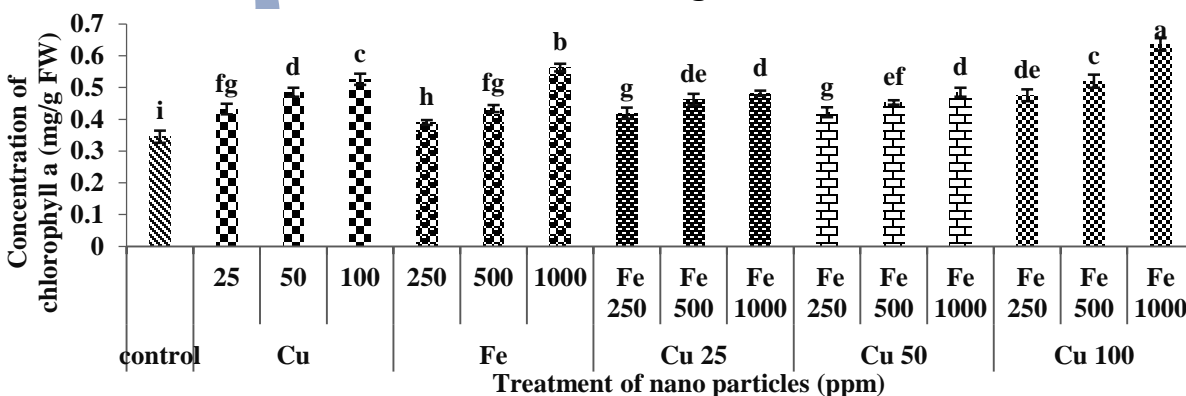
## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

از آنتی اکسیدان‌هایی همانند کاروتنوئیدها می‌باشد که باعث می‌شود سلول‌ها مانع تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده و یا اینکه گونه‌های فعال اکسیژن را جاروب نموده و اثرات منفی آن‌ها را کاهش دهند (Collini, 2019).

بر اساس یافته‌های این پژوهش تیمار گیاه بادرشبی با نانوذرات مس و آهن بصورت مجزا و ترکیبی منجر به افزایش معنی‌دار در مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها شد. نانوذرات مس با غلظت ۱۰۰ ppm و نانوذرات آهن با غلظت ۱۰۰۰ ppm اثر بیشتری بر محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی داشتند و نانوذرات آهن نسبت به نانوذرات مس موثرتر بودند. استفاده از تیمار ترکیبی نانوذرات در غلظت  $1000\text{Fe} + 100\text{Cu}$  با افزایش قابل ملاحظه در محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی همراه بود. همین وضعیت در بررسی محتوای آنتوسیانین کل مشاهده شد.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در سطح احتمال یک درصد، تفاوت بسیار معنی‌داری بین تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها وجود داشت ( $P \leq 0.01$ ). در برگ‌های تیمار شده با مقادیر مختلف نانوذرات آهن و مس، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ ppm نانوذرات آهن مقدار کلروفیل a و b به ترتیب ۶۹/۶ و ۷۰/۸ درصد و برای کاروتنوئید ۶۴/۳ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات مس مقدار کلروفیل a و b به ترتیب ۵۷/۵ و ۵۸/۳ درصد و برای کاروتنوئید ۷۸ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در تیمار ترکیبی نانوذرات آهن و مس (۱۰۰۰ ppm نانوذرات آهن + ۱۰۰ ppm نانوذرات مس) مقدار رنگیزه‌ها افزایش بیشتری نشان داد و کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها نسبت به شاهد به ترتیب ۹۰/۹، ۱۲۵ و ۹۱/۶ درصد افزایش نشان دادند (شکل ۳ الف، ب و ج).

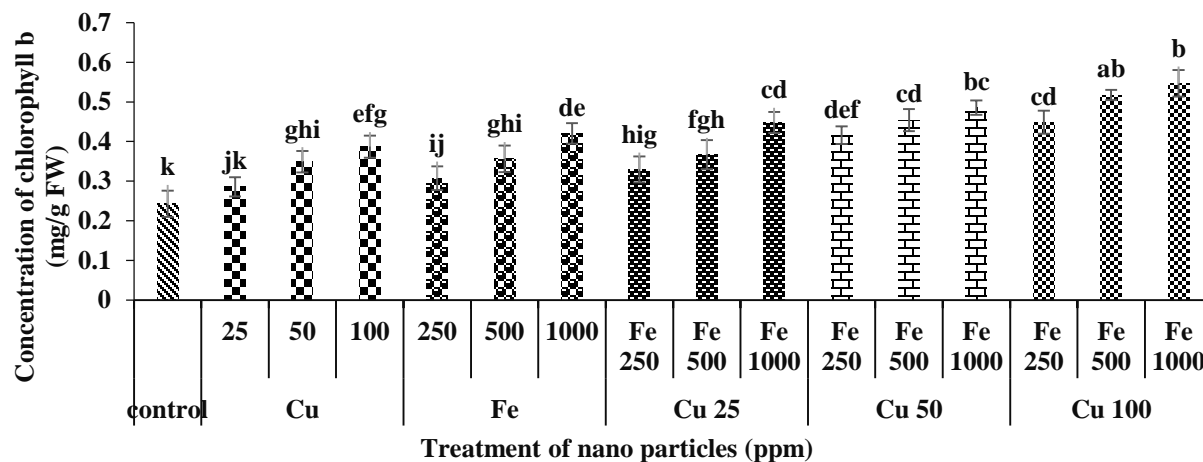
گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در مرحله ۶ تا ۸ برگی با غلظت‌های ۱۰، ۵، ۱ و ۰ با نانوذرات مس تیمار شدند که بالاترین مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی زمانی مشاهده شد که نمونه‌ها با غلظت ۵ ppm تیمار شده بودند (یوسف زایی، ۱۳۹۶). گیاه بادرشبی ۷۴ روزه با غلظت‌های ۴۰۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰ و ۰ از نانوذرات اکسید مس تیمار شدند که بالاترین مقدار کلروفیل a و کلروفیل b در غلظت ۸۰ ppm نسبت به شاهد به ترتیب ۶۶ و ۱۲۳ درصد افزایش یافت (Nekoukhou et al., 2023). در پژوهشی دیگر، گیاه بادرشبی ۶۰ روزه با غلظت‌های ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۰ نانوذرات آهن تیمار شدند. بالاترین مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی زمانی مشاهده شد که از غلظت ۱۰۰۰ ppm نانوذرات آهن استفاده شده بود (Yousefzadeh et al., 2016) که مشابه نتایج بدست آمده از پژوهش ما بود.



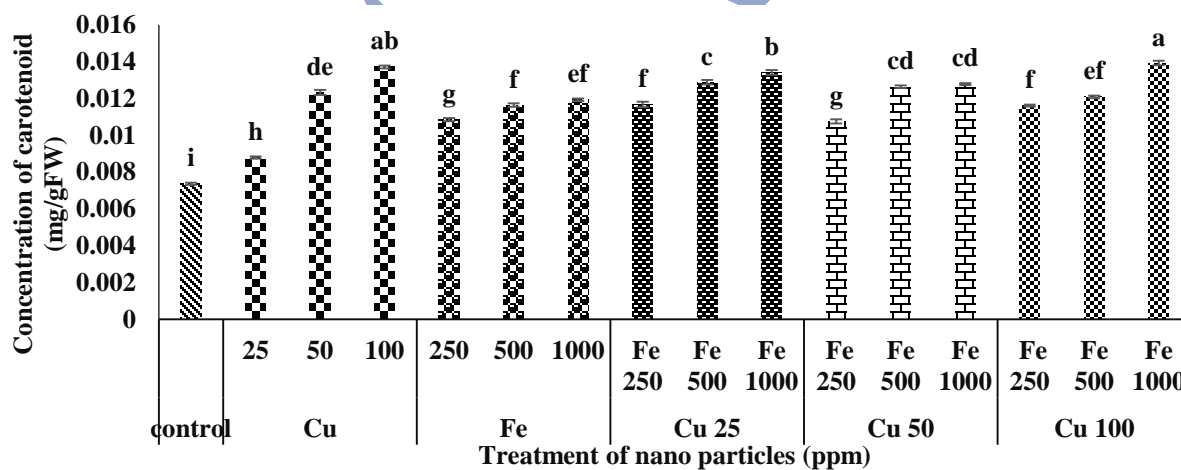
این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۳: محتوای کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب) و کاروتنوئیدها (ج) در گیاهچه‌های بادرشبی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس بر میزان تغییرات کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید در گیاه بادرشبی

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید
غلظت	۱۵	۰/۰۲۴**	۰/۰۹۷**	۰/۰۸۷**
میانگین مربعات				

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

خطا	۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵
کل	۴۷			
ضریب تغییرات (%)		۵/۰۰	۴/۷۵	۵/۶۸

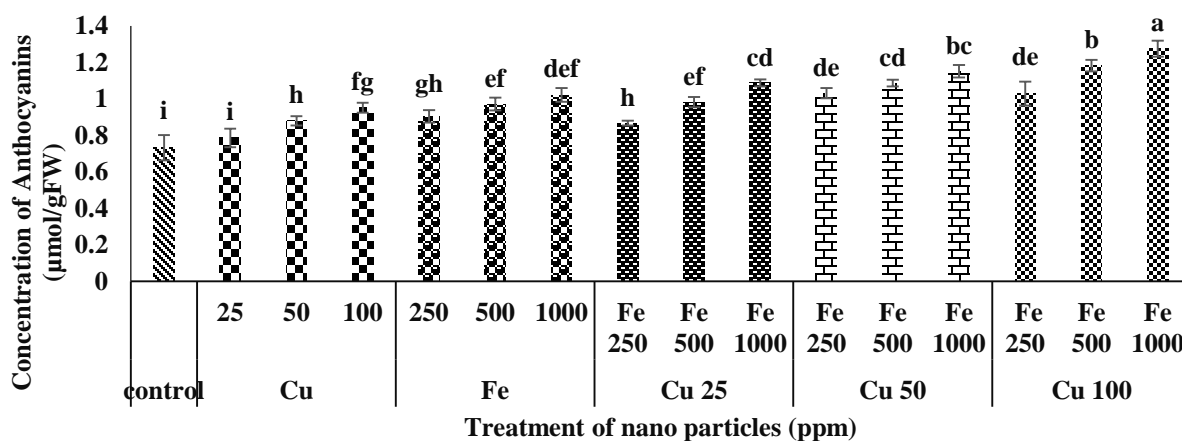
\*\* تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

### آنتوسیانین کل:

در تنش‌های زیستی و غیر زیستی، مقدار گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان به شدت افزایش می‌یابد و آسیب‌های جدی به گیاهان وارد می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به عنوان مولکول‌های علامت دهنده عمل نموده و منجر به فعال شدن سازوکارهای تحمل به تنش در گیاهان شوند. یکی از این سازوکارها، رونویسی از ژن‌های دخیل در بیوستز آنتوسیانین است که در نهایت منجر به افزایش سطح آنتوسیانین در گیاهان می‌شود (Xu and Rothstein, 2018).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در سطح احتمال یک درصد، تفاوت بسیار معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس از نظر تأثیر بر محتوای آنتوسیانین کل وجود داشت ( $P \leq 0.01$ ). در برگ‌های تیمار شده با مقادیر مختلف نانو ذرات آهن و مس، محتوای آنتوسیانین کل در مقایسه با شاهد افزایش یافت. بیشترین محتوای آنتوسیانین در تیمار مجزای نانوذرات در غلظت‌های ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس و ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن بدست آمد که در مقایسه با شاهد به ترتیب ۳۰/۱ و ۳۹/۷ درصد بیشتر بودند. بالاترین مقدار آنتوسیانین در نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت ترکیبی در تیمار ۱۰۰۰ ppm نانوذرات آهن + غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات مس مشاهده شد. در این حالت مقدار آنتوسیانین در مقایسه با شاهد ۷۳/۹ درصد بیشتر بود (شکل ۴).

در پژوهشی، بالاترین مقدار آنتوسیانین در گیاه بادرشبی تیمار شده در مرحله ۸ برگی با غلظت‌های ۹۰ ppm و ۶۰ و ۳۰ از نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۹۰ ppm بدست آمد (Moradbeygi et al., 2020). به گزارش Nekoukhou و همکاران (۲۰۲۳) بیشترین مقدار آنتوسیانین در گیاه بادرشبی ۷۴ روزه تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰ و ۰ نانوذرات اکسید مس با غلظت ۸۰ ppm بدست آمد (Nekoukhou et al., 2023). گیاه ریحان در مرحله ۶ تا ۸ برگی با غلظت‌های (۱۰ ppm، ۵، ۱ و ۰) با نانو ذرات مس تیمار شدند که بیشترین مقدار آنتوسیانین با غلظت ۵ ppm از نانو ذرات مس بدست آمد (یوسف زایی، ۱۳۹۶).



این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

شکل ۴: محتوای آنتوسیانین موجود در برگ بادرشبی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس بر میزان تغییرات آنتوسیانین در گیاه بادرشبی

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۰/۵۵۰**	۱۵	غلظت
۰/۰۸۸	۳۲	خطا
	۴۷	کل
۶/۸۶		ضریب تغییرات (%)

\*\* تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

محتوای مالون دی آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و پرولین

برای تخمین مقدار تنش‌های اکسیداتیو، محتوای MDA و  $H_2O_2$  بافت به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید و مقدار آسیب اکسیداتیو گیاهان در معرض تنش بررسی می‌شود (Naghisarifi *et al.*, 2023). تیمار گیاهان بادرشبی با نانو ذرات مس و آهن بصورت مجزا به ویژه در غلظت‌های نانو مس با غلظت ۱۰۰ ppm و نانو ذرات آهن با غلظت ۱۰۰۰ ppm منجر به افزایش معنی دار در مقدار MDA و  $H_2O_2$  شدند. نانوذرات آهن تاثیر بیشتری بر افزایش MDA و  $H_2O_2$  نشان دادند. در تیمار نانو ذرات مس و آهن بصورت ترکیبی افزایش مقدار MDA و  $H_2O_2$  با غلظت ۱۰۰۰ Fe + ۱۰۰ Cu به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود.

تنش‌ها باعث پراکسیداسیون بسیار شدید لیپیدها به واسطه برداشتن اتم هیدروژن توسط گونه‌های فعال اکسیژن از اسیدهای چرب اشباع نشده، موجب ایجاد رادیکال‌های لیپیدی می‌شوند (Engwa *et al.*, 2022). پراکسید هیدروژن یکی از انواع اکسیژن واکنش‌گر بوده که موجب پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در غشا و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شوند (Engwa *et al.*, 2022).

یون‌های آزاد مس می‌توانند با مولکول‌های آب وارد واکنش شده، رادیکال‌های هیدروکسیل را آزاد نمایند و بدین صورت موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌شوند (Rovetta *et al.*, 2023). نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهند که مس یک کاتالیزور قدرتمند برای تشکیل رادیکال‌های آزاد است و یون‌های مس می‌توانند به تنهایی منجر به آسیب اکسیداتیو اسیدهای چرب اشباع نشده شوند (Rovetta *et al.*, 2023). در اثر تنش‌ها، مقدار  $H_2O_2$  افزایش یافته که باعث بیش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود و رادیکال هیدروکسیل‌های تولید شده از این طریق به غشای سلولی آسیب می‌رساند (Engwa *et al.*, 2022).

تیمار گیاهان با نانو ذرات مس و آهن بصورت مجزا به ویژه با نانو مس با غلظت ۱۰۰ ppm و نانو آهن با غلظت ۱۰۰۰ ppm، منجر به افزایش معنی دار در مقدار پرولین شد. در تیمار نانو ذرات مس و آهن بصورت ترکیبی و در غلظت Fe ۱۰۰۰ + ۱۰۰ Cu پرولین افزایش زیادی نشان داد.

انباشته شدن مواد محلول سازگار، باعث حفظ تعادل اسمزی می‌شود (Bhutto *et al.*, 2023). پرولین یک نوع آمینو اسید ضد تنش است. در گیاهان در معرض تنش، اسمولیت‌هایی همانند پرولین تولید می‌شوند که منجر به جاروب شدن رادیکال هیدروکسیل و ROSها می‌شوند. پرولین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده و گونه‌های فعال اکسیژن را حذف

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

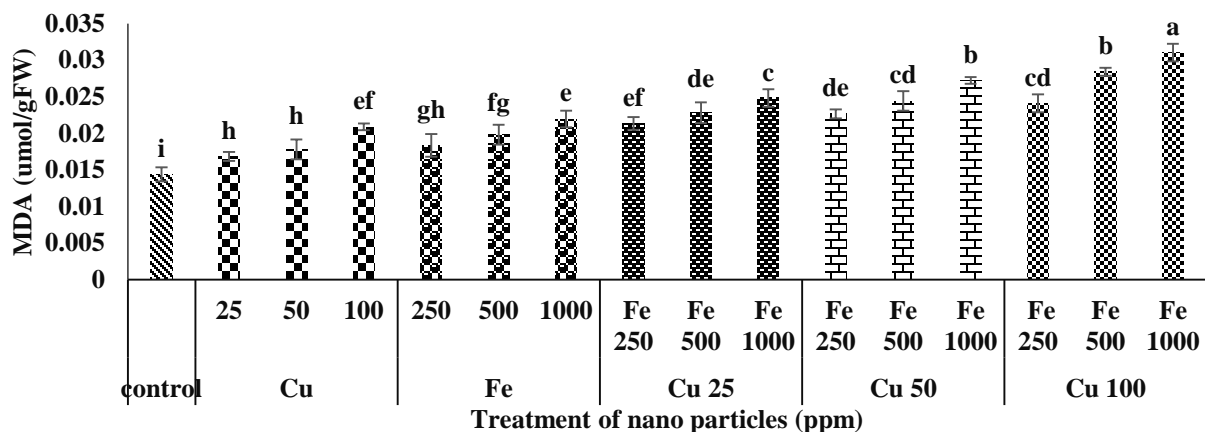
نموده و منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود (Haghpavar et al., 2022). بنابراین پرولین نقش دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات آهن و مس افزایش می‌یابد.

پرولین در گیاهان در معرض تنش باعث تنظیم رشد آن‌ها شده و اثرات منفی تنش را بازگردانده و به عنوان یک پروتئین محافظت کننده عمل می‌کند (Ghosh et al., 2022). پرولین مانع دهیدراته شدن آنزیم‌ها در برابر تنش می‌شود (Ghosh et al., 2022).

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر محتوای MDA،  $H_2O_2$  و پرولین وجود داشت ( $P \leq 0.01$ ). نتایج نشان داد در برگ‌های تیمار شده با مقادیر مختلف نانو ذرات آهن و مس، محتوای MDA،  $H_2O_2$  و پرولین در مقایسه با شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار این ترکیبات در تیمار با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا با غلظت‌های ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس و ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن بدست آمد که به ترتیب نسبت به شاهد ۴۲/۸ و ۵۰ درصد برای MDA و ۳۵/۷ و ۵۰ درصد برای  $H_2O_2$  و ۳۱/۱ و ۲۸/۷ درصد برای پرولین افزایش نشان دادند. در تیمار ترکیبی نانو ذرات آهن و مس با غلظت ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن + ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس، مقادیر این ترکیبات افزایش بیشتری نشان داد، به طوری که افزایش ۱۱۴ درصد برای MDA، ۸۰/۹ درصد برای  $H_2O_2$  و ۴۳/۵ درصد برای پرولین مشاهده شد (شکل‌های ۵ الف، ب و ج).

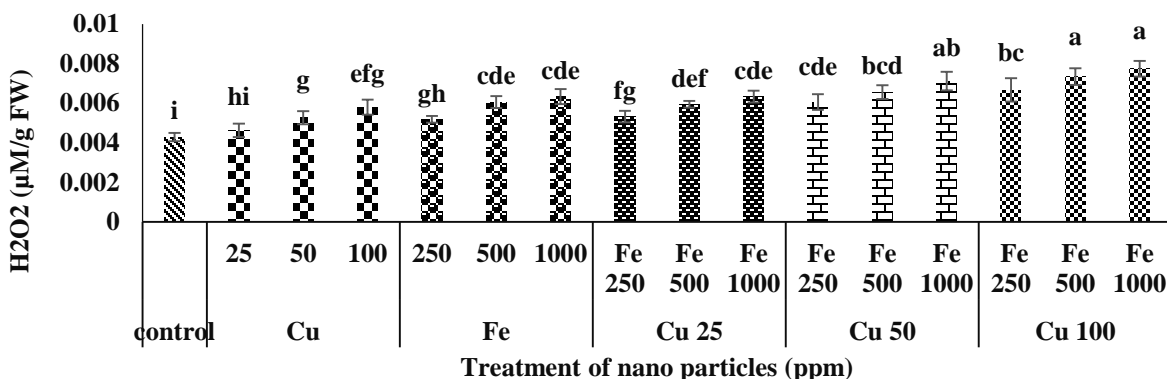
در مطابقت با یافته‌های این پژوهش اثر نانو ذرات بر افزایش محتوای MDA و  $H_2O_2$  توسط محققین دیگر هم گزارش شده است. در تیمار گیاه بادرشبی در مرحله ۸ برگی با غلظت‌های ۹۰، ۶۰، ۳۰ و ۰ از نانو ذرات اکسید آهن در غلظت ppm بالاترین مقدار MDA و  $H_2O_2$  بدست آمد (Moradbeygi et al., 2020). در پژوهش دیگر گیاه بادرشبی ۷۴ روزه تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰ و ۰ از نانو اکسید مس بالاترین مقدار MDA و  $H_2O_2$  در غلظت ppm ۸۰ بدست آمد (Nekoukhou et al., 2023).

در تیمار گیاه بادرشبی ۶۰ روزه با غلظت‌های ۷۵، ۵۰، ۲۵ و ۰ از نانو ذرات مس، بالاترین مقدار پرولین با غلظت ppm ۵۰ به دست آمد (Haddadian et al., 2018). در تیمار گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) ۴۵ روزه با غلظت‌های ۱۰۲ درصد از نانو ذرات آهن بیشترین مقدار پرولین با غلظت ۲ درصد از نانو ذرات آهن بدست آمد (Asle Mohammadi et al., 2021).

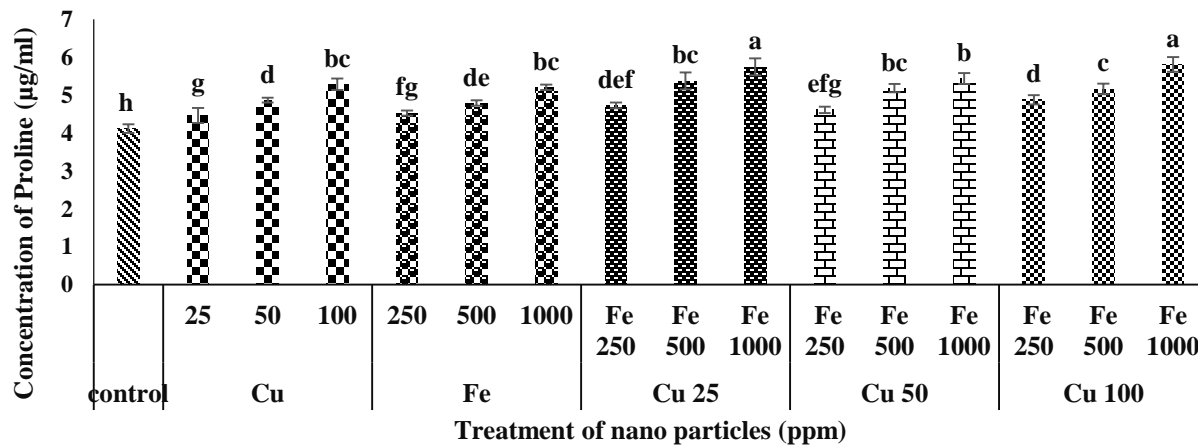


این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۵: محتوای MDA (الف)، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ب) و پرولین (ب) در گیاهچه‌های بادرشبی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس بر میزان تغییرات MDA، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و پرولین در گیاه بادرشبی

پرولین	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA	درجه آزادی	منابع تغییر
میانگین مربعات				
۰/۴۳۱**	۰/۶۵۱**	۰/۹۷۸**	۱۵	غلظت
۰/۰۱۷	۰/۰۲۸	۰/۰۳۳	۳۲	خطا

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

۶/۱۷	۷/۹۰	۸/۳۶	ضرب تغییرات (%)
------	------	------	-----------------

\*\*تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

### ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها:

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نقش مهمی را در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان به عهده دارند و شاخص مهم و حساسی به تغییرات محیطی هستند (Khodamoradi et al., 2022). در شرایط تحت تنش زیستی و غیر زیستی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) افزایش می‌یابد. مثلاً در گیاه کتان (*Linum usitatissimum*) تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی (Karimzadeh et al., 2019) و مریم گلی باغی (*Salvia officinalis*) تیمار شده با نانو ذرات نقره (Moazzami et al., 2020) میزان آنزیم PAL افزایش یافت. آنزیم PAL یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها است. این ترکیبات از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که آنزیم PAL با عمل دامیناسیون بر روی L-فنیل آلانین منجر به تولید سینامیک اسید می‌شود که نخستین مرحله در سنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدها می‌باشد (Reyes et al., 2022). ترکیبات فنلی در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول‌های گیاهی ساخته می‌شوند و در شرایط تنشی مقدار آن‌ها تغییر می‌کند (Pratyusha et al., 2022).

گزارش‌های چندی در مورد اثر نانو ذرات بر افزایش محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی وجود دارد. به عنوان مثال در گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن (محمد پرست، ۱۳۹۳)، گیاه بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن (Rui et al., 2016)، بادرشبی تیمار شده با نانو ذرات اکسید نقره (Haghighi Pak et al., 2017) که در آن‌ها میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها افزایش یافت. در پژوهش حاضر تیمار گیاهان بادرشبی با نانو ذرات مس و آهن بصورت مجزا منجر به افزایش معنی‌دار در مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد.

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، تفاوت بسیار معنی‌داری بین تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی وجود داشت ( $P \leq 0.01$ ). نتایج نشان داد که در برگ‌های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس در مقایسه با نمونه شاهد مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافت. بالاترین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی زمانی مشاهده شد که نمونه‌ها با ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس و ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن به صورت مجزا تیمار شدند که نسبت به شاهد به ترتیب ۳۵/۴ و ۴۸/۳ درصد برای ترکیبات فنلی و ۱۴/۲۸ و ۲۳/۸ درصد برای ترکیبات فلاونوئیدی افزایش نشان دادند. بالاترین محتوای ترکیبات فنلی در نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت ترکیبی با غلظت ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن + ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس بدست آمد که نسبت به شاهد ۷۴/۱ درصد بیشتر بود؛ این مقدار برای فلاونوئیدها با افزایش ۵۷/۱ درصدی همراه بود (شکل‌های ۶ الف و ب).

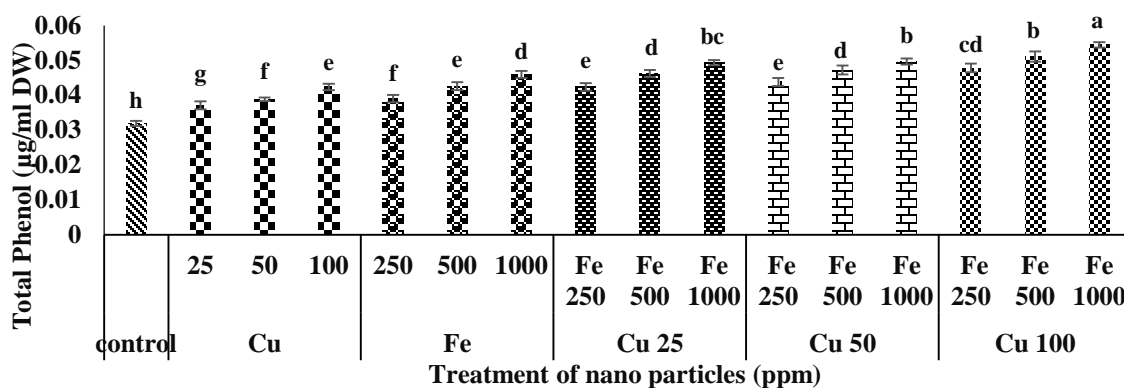
بیشترین مقدار فلاونوئیدها در گیاه بادرشبی ۷۴ روزه تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰ و ۰ از نانو ذرات اکسید مس با غلظت ۸۰ ppm بدست آمد (Nekoukhou et al., 2023). بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در گیاه بادرشبی تیمار شده در مرحله ۸ برگی با غلظت‌های (۹۰، ۶۰، ۳۰، ۰) از نانو ذرات آهن زمانی بود که از غلظت ppm

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

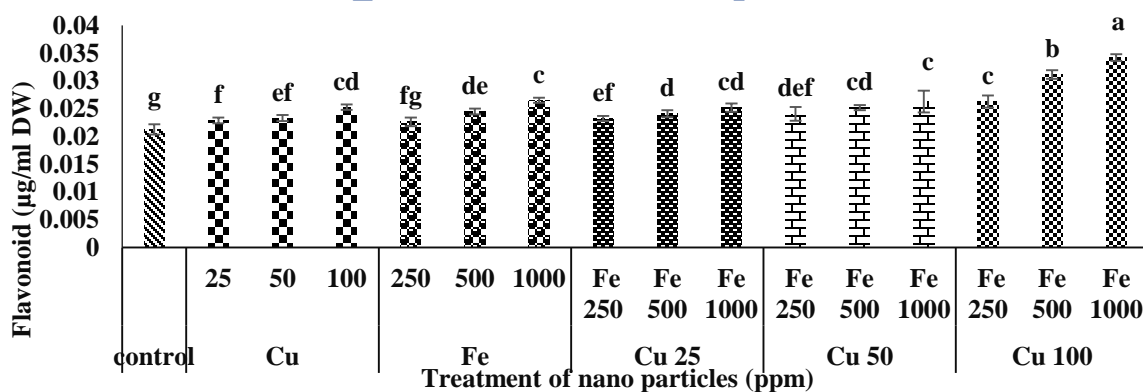


## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

۹۰ استفاده شده بود (Moradbeygi et al., 2020). بالاترین میزان فلاونوئیدها در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) ۳۰ روزه تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰۰ mg/l و ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۰۰، ۵۰، ۰ از نانو ذرات اکسید مس با غلظت ۱۰۰۰ ppm بدست آمد (Riahi et al., 2018) که مشابه با نتایج بدست آمده از پژوهش ما بود.



(الف)



(ب)

شکل ۶: محتوای ترکیبات فنلی (الف) و فلاونوئیدها (ب) در گیاهچه‌های بادرشبی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس بر میزان تغییرات فلاونوئیدها در گیاه بادرشبی

منابع تغییر	درجه آزادی	ترکیبات فنلی	فلاونوئیدها
غلظت	۱۵	۰/۹۷۸**	۰/۶۵۱**
خطا	۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۲۸

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

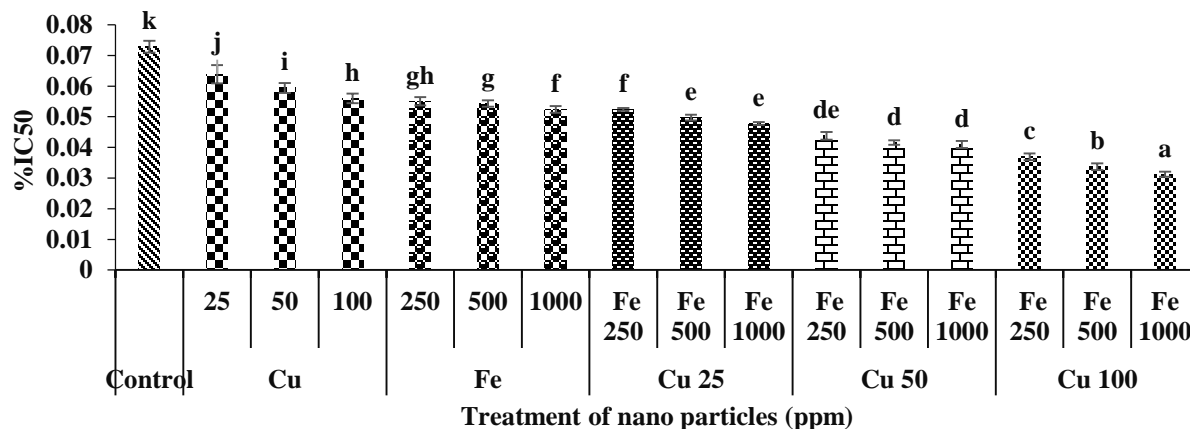
\*\*تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

## فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH):

در تنش اکسیداتیو به علت نبود تعادل بین رادیکال‌های آزاد تولید شده و واکنش‌های متابولیسمی باعث آسیب جدی به پروتئین‌ها، لیپیدها و نوکلئیک اسیدها می‌شود که این آسیب‌ها به علت کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و یا بیش تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد (Haji Rostamloo *et al.*, 2019). نانوذرات می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن را تولید نمایند که منجر به تنش اکسیداتیو در سلول‌ها شوند (Sanati *et al.*, 2022). در گیاهان یک شبکه پیچیده از متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که مانع آسیب اکسیداتیو سلول‌ها می‌شوند (Fan *et al.*, 2022).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس از نظر تأثیر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بادرشبی تفاوت بسیار معنی‌داری وجود داشت ( $P \leq 0.01$ ). در برگ‌های تیمار شده با مقادیر مختلف نانوذرات آهن و مس  $IC_{50}$  در مقایسه با شاهد کاهش یافت و کمترین میزان  $IC_{50}$  در تیمار مجزای نانو ذرات در غلظت‌های ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس و ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۲۳/۶ و ۲۷/۷ درصد کاهش یافته بودند و کمترین مقدار  $IC_{50}$  در تیمار ترکیبی نانو ذرات آهن و مس با غلظت ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن + ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس بدست آمد که نسبت به شاهد ۵۶/۴ درصد کاهش یافته بود (شکل ۷).

در پژوهشی گیاه بادرشبی در مرحله ۸ برگی با غلظت‌های ۹۰، ۶۰، ۳۰ و ۱۰ از نانو ذرات آهن تیمار شدند و کمترین مقدار  $IC_{50}$  با غلظت ۳۰ ppm بدست آمد (Moradbeygi *et al.*, 2020). تیمار گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) ۲۸ روزه با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵ و ۰ از نانو ذرات اکسید مس نشان داد که کمترین مقدار  $IC_{50}$  با غلظت ۱۰۰ ppm بدست آمد (Nazir *et al.*, 2021).



شکل ۷: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهچه‌های بادرشبی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی رزمارینیک اسید:

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

رزمارینیک اسید یکی از مهمترین و با ارزش ترین متابولیت های ثانویه گیاهان خانواده نعناع است که ارزش دارویی بسیار زیادی دارد (Kianersi *et al.*, 2022). رزمارینیک اسید از مسیر فنیل پروپانوئید در گیاهان سنتز می شود (Ru *et al.*, 2022).

تیروزین و فنیل آلانین دو سوبسترای مهم این مسیر بیوسنتزی را تشکیل می دهند. تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) دو آنزیم مهم در مسیر بیوسنتزی رزمارینیک اسید هستند. در انواع تنش ها مانند محرک ها، باکتری ها، اشعه UV، عناصر سنگین و غیره آنزیم PAL فعال شده و باعث بیش تولید ترکیبات فنلی می شود (Zhang *et al.*, 2022).

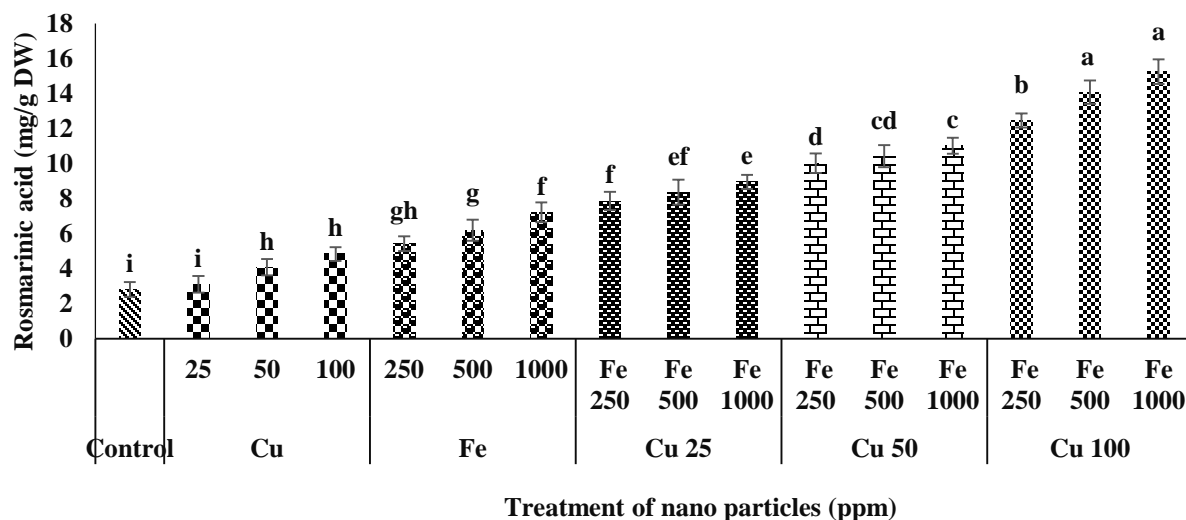
زمانی که سلول های یک گیاه تحت تنش های زیستی و غیرزیستی مانند تیمار با محرک ها قرار می گیرند، ژن های دخیل در بیوسنتز متابولیت های ثانویه مانند WRKY (ژن دخیل در بیوسنتز آلکالوئیدها)، MYB (ژن دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین ها) و ERF (ژن دخیل در بیوسنتز اتیلن) بیان شده و منجر به فعال شدن آنزیم های کلیدی دخیل در بیوسنتز متابولیت های ثانویه می شوند (Hao *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2019). استفاده از نانو ذرات نیز می توانند به طور چشمگیری منجر به افزایش متابولیت های ثانویه ارزشمند شود (Kruszka *et al.*, 2022).

زمانی که گیاهان تحت تاثیر غلظت های بالای نانو ذرات دچار تنش شده، درصد اسانس در آنها افزایش می یابد زیرا در شرایط تنش میزان تولید متابولیت های ثانویه افزایش یافته و این ترکیبات نقش آنتی اکسیدانت داشته و از عمل اکسیداسیون در سلول ها جلوگیری می نماید (Roy *et al.*, 2022)، البته این پاسخ ها بسته به مقدار و نوع نانو ذرات می توانند نتایج متفاوتی داشته باشند (Nicolae - Maranciu *et al.*, 2022).

بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت بسیار معنی داری بین غلظت های مختلف نانو ذرات آهن و مس مورد استفاده بر محتوای رزمارینیک اسید وجود داشت ( $P \leq 0.01$ ). علاوه بر این نتایج نشان داد در برگ های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس، مقدار رزمارینیک اسید افزایش یافت و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در تیمار نمونه ها با نانو ذرات آهن و مس در غلظت های 100 ppm نانو ذرات مس و 1000 ppm نانو ذرات آهن بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب 77/5 و 120 درصد بیشتر بودند و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در نمونه های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت ترکیبی با غلظت 1000 ppm نانو ذرات آهن + 100 ppm نانو ذرات مس بدست آمد که نسبت به شاهد 465 درصد بیشتر بود (شکل 8).

تاثیر نانو ذرات در افزایش مقدار رزمارینیک اسید توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در گیاه ریحان 45 روزه تیمار شده با غلظت های 0/2 ppm و 0/1 از نانو ذرات آهن بیشترین مقدار رزمارینیک اسید با غلظت 0/2 ppm بدست آمد (Tavallalia *et al.*, 2020). در گیاه بادرنجبویه 30 روزه تیمار شده با غلظت های 2000، 1000، 500، 200، 50، 0 از نانو ذرات اکسید مس بالاترین سطح رزمارینیک اسید با غلظت 50 mg/l بدست آمد (Riahi *et al.*, 2018). در گیاه بادرشبی تیمار شده در مرحله 8 برگی با غلظت های 90، 60، 30، 0 از نانو ذرات آهن بالاترین مقدار رزمارینیک اسید زمانی بدست آمد که نمونه ها با غلظت 90 ppm تیمار شدند (Moradbeygi *et al.*, 2020).

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.



شکل ۸: محتوای رزمارینیک اسید موجود در گیاهچه‌های با درشتی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی جدول ۵- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس بر میزان تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رزمارینیک اسید در گیاه با درشتی

منابع تغییر	درجه آزادی	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	رزمارینیک اسید
غلظت	۱۵	۰/۳۲۰**	۱/۱۵۷**
خطا	۳۲	۰/۰۳	۰/۰۲۱
کل	۴۷		
ضریب تغییرات (%)		۶/۱۷	۱۰/۳۶

\*\*تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

#### همبستگی ساده بین صفات مختلف در گیاه دارویی با درشتی

نتایج همبستگی بین رزمارینیک اسید گیاه دارویی با درشتی با سایر صفات نشان داد که رزمارینیک اسید در سطح احتمال ۱ درصد با ترکیبات فنلی کل، محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن بیشترین همبستگی معنی دار و مثبت را دارد (جدول ۱). نتایج همبستگی بین صفات نشان داد که محتوای ترکیبات فنلی در سطح احتمال ۱ درصد با محتوای پراکسید هیدروژن، محتوای مالون دی‌آلدئید و میزان کلروفیل b همبستگی معنی دار و مثبت داشت. نتایج همبستگی بین صفات نشان داد بیشترین همبستگی مثبت مربوط فلاونوئیدها با پرولین بود ( $r=0/983^{**}$ ). نتایج همبستگی بین صفات مختلف نشان داد که محتوای  $IC_{50}$  همبستگی منفی بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، پرولین و رزمارینیک اسید دارد که بیشترین همبستگی منفی معنی دار را با رزمارینیک اسید ( $r=-0/958^{**}$ ) نشان داد.

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

## مجله فرایند و کارکرد گیاهی

جدول ۶: همبستگی ساده بین خصوصیات مورد مطالعه در گیاه دارویی بادرشبی تحت اثر مجزا و توأم غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس در شرایط گلخانه

صفات	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱											
۲	۰/۷۱۸**										
۳	۰/۷۱۶**	۰/۶۹۰**									
۴	۰/۷۱۱**	۰/۹۰۵**	۰/۷۱۳**								
۵	۰/۶۸۵**	۰/۹۱۸**	۰/۶۹۰**	۰/۹۲۵**							
۶	۰/۷۰۵**	۰/۹۱۷**	۰/۶۸۱**	۰/۸۹۶**	۰/۹۰۱**						
۷	۰/۷۷۳**	۰/۷۵۸**	۰/۸۵۲**	۰/۷۶۷**	۰/۷۸۱**	۰/۸۳۲**					
۸	۰/۷۲۸**	۰/۹۲۳**	۰/۷۶۴**	۰/۹۲۹**	۰/۹۴۹**	۰/۹۲۶**	۰/۸۳۸**				
۹	۰/۶۹۰**	۰/۶۵۰**	۰/۵۸۰**	۰/۷۰۲**	۰/۷۳۵**	۰/۶۹۲**	۰/۹۸۳**	۰/۷۶۱**			
۱۰	-۰/۵۹۸**	-۰/۸۹۶**	-۰/۶۳۸**	-۰/۹۰۱**	-۰/۹۲۵**	-۰/۹۰۰**	-۰/۶۳۶**	-۰/۹۲۶**	-۰/۶۷۲**		
۱۱	۰/۶۱۳**	۰/۸۷۱**	۰/۵۵۶**	۰/۸۷۵**	۰/۹۱۹**	۰/۸۹۶**	۰/۶۰۲**	۰/۹۰۰**	۰/۷۲۷**	-۰/۹۵۸**	

\*\* نشان دهنده اختلاف بسیار معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد می باشد.

(۱) کلروفیل a، (۲) کلروفیل b، (۳) کاروتنوئید، (۴) آنتوسیانین، (۵) مالون دی آلدید، (۶) پراکسید هیدروژن، (۷) پرولین، (۸) ترکیبات فنلی، (۹) فلاونوئیدها (۱۰) IC50، (۱۱) رزمارینیک اسید

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.

### نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف نانوذرات آهن و مس با روش اسپری برگی، به صورت مجزا یا ترکیبی تاثیر متفاوتی بر میزان مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، MDA، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، پرولین، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، DPPH و رزمارینیک اسید داشت. در تمامی تیمارهای به کار رفته شده مقدار ترکیبات مورد سنجش نسبت به شاهد افزایش یافته است. غلظت‌های مجزای ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس و ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن نسبت به شاهد، بیشترین میزان ترکیبات مورد سنجش را افزایش دادند. بیشترین مقدار صفات مذکور در نمونه‌های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت ترکیبی (غلظت ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن + ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس) بدست آمد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از غلظت‌های مناسب و غیرسمی از نانو ذرات می‌تواند منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه با ارزش و مورد نظر در گیاه بادرشبی شود. بغیر از صفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بین سایر صفات اندازه‌گیری شده و مقدار رزمارینیک اسید در بادرشبی همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت.

### مشارکت نویسندگان

مشارکت نویسنده اول مقاله شامل اجرای تحقیق، انجام آنالیزهای آماری و نگارش محتوای مقاله؛ نویسنده دوم، پایه‌ریزی تحقیق، راهنمایی در اجرای تحقیق و نگارش محتوای مقاله؛ نویسنده سوم، راهنمایی در اجرای تحقیق و نگارش محتوای مقاله؛ نویسنده چهارم، مشاوره در اجرای تحقیق، انجام آنالیزهای آماری و نگارش محتوای مقاله بود.

### تضاد منافع

در این مقاله تضاد منافع وجود ندارد.

### تقدیر و تشکر

از دانشگاه الزهرا تهران به خاطر مساعدت در اجرای این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

### منابع:

- محمد پرست، بهروز، رسولی، موسی. بررسی تأثیر برخی نانو کودها روی خصوصیات کمی و کیفی گیاه شیرین بیان. ۱۳۹۳.
- یوسف زایی، فروغ. بررسی تأثیر نانوذرات مس و محلول کلرید مس بر جوانه‌زنی و برخی فاکتورهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.). ۱۳۹۶. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران).
- DOR: 20.1001.1.23832592.1396.30.1.19.8
- Asle Mohammadi, Z., Mohammadkhani, N., & Servati, M. (2021). Effect of iron and zinc foliar application on some biochemical traits of Thymus (*Thymus vulgaris* L.) plant under nitrogen deficiency. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(3), 658-668. DOI: 20.1001.1.23832592.1400.34.3.7.8
- Atanasova, A., Petrova, A., Teneva, D., Ognyanov, M., Georgiev, Y., Nenov, N., & Denev, P. (2023). Subcritical water extraction of rosmarinic acid from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and its effect on plant cell wall constituents. *Antioxidants*, 12(4), 888. <https://doi.org/10.3390/antiox12040888>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bensaddek, L., M. L. Villarreal and M.-A. Fliniaux (2008). "Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds." *Electronic Journal of Integrative Biosciences* 3(1, Special Issue on Hairy Roots (A. Lorence and F. Medina-Bolivar, co-editors)): 2-9

این مقاله نهایی نیست و پس از انتشار تغییراتی خواهد داشت.



- Bhutto, L. A., Osborne, C. P., & Quick, W. P.** (2023). Osmotic adjustment and metabolic changes under drought stress conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Pak. J. Bot*, 55(3), 915-923. DOI: [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-3\(22\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-3(22))
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Collini, E.** (2019). Carotenoids in photosynthesis: the revenge of the “accessory” pigments. *Chem*, 5(3), 494-495.
- Engwa, G. A., Nweke, F. N., & Nkeh-Chungag, B. N.** (2022). Free radicals, oxidative stress-related diseases and antioxidant supplementation. *Alternative Therapies in Health & Medicine*, 28(1).
- Fan, N., Zhao, C., Yue, L., Ji, H., Wang, X., Xiao, Z., & Wang, Z.** (2022). Nanosilicon alters oxidative stress and defence reactions in plants: a meta-analysis, mechanism and perspective. *Environmental Science: Nano*, 9(10), 3742-3755. DOI: [10.1039/D2EN00478J](https://doi.org/10.1039/D2EN00478J)
- Ghosh, P., & Pal, H.** (2023). Biotechnological Attributes of Bio-stimulants for Relieving Abiotic Stress. In *Climate-Resilient Agriculture, Vol 2: Agro-Biotechnological Advancement for Crop Production* (pp. 677-688). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-37428-9\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-031-37428-9_29)
- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., Cao, X., & Khan, M. A. R.** (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*, 24(2), 227-239.
- Green, J. M. and G. B. Beestman** (2007). "Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology." *Crop Protection* 26(3): 320-327. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.04.018>
- Haddadian, K., Iranbakhsh, A., Khavari-Nejad, R. A., & Ghoranneviss, M.** (2018). Copper nanoparticles together with cold atmospheric plasma improves the growth and physiological indices of *Dracocephalum moldavica* in hydroponic system. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(3).
- Haghighi Pak, Z., N. Karimi and H. Abbaspour** (2017). "Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Growth, Physiological and biochemical Parameters of *Dracocephalum moldavica* L." *Iranian Journal of Plant Physiology* 7(4): 2173-2183. DOI: [10.30495/IJPP.2017.537982](https://doi.org/10.30495/IJPP.2017.537982)
- Hao, X., Pu, Z., Cao, G., You, D., Zhou, Y., Deng, C. & Kai, G.** (2020). Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by SmMYB98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Advanced Research*, 23, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.01.012>
- Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., & Kuboi, T.** (2003). Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Science*, 164(2), 259-265. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00408-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00408-9)
- Heath, R. L., & Packer, L.** (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Heimler, D. Isolani, L. Vignolini, P. Romani, A.** (2009). Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry*. 114(3): p. 765-770 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.010>.
- Haji Rostamloo, B., Zhiyani, R., & Omrani, S.** (2019). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Salvia officinalis* Extract and Evaluation of their Antioxidant and Antimicrobial Activity Against Bacteria of Food Corruption. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 11(2), 107-118.
- Khodamoradi, S., Sagharyan, M., Samari, E., & Sharifi, M.** (2022). Changes in phenolic compounds production as a defensive mechanism against hydrogen sulfide pollution in *Scrophularia striata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 177, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.013>
- Kianersi, F., Amin Azarm, D., Pour-Aboughadareh, A., & Poczai, P.** (2022). Change in secondary metabolites and expression pattern of key rosmarinic acid related genes in iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ecotypes using methyl jasmonate treatments. *Molecules*, 27(5), 1715. <https://doi.org/10.3390/molecules27051715>
- Kruszka, D., Selvakesavan, R. K., Kachlicki, P., & Franklin, G.** (2022). Untargeted metabolomics analysis reveals the elicitation of important secondary metabolites upon treatment with various metal and metal

- oxide nanoparticles in *Hypericum perforatum* L. cell suspension cultures. *Industrial Crops and Products*, 178, 114561. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114561>
- Lichtenthaler, H. K.** (1987). Chlorophyll and carotenoids—pigments of photosynthetic biomembrances za Colowick SP, Kaplan NO Methods in Enzymology. Vol. 148.
- Moazzami Farida, S. H., Karamian, R., & Albrechtsen, B. R.** (2020). Silver nanoparticle pollutants activate oxidative stress responses and rosmarinic acid accumulation in sage. *Physiologia plantarum*, 170(3), 415-432. <https://doi.org/10.1111/ppl.13172>
- Moradbeygi, H., R. Jamei, R. Heidari and R. Darvishzadeh** (2020). "Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron oxide nanoparticles in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress." *Scientia Horticulturae* 272: 109537. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109537>
- Naghisharifi, H., Kolahi, M., Javaheriyani, M., & Zargar, B.** (2023). Oxidative stress is the active pathway in canola seed aging, the role of oxidative stress in the development of seedlings grown from aged canola seed. *Plant Stress*, 100313. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100313>
- Nazir, S., Jan, H., Zaman, G., Khan, T., Ashraf, H., Meer, B. & Abbasi, B. H.** (2021). Copper oxide (CuO) and manganese oxide (MnO) nanoparticles induced biomass accumulation, antioxidants biosynthesis and abiotic elicitation of bioactive compounds in callus cultures of *Ocimum basilicum* (Thai basil). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 49(1), 625-633. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1984935>
- Nekoukhou, M., Fallah, S., Pokhrel, L. R., Abbasi-Surki, A., & Rostamnejadi, A.** (2023). Foliar enrichment of copper oxide nanoparticles promotes biomass, photosynthetic pigments, and commercially valuable secondary metabolites and essential oils in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) under semi-arid conditions. *Science of the Total Environment*, 863, 160920. [doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160920](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160920)
- Nicolae-Maranciuc, A., Chicea, D., & Chicea, L. M.** (2022). Ag nanoparticles for biomedical applications—Synthesis and characterization—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5778. <https://doi.org/10.3390/ijms23105778>
- Reyes Jara, A. M., Gómez Lobato, M. E., Civello, P. M., & Martínez, G. A.** (2022). Phenylalanine ammonia lyase is more relevant than Chalcone synthase and Chalcone isomerase in the biosynthesis of flavonoids during postharvest senescence of broccoli. *Journal of Food Biochemistry*, 46(2), e14054. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14054>
- Riahi Modwar, Nasiri Bezenjani, Moinuddin, Rezaei, Baghizadeh, & Amin.** (2018). Rosmarinic acid accumulation and tyrosine aminotransferase gene expression in lemon balm (*Melissa officinalis*) seedlings treated with copper oxide particles. *Journal of Cell and Molecular Research (Scientific)*, 31(1), 36-45
- Rovetta, A., Carosella, L., Arrigoni, F., Vertemara, J., De Gioia, L., Zampella, G., & Bertini, L.** (2023). Oxidation of Phospholipids by OH Radical Coordinated to Copper Amyloid-β Peptide—A Density Functional Theory Modeling. *Inorganics*, 11(6), 227. <https://doi.org/10.3390/inorganics11060227>
- Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., & Islam, M. R.** (2022). Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2022/5445291>
- Ru, M., Li, Y., Guo, M., Chen, L., Tan, Y., Peng, L., & Liang, Z.** (2022). Increase in rosmarinic acid accumulation and transcriptional responses of synthetic genes in hairy root cultures of *Prunella vulgaris* induced by methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1-2), 371-379. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02273-w>
- Rui, M., C. Ma, Y. Hao, J. Guo, Y. Rui, X. Tang, Q. Zhao, X. Fan, Z. Zhang and T. Hou** (2016). "Iron oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*)". *Frontiers in plant science* 7: 815. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00815>
- Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M.** (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), 277. <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>
- Sanati, M., Afshari, A. R., Kesharwani, P., Sukhorukov, V. N., & Sahebkar, A.** (2022). Recent trends in the application of nanoparticles in cancer therapy: The involvement of oxidative stress. *Journal of Controlled Release*, 348, 287-304. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.035>
- Selmani, A., Kovačević, D., & Bohinc, K.** (2022). Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. *Advances in Colloid and Interface Science*, 303, 102640. [doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640](https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640)

- Sharifi Rad, M., Sharifi Rad, J., Heshmati, G. A., Miri, A., & Sen, D. J.** (2013). Biological Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by *Nitraria schoberi*. *Fruits. Am J Adv Drug Deliv*, 1(2), 174-179.
- Simea, Ş., Ielciu, I., Hanganu, D., Niculae, M., Pall, E., Burtescu, R. F., & Duda, M.** (2023). Evaluation of the Cytotoxic, Antioxidative and Antimicrobial Effects of *Dracocephalum moldavica* L. Cultivars. *Molecules*, 28(4), 1604. <https://doi.org/10.3390/molecules28041604>
- Sun, M., Shi, M., Wang, Y., Huang, Q., Yuan, T., Wang, Q. & Kai, G.** (2019). The biosynthesis of phenolic acids is positively regulated by the JA-responsive transcription factor ERF115 in *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Experimental Botany*, 70(1), 243-254. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery349>
- Tavallalia, V. R., H. G. and S. H.** (2020). "Iron-urea nano-complex improves bioactive compounds in essential oils of *Ocimum basilicum* L." *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109222>
- Twaij, B. M., & Hasan, M. N.** (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4-14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>
- Vafadar, F., & Ehsanzadeh, P.** (2023). Synergistic effects of calcium and melatonin on physiological and phytochemical attributes of *Dracocephalum kotschyi* genotypes under salinity stress. *Physiologia Plantarum*, e13912. <https://doi.org/10.1111/ppl.13912>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A.** (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151, 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Wang, R. X., Wang, Z. H., Sun, Y. D., Wang, L. L., Li, M., Liu, Y. T., ... & Yu, Y. H.** (2023). Molecular mechanism of plant response to copper stress: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 105590. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105590>
- Wang, Y., Kang, Y., Zhong, M., Zhang, L., Chai, X., Jiang, X., & Yang, X.** (2022). Effects of iron deficiency stress on plant growth and quality in flowering chinese cabbage and its adaptive response. *Agronomy*, 12(4), 875. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040875>
- Xu, Z., & Rothstein, S. J.** (2018). ROS-Induced anthocyanin production provides feedback protection by scavenging ROS and maintaining photosynthetic capacity in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 13(3), 1364-77. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1451708>
- Yousefzadeh, S. and N. Sabaghnia** (2016). "Nano-iron fertilizer effects on some plant traits of dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) Under different sowing densities." *Acta Agriculturae Slovenica* 107(2): 429-437
- Zhang, Y. W., Nie, F., Zheng, X. Y., & Zhao, S. J.** (2022). L-tyrosine metabolic pathway in microorganisms and its application in the biosynthesis of plant-derived natural products. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, 8(3), 386-394. DOI: 10.4103/wjtc.wjtc\_16\_22

## Effects of iron and copper nanoparticles on stress factors and rosmarinic acid synthesis in moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.)

### Abstract

Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) is an annual herbaceous and aromatic plant from the Lamiaceae family. The present study aimed to investigate the individual and combined effects of different concentrations of iron nanoparticles (0, 250, 500 and 1000 ppm) and copper (0, 25, 50 and 100 ppm) on 3-month-old *D. moldavica* plants and choosing the best treatment to increase the amount of rosmarinic acid and antioxidant activity. The experiment was conducted based on a completely randomized design with 16 treatments and three replications in greenhouse conditions using the leaf spray method. TEM images were used for confirmation of nanoparticle penetration into the leaf tissue of *D. moldavica* plant. Rosmarinic acid content was measured using an HPLC device. The results showed that the effect of the treatments on the amount of photosynthetic pigments, anthocyanins, phenolic compounds, flavonoids, malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), proline, and antioxidants in *D. moldavica* was highly significant (P<0.01) and the best results were obtained by the combined effect of the Fe (1000 ppm) + Cu (100 ppm) treatment. In the best treatment, the amounts of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid were 90.9, 125 and 91.6%, respectively; anthocyanin was 73.9%; phenolic compounds and flavonoids were 74.1 and 57.1%; MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and proline 114, 80.9 and 43.5% and rosmarinic acid increased by 465% compared to the control. Also, in the mentioned combined treatment, the amount of antioxidant activity decreased by 56.9% compared to the control. There was a positive and significant correlation (P<0.01) between the amount of rosmarinic acid production and other traits, except antioxidant activity (r = -0.958\*\*).

**Key words:** *Dracocephalum moldavica* L., Reactive Oxygen Species, Elicitor, Secondary metabolites, Transmission Electron Microscope