

مقاله پژوهشی

تأثیر نانوذرات سیلیکون بر شاخص‌های مورفو- فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش شوری در کشت هیدروپونیک

زینب ویسی، منصور قربانپور* و مرتضی اکرمیان

گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰)

چکیده

نانوذرات با توجه به گونه گیاهی، روش‌های مورد استفاده، شرایط کشت، غلظت و غیره می‌توانند اثرات متفاوتی بر القا فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاهان داشته باشند. در این مطالعه اثرات سطوح مختلف نانوذرات سیلیکون (صفر، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تنش شوری (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در شرایط کشت هیدروپونیک روی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی همیشه‌بهار انجام شد. تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی، جذب و انتقال نانوذرات سیلیکون توسط ریشه و برگ گیاهان در تیمارهای آزمایشی را تأیید کرد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات متقابل کاربرد نانوذرات سیلیکون و تنش شوری بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی، تعداد کاپیتول، قطر بزرگترین گل، عملکرد گل، کلروفیل کل و کارتنوئید و محتوی نسبی آب برگ شد. در مقابل کاربرد نانوذرات سیلیکون منجر به کاهش اثرات منفی تنش شوری (پراکسیداسیون لیپید)، بهبود پارامترهای رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، عملکرد کمی (تولید گل) و کیفی (میزان کوئرستین) گیاه در مقایسه با شاهد شد و از این نظر بین سطوح نانوذرات سیلیکون اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. نتایج حاصل از آنالیز عصاره‌ها با دستگاه HPLC نشان داد که بیشترین میزان کوئرستین (۳۰۹/۷۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار بود. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گل گیاه در تیمارهای مختلف آزمایشی تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH نشان داد و روند تغییرات مشابهی با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی داشت. بنابراین، استفاده از غلظت مناسب نانوذرات سیلیکون در کاهش اثرات منفی تنش شوری و افزایش محتوی متابولیت‌های مهم دارویی گیاه همیشه‌بهار مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: همیشه‌بهار، نانو سیلیکون، تنش شوری، کوئرستین، عملکرد گل

مقدمه

گزینش گیاهان در شرایط نامناسب محیطی به‌ویژه شوری را ضروری ساخته است. سالانه هزینه‌ای بیش از ۲۷ بلیون دلار برای جبران خسارت‌های ناشی از تنش شوری در کشاورزی

افزایش جمعیت جهان، روند کاهش منابع آب شیرین و شور شدن زمین‌های کشاورزی، بررسی و ارزیابی در زمینه واکنش و

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: m-ghorbanpour@araku.ac.ir

آلمانی دریافتند که با افزایش شوری، ارتفاع بوته، تعداد گل، تعداد شاخه فرعی، قطر کاپیتول، وزن تر و خشک گل کاهش یافت. همچنین، اعمال تنش شوری باعث کاهش ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد شاخه فرعی، وزن تر و خشک گیاه دارویی بادرنبویه شد (Ozturk et al., 2004). نتایج مشابهی روی گیاه شیرین بیان در تیمار با سطوح مختلف شوری گزارش شده است (Cui et al., 2021).

ورود نانو فناوری به عرصه های مختلف علمی و صنعتی، دستاوردهای نوینی را ایجاد کرده است. این فناوری با کوچک کردن اندازه مواد موجب بروز ویژگی هایی از آنها می شود که قبلاً وجود نداشت یا محسوس نبود. نانوذرات با سلول های گیاهان برهمکنش داشته و بسته به خواص نانوذرات، تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی زیادی ایجاد می کنند (Hatami et al., 2016). اثر بخشی نانوذرات از روی ترکیب بندی شیمیایی، اندازه، پوشش سطح، واکنش پذیری و از همه مهم تر، میزان مصرف و غلظت آنان تعیین می شود (Khodakovskaya et al., 2012). در بین انواع مختلف نانوذرات، نانوسیلیکون اکسید فلزی مهمی است که خاصیت واکنش پذیری سطح به حجم بالایی دارد. آنها در سطح برگ از طریق روزنه و یا کرک ها وارد گیاه شده و سپس از طریق جریان شیره سلولی به اندام های مختلف انتقال می یابند (Nair et al., 2010). سیلیکون در گیاهان عالی معمولاً با نفوذ در ساقه و برگ باعث استحکام فیزیکی اندام ها می شود، همچنین، باعث بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی، تبادلات گازی و تقویت سیستم آنتی اکسیدانی می گردد که نتیجه آن افزایش کارایی گیاه در مواجهه با انواع تنش های محیطی است (Etesami and Jeong, 2018). مطالعات نشان داده است که نانوذرات سیلیکون با افزایش فعالیت فتوسنتزی، بهبود وضعیت آب، کاهش جذب سدیم، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید در گیاهان در معرض تنش نسبت به سیلیکون مؤثرتر عمل کردند (Ghorbanpour et al., 2020; Tripathi et al., 2017). گزارشات اخیر محققین حاکی از این است که نانوذرات می توانند باعث جذب و انتقال بیشتر آب و

مصرف می شود (Ozturk et al., 2004). از آنجا که حل مسئله شوری و غلبه کردن بر آن مستلزم صرف تلاشی دراز مدت و هزینه هنگفت است، بنابراین آنچه که امروزه از اهمیت ویژه ای برخوردار است، برنامه ریزی مناسب برای حل مشکل شوری و تلاش برای یافتن و پرورش گیاهانی است که بتوانند در شرایط شوری محیط نیز عملکرد قابل قبولی داشته باشند.

شوری خاک یکی از مشکلات اساسی در بسیاری از مناطق خشک و نیمه خشک جهان از جمله ایران است. در این مناطق اغلب میزان بارندگی به اندازه ای نیست که بتواند نمک های خاک را شسته و از دسترس ریشه گیاه خارج کند و همچنین میزان تبخیر بالا از سطح خاک منجر به تجمع نمک در سطح خاک و شورتر شدن خاک سطح الارض می شود (Aghai et al., 2014).

غلظت بالای نمک در خاک باعث کاهش نفوذ پذیری خاک و پتانسیل آب خاک و در نتیجه ایجاد خشکی فیزیولوژیکی و اثر بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه می شود. شوری پتانسیل آبی سوبسترا را کاهش می دهد و منجر به محدودیت جذب آب و مواد غذایی توسط گیاه می شود. همچنین، از طریق تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و افزایش نشت یونی در نهایت باعث کم شدن کارایی فتوسنتز، کاهش بیوماس و تغییر در میزان اسمولیت ها و متابولیت های ثانویه گیاه می شود (Parida et al., 2007). کمیت و کیفیت محصول گیاهان دارویی نه تنها متأثر از فاکتورهای ژنتیکی گیاه است بلکه تحت تأثیر عوامل محیطی و شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک نیز قرار دارد (Duan et al., 2004).

همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، گیاهی دارویی از تیره کاسنی که حاوی اسانس، فلاونوئید، ساپونین، رزین، اسیدهای آلی شامل اسید سالیسیلیک، ماده ای به نام کاندولین، صمغ، مواد لعابی، آلبومین و یک ماده رنگی در گلبرگ های خشک و اینولین در ریشه است (امید بیگی، ۱۳۷۶). با توجه به ارزش دارویی قوی این گیاه و کشت وسیع آن در سراسر دنیا، اما درباره تأثیر تنش شوری بر پارامترهای رشد و متابولیت های ثانویه آن اطلاعات جامعی در دسترس نیست. لیکن، Razmjoo و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی اثر شوری روی گیاه بابونه

مواد معدنی در گیاه شوند، همچنین، به عنوان ترکیبات پیام‌رسان برای واکنش‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی عمل کنند اما اساس مکانیسم آنها هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (Rastogi et al., 2019).

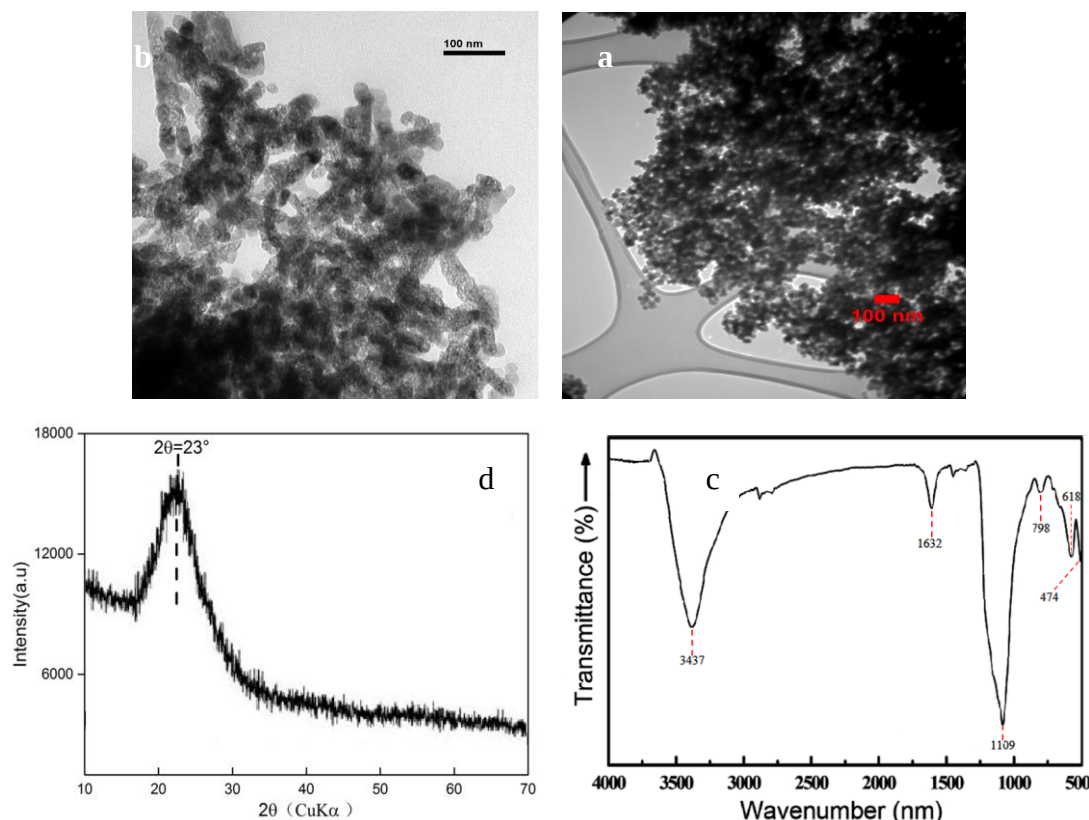
با توجه به اینکه اثرات مفید نانوذرات سیلیکون بر روی صفات مورفو- فیزیولوژیک و بیوشیمایی گیاه دارویی همیشه‌بهار کمتر گزارش شده است، همچنین، با توجه به روند روبه رشد شورش خاک‌های زراعی در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور و لزوم پژوهش در زمینه یافتن راهکارهای تحمل و مقاومت به شوری در گیاهان این پژوهش نیز به‌منظور بررسی و ارزیابی اثر نانوذرات سیلیکون در شرایط شوری و برهمکنش آنها بر عملکرد و کیفیت محصول گیاه دارویی همیشه‌بهار انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایش و شرایط رشد: این آزمایش در گلخانه پژوهشی گروه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و در شرایط کشت هیدروپونیک اجرا شد. در این تحقیق، تأثیر محلول‌پاشی با نانوذرات سیلیکون در چهار غلظت شامل صفر، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در سه سطح شوری شامل صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم روی گیاه همیشه‌بهار مورد بررسی قرار گرفت. بذر گیاه (با خلوص ۹۴٪، قوه نامیه ۹۰٪ و وزن هزار دانه ۱۲/۸ گرم) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ابتدا بذرها با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس با آب مقطر به‌طور کامل چندین بار شستشو و در گلدان کشت شدند. در هر واحد آزمایشی ابتدا ۱۰ بذر کشت گردید. در طول دوران رشد مراقبت‌های لازم از قبیل آبیاری، حذف علف‌های هرز و سایر عملیات داشت به‌صورت مرتب انجام شد، پس از جوانه‌زنی و سبز شدن بوته‌ها، به‌تدریج به‌منظور جلوگیری از ایجاد رقابت بین بوته‌ای، اقدام به تنک کردن بوته‌های اضافی گردید. به‌طوریکه در هر واحد آزمایشی

در نهایت دو بوته قوی‌تر نگهداری شد. آزمایش به‌صورت کشت بدون خاک در ماسه صورت گرفت. برای کشت از گلدان‌هایی با قطر دهانه ۲۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۱ سانتی‌متر استفاده گردید. کف هر گلدان به‌منظور زهکشی بهتر به‌طور یک اندازه سنگ‌ریزه قرار داده شد. در مجموع ۳۶ گلدان مورد استفاده قرار گرفت. گلدان‌ها تا زمان جوانه‌زنی بذر با آب مقطر آبیاری شدند. به‌دلیل سازگاری بهتر گیاه، پس از جوانه‌زنی به مدت یک هفته آبیاری با آب معمولی و محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) با pH حدود ۶/۵-۷ و با غلظت ۱/۲ مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان در شرایط کنترل شده از نظر دما (۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی (۶۰-۶۵٪) رشد یافتند. پیش از ورود به مرحله زایشی با مشاهده اولین نشانه‌های ظهور ساقه گل‌دهنده گیاه همیشه‌بهار تیمارهای شوری به‌مدت چهار هفته و محلول‌پاشی نانوذرات سیلیکون در دو مرحله اعمال گردید. تیمار شوری به‌همراه محلول غذایی هوگلند اعمال شد، به این صورت که گیاهان یک روز در میان (به‌مدت چهار هفته) تحت تیمار کلرید سدیم قرار گرفتند. مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند و کلرید سدیم به هر گلدان داده شد. به‌منظور جلوگیری از تجمع نمک در بستر کشت هر هفته یک بار آبشویی بستر کشت صورت گرفت. نانوذرات سیلیکون در دو مرحله (مرحله اول: یک روز بعد از شروع تنش شوری و مرحله دوم: دو هفته بعد، به عبارت دیگر، مرحله اول: ۵۷ روز پس از کاشت و مرحله دوم: ۷۱ روز پس از کاشت) به‌صورت محلول‌پاشی برگ‌ی بر روی گیاهان اعمال شد. روی هر گیاه ۵۰ میلی‌لیتر محلول نانوذرات سیلیکون محلول‌پاشی گردید و برای شاهد نیز گیاهان مورد نظر با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر همزمان محلول‌پاشی شدند. برداشت گل‌های باز شده هنگامی که هنوز وارد مرحله تولید بذر نشده بودند به‌صورت روزانه انجام شد. بعد از گذشت یک ماه از برداشت گل نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر صورت گرفت.

مشخصات نانوذرات سیلیکون: نانو سیلیکون مورد استفاده در این آزمایش از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه شد.



شکل ۱- (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، (b) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، (c) طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR)، (d) پراش اشعه ایکس (XRD) نانوذرات سیلیکون مورد استفاده در آزمایش

وجود سیلیکون در نانوذرات را تأیید می‌کند. مطابق نتایج آنالیزهای انجام‌شده، نانوذرات سیلیکون از پایداری و خلوص بالایی برخوردار بودند و به این دلیل در مطالعه حاضر استفاده شدند.

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی: به‌منظور اطمینان از نفوذ و جذب نانوذرات سیلیکون به داخل اندام‌های گیاه، از ریشه و برگ گیاه تحت تیمارهای آزمایشی تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه شد.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک: طی این آزمایش برخی صفات مورفولوژیک (شامل ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی، تعداد کاپیتول، قطر بزرگترین گل و عملکرد گل)، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری طول و قطر به‌ترتیب با استفاده از خط‌کش و کولیس انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی و گل‌های جمع‌آوری شده در سایه و به دور از تابش مستقیم خورشید خشک شدند و سپس با ترازوی دیجیتال وزن آنها اندازه‌گیری

مطابق گواهی شرکت، میزان خلوص ۹۹٪، اندازه ۲۰-۳۰ نانومتر، سطح ویژه ۶۰۰-۱۸۰ مترمربع در گرم، چگالی انباشتگی ۰/۱۰ گرم در سانتی‌متر مکعب و چگالی واقعی ۲/۴ گرم در سانتی‌متر مکعب گزارش شده است. نانوذرات سیلیکون قبل از استفاده براساس تکنیک‌های مختلفی مشخصه‌یابی شدند که نتایج آن در شکل ۱ ارائه شده است (Ghorbanpour *et al.*, 2020). براساس آنالیز تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (Hitachi، S-4160، ژاپن) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (LEO، Zeiss، آلمان)، نانوذرات سیلیکون مورد آزمایش، کروی شکل و با قطر حدود ۲۰ تا ۳۰ نانومتر بودند. نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز نشان داد که وجود پیک‌های مشخصه در طیف جذبی ۱۱۰۹ و ۴۷۴ سانتی‌متر در مترمربع به‌ترتیب با گروه‌های عاملی Si-O-Si و Si-O دارد. همچنین، بررسی طیف پراش اشعه ایکس پیک گسترده‌ای را در زاویه ۲۳ درجه نشان داد، که

که در آن FW وزن تر، DW وزن خشک، TW وزن آماس برگ است.

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید: اندازه‌گیری

پراکسیداسیون لیپید با سنجش محتوی مالون دی‌آلدئید تعیین شد (Heath and Packer, 1969). به این صورت که ۰/۲ گرم از ماده گیاهی در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد وزنی- حجمی ساییده شد و بعد در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۴ میلی‌لیتر اسید تیوباریبوتیک (TBA) ۵ درصد در TCA ۲۰ درصد اضافه گردید. مخلوط فوق در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، جذب روشن‌آور در ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-160 (Shimadzu) خوانده شد. برای محاسبه غلظت مالون دی‌آلدئید از ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون دی‌آلدئید که محصول پراکسیداسیون لیپیدها است براساس میکروگرم در گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان قند محلول: برای اندازه‌گیری میزان کل

قندهای محلول از معرف آنترون با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر براساس روش (Fsles, 1951) استفاده شد.

تهیه و استخراج عصاره: برای تهیه عصاره، مقدار ۰/۵ گرم پودر گل خشک‌شده را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به‌عنوان حلال اضافه نموده و مخلوط حاصل برای ۲۴ ساعت توسط شیکر هم‌زده شد و بعد از صاف کردن توسط کاغذ صافی، عصاره حاصل در شیشه‌های غیرقابل نفوذ نسبت به هوا و نور، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل: اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم انجام شد. به این صورت که مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر از عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار، و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در

شد. عملکرد گل شامل مجموع وزن خشک گل‌های جمع‌آوری شده طی دوره گلدهی گیاه بود که براساس گرم در بوته گزارش شد.

اندازه‌گیری کلروفیل کل و کارتنوئید: برای تعیین میزان

کلروفیل و کارتنوئید کل، ۰/۵ گرم برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد ساییده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm قرار داده شد. از محلول رویی به مقدار ۳ میلی‌لیتر در داخل کووت ریخته و مقدار جذب در طول‌موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (SPECORD 200 PLUS) خوانده گردید. از معادلات زیر برای تعیین غلظت کلروفیل کل و کارتنوئید استفاده شد (Arnon, 1967):

$$\text{کلروفیل کل} = [(20.2(A_{645}) - 8.02(A_{663}))V] / 1000W$$

$$\text{کارتنوئید} = 1000(A_{470}) - 3.27(\text{Chla}) - 104(\text{Chlb}) / 227$$

در این رابطه، V حجم محلول صاف‌شده (محلول رویی که پس از سانتریفیوژ بدست آمد)، A جذب نور در طول‌موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر و W وزن تر (تازه) نمونه برحسب گرم است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد.

اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ: به‌منظور اندازه‌گیری

محتوای نسبی آب برگ (RWC)، در ساعت ۹-۱۱ صبح از جوانترین برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته و سالم گیاهان نمونه برداری شد. بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، وزن تر برگ‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌ها در آب مقطر به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق و نور کم برای محاسبه وزن اشباع، غوطه‌ور شدند و پس از این مدت نمونه‌ها به سرعت و با دقت با دستمال کاغذی خشک و وزن اشباع آنها اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌های مورد نظر در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و دوباره وزن شدند، در پایان محتوی نسبی آب برگ‌ها از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Ritchie and Nguyen, 1990).

$$RWC (\%) = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

دستگاه HPLC مورد استفاده مدل Waters ساخت کشور آمریکا مجهز به دتکتور 2695 Uv 2487 Dual λ Absorbance، ستون C18 با ابعاد $4/6 \times 150$ میلی‌متر و $3/5$ میلی‌متر و نرم‌افزار Millennium^{۳۲} بود. حلال‌های شیمیایی مورد استفاده شامل متانول با درجه خلوص HPLC از شرکت مرک آلمان و استاندارد کوئرستین از شرکت سگیما آلد ریچ تهیه شد. برای تهیه محلول استاندارد کوئرستین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار ۰/۲ میلی‌گرم از استاندارد در یک میلی‌لیتر متانول با خلوص HPLC حل شدند. از این محلول استوک، غلظت‌های مناسب جهت رسم منحنی‌های کالیبراسیون مربوط به استاندارد تهیه گردید و هر کدام طبق روش بهینه‌شده به ستون C18 تزریق شدند. مساحت پیک غلظت‌های هر استاندارد محاسبه شد و منحنی استاندارد با نرم‌افزار اکسل رسم شد سپس معادله خط $y=ax+b$ بدست آمد. مساحت پیک خوانده شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شد و x (غلظت) بدست آمد.

به‌منظور تجزیه داده‌های آزمایشی ابتدا نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از Minitab 16 بررسی و سپس محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام گرفت. مقایسه میانگین با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (۰/۰۵) برای مقایسه میانگین استفاده شد.

نتایج

صفات مورفولوژیکی: در این مطالعه، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به‌منظور تأیید جذب و انتقال نانوذرات سیلیکون توسط ریشه و برگ گیاهان در تیمارهای آزمایشی استفاده شد (شکل ۲). برخی تغییرات ساختاری سطح ریشه و برگ پس از اعمال تیمارها در شکل ۲ نشان داده شده است. ایجاد حفرات کوچک و بزرگ، انباشته شدن و یا توزیع یکنواخت نانوذرات سیلیکون در سطح اندام‌ها، همچنین، چروکیدگی و جمع‌شدن ریشه و برگ از مهم‌ترین تغییرات قابل مشاهده است.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرات اصلی تیمار محلول‌پاشی نانوذرات سیلیکون و اعمال تنش شوری در

طول‌موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به‌منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد ($y = 0.0069x - 0.239$, $R^2 = 0.9826$). به این ترتیب که میزان جذب‌های ثبت‌شده از نمونه‌ها در معادله بجای y فرض شد و مقدار x بدست آمده به‌عنوان غلظت در نظر گرفته شد (Chang et al., 2002a).

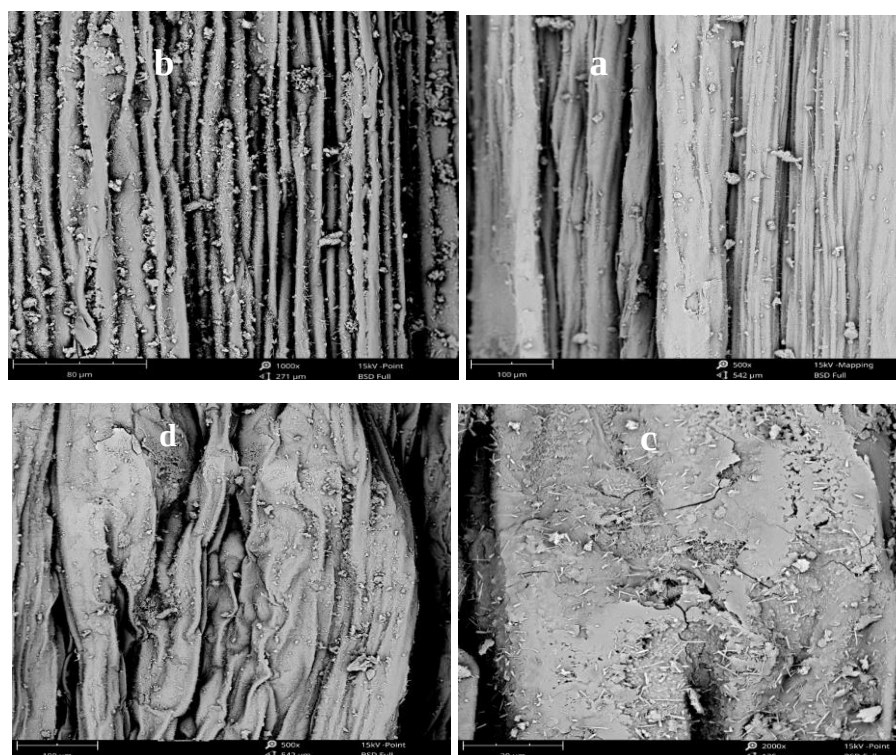
اندازه‌گیری میزان فنل کل: برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل از معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد (Singleton and Rossi, 1965). به ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲٪، ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱۰۰ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ اضافه شد. سپس جذب این مخلوط در طول‌موج ۷۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک خوانده شد. از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد ($y = 0.0005x + 0.0096$, $R^2 = 0.9899$).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش ۲ و ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH): فعالیت مهار رادیکال-های ۲ و ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط ترکیبات استخراج‌شده از گل‌های گیاه همیشه‌بهار طبق روش Shyu و Hwang اندازه‌گیری شد (۲۰۰۲). به این صورت که ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۲ میلی‌لیتر از عصاره (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده و مخلوط بدست آمده به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرارگرفت. میزان جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک خوانده شد. اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون بکار رفت ($y = 0.1x + 48.883$, $R^2 = 0.9727$). درنهایت درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط عصاره با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(\text{AC} - \text{AS}/\text{AS}) \times 100 = \text{مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (درصد)}$$

که در این رابطه AC و AS به‌ترتیب میزان جذب کنترل و جذب نمونه هستند.

اندازه‌گیری میزان کوئرستین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا: از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) جهت جداسازی و تعیین مقدار کوئرستین استفاده شد.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح ریشه (a, b) و برگ (c, d) گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) در تیمارهای آزمایشی. (a) تصویر سطح ریشه در تیمار نانوذرات سیلیکون (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کلرید سدیم (۵۰ میلی‌مولار). (b) تصویر سطح ریشه در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم. (c) تصویر سطح برگ در تیمار نانوذرات سیلیکون (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کلرید سدیم (۵۰ میلی‌مولار). (d) تصویر سطح برگ در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سیلیکون بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده گیاه دارویی همیشه‌بهار تحت تنش شوری در کشت هیدروپونیک

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییر
کارتونید	کلروفیل	عملکرد گل	قطر بزرگترین گل	تعداد کاپیتول	وزن خشک گیاه	ارتفاع گیاه		
۲۳/۳۵ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۱۹۹/۸۵ ^{**}	۰/۱۹ ^{ns}	۱۱۴/۴۸ ^{**}	۱/۷۰ ^{ns}	۳/۹۶ ^{ns}	۳	نانو سیلیکون
۶۲۲/۳۳ ^{**}	۰/۱۴ ^{**}	۳۳۷/۷۵ ^{**}	۰/۲۰ ^{ns}	۱۸۹/۰۶ ^{**}	۷۶/۷۰ ^{**}	۲۲۵/۷۷ ^{**}	۲	تنش شوری
۱۳۱/۳۳ ^{**}	۰/۰۲ ^{**}	۱۷۳/۶۰ ^{**}	۰/۳۷ [*]	۱۶۰/۱۸ ^{**}	۲/۸۴ ^{**}	۲۹/۵۱ [*]	۶	نانوسیلیکون × تنش شوری
۲۳/۱۷	۰/۰۰۷	۳۰/۳۲	۰/۱۴	۱۶/۱۶	۰/۷۳	۹/۴۷	۲۲	خطا
۹/۵۱	۱۱/۰۱	۱۹/۸۷	۸/۵۶	۲۳/۹۵	۸/۳۴	۱۰/۴۶		ضریب تغییرات (/.)

^{ns}, * و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

شرایط کشت هیدروپونیک بر برخی صفات اندازه‌گیری شده
تأثیر معنی دار نداشتند، اما برهمکنش معنی‌داری بین تیمارها
آزمایشی روی تمامی صفات مشاهده شد (جدول ۱).
نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش شدت تنش

ادامه جدول ۱-

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					میانگین تغییرات (%)
		محتوی آب نسبی	مالون دی آلدئید	فلاونوئید کل	قند محلول	کوئرسیتین	فعالیت آنتی اکسیدانی
نانو سیلیکون	۳	۹/۸۴**	۳/۷۵**	۰/۵۵*	۰/۰۹**	۱۵۳۹۳**	۸/۸۵**
تنش شوری	۲	۱۶۸/۹۶**	۴/۴۸**	۰/۲۶ ^{ns}	۰/۰۸**	۲۷۰۳۸**	۱۹/۱۷**
نانو سیلیکون × تنش شوری	۶	۱۶/۶۶**	۰/۰۹۹*	۰/۷۷**	۰/۰۲**	۲۰۰۳**	۹/۹۱**
خطا	۲۲	۱۸۶/۱	۰/۳۸	۰/۱۷	۰/۰۰۳	۵۴۰/۱۵۱	۱/۳۲
ضرب تغییرات (%)		۲۲/۴۰	۱۵/۳۹	۱۱/۶۱	۸/۳۷	۹/۶۵	۸/۷۲

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

شوری (از ۵۰ به ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) از میزان ارتفاع گیاه به ترتیب ۱۱/۲ و ۲۳/۸ درصد نسبت به شاهد کاسته شد. در مقابل کاربرد نانوذرات سیلیکون منجر به افزایش ارتفاع گیاه همیشه بهار در مقایسه با شاهد مورد نظر شد و از این نظر بین سطوح نانوذرات سیلیکون اختلاف آماری معنی داری وجود داشت (جدول ۲). بیشترین و کمترین ارتفاع گیاه ۳۷/۸ و ۲۴ سانتی متر) به ترتیب در کاربرد ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون در شرایط بدون تنش شوری، و تیمار ۳۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم مشاهده شد.

بررسی تغییرات وزن خشک اندام هوایی گیاه همیشه بهار، حاکی از وجود برهمکنش معنی دار تیمارهای نانوذرات سیلیکون × تنش شوری در سطح یک درصد بود (جدول ۲). نشان داد که با افزایش شدت تنش شوری (از ۵۰ به ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) از وزن خشک اندام هوایی گیاه به ترتیب ۱۴/۵ و ۴۷/۹ درصد نسبت به شاهد کاسته شد. لیکن، استفاده از نانوذرات سیلیکون باعث کاهش اثرات مضر تنش شوری بر وزن خشک اندام هوایی گیاه نسبت به شاهد شد. بیشترین وزن خشک اندام هوایی گیاه با میانگین ۱۳/۰۱ گرم در کاربرد ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون در شرایط بدون تنش شوری مشاهده شد.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین مقدار تعداد کاپیتول با میانگین ۳۴/۱۶ در تیمار ترکیبی نانوذرات سیلیکون

در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر و تنش شوری ۵۰ میلی مولار بدست آمد که نسبت به شاهد افزایش ۷۳/۷ درصدی نشان داد، در حالیکه کمترین تعداد کاپیتول ۹/۳۳ در تیمار ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نانو سیلیکون و بدون اعمال تنش شوری مشاهده شد که نسبت به شاهد کاهش ۵۲/۵ درصدی را نشان داد. جدول مقایسه میانگین مشخص نمود که بیشترین قطر گل با میانگین ۴/۹۰ سانتی متر مربوط به تیمار ۳۰۰ میلی گرم در لیتر نانو سیلیکون و بدون اعمال تنش شوری بود در حالیکه با غلظت های ۱۵۰ و ۷۵ میلی گرم در لیتر نانو سیلیکون و بدون اعمال تنش و ۱۰۰ میلی مولار شوری به ترتیب با میانگین ۴/۷۶ و ۴/۸۶ سانتی متر از نظر آماری تفاوت معنی دار نداشت. کمترین مقدار قطر گل با میانگین ۳/۹۳ سانتی متر در عدم محلول پاشی نانوذرات سیلیکون تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار مشاهده شد که نسبت به شاهد کاهش ۷/۷۴ درصدی را نشان داد (جدول ۲).

برهمکنش تیمارهای نانوذرات سیلیکون و تنش شوری بر عملکرد گل در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). بیشترین مقدار عملکرد گل با میانگین ۴۵/۳۳ گرم گل در بوته در تیمار ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم بدست آمد که نسبت به شاهد افزایش ۳۲/۷ درصدی داشت، همچنین، کمترین مقدار عملکرد گل ۲۰ گرم گل در بوته بود که در عدم استفاده از نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم مشاهده شد

جدول ۲- میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف نانوذرات سیلیکون و تنش شوری بر شاخص های مورفو- فیزیولوژی گیاه دارویی همیشه بهار در شرایط کشت هیدروپونیک

نانوسیلیکون (میلی گرم بر لیتر)	تنش شوری (میلی مولار)	ارتفاع گیاه (سانتی متر)	قطر بزرگترین گل (سانتی متر)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	تعداد کاپیتول	عملکرد گل (گرم در گیاه)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کارتونئید
۰	۰	۳۳/۰ ^{ab}	۴/۲۶ ^{ab}	۱۲/۳۴ ^{ab}	۱۹/۶۶ ^{bcd}	۳۴/۱۶ ^{bc}	۰/۹۷ ^a	۵۶/۸۲ ^{bc}
۵۰	۵۰	۲۹/۳۳ ^{bc}	۴/۵۳ ^{ab}	۱۰/۵۵ ^c	۱۳/۳۳ ^{def}	۲۵/۰ ^{cde}	۰/۷۲ ^{cde}	۴۵/۷۹ ^{efg}
۱۰۰	۱۰۰	۲۵/۱۶ ^{cd}	۳/۹۳ ^b	۶/۴۲ ^e	۱۱/۸۳ ^{ef}	۲۰/۰ ^e	۰/۶۷ ^e	۴۲/۳۰ ^{fg}
۰	۰	۳۴/۰ ^{ab}	۴/۳۳ ^{ab}	۱۱/۳۷ ^{bc}	۱۶/۵۰ ^{cde}	۲۹/۸۳ ^{bcd}	۰/۸۷ ^{ab}	۶۵/۶۵ ^a
۷۵	۵۰	۳۲/۳۳ ^b	۴/۱۰ ^b	۱۲/۱۹ ^{ab}	۲۵/۱۶ ^b	۳۸/۸۳ ^{ab}	۰/۸۴ ^{abcd}	۵۴/۶۰ ^{bcd}
۱۰۰	۱۰۰	۲۴/۸۳ ^{cd}	۴/۸۶ ^a	۸/۸۵ ^d	۲۱/۰ ^{bc}	۳۱/۶۶ ^{bc}	۰/۷۲ ^{cde}	۴۷/۲۴ ^{def}
۰	۰	۳۷/۸۳ ^a	۴/۷۶ ^a	۱۳/۰ ^{۱a}	۹/۳۳ ^f	۲۰/۱۶ ^e	۰/۹۸ ^a	۵۹/۶۲ ^{ab}
۱۵۰	۵۰	۲۵/۵۰ ^{cd}	۴/۴۰ ^{ab}	۱۱/۱۶ ^{bc}	۳۴/۱۶ ^a	۴۵/۳۳ ^a	۰/۷۰ ^{de}	۴۸/۷۹ ^{cdef}
۱۰۰	۱۰۰	۲۵/۸۳ ^{cd}	۴/۰ ^b	۶/۳۵ ^e	۱۱/۸۳ ^{ef}	۲۱/۰ ^{de}	۰/۶۵ ^e	۳۸/۵۱ ^g
۰	۰	۳۱/۳۳ ^b	۴/۹۰ ^a	۱۲/۰۳ ^{ab}	۱۲/۵۰ ^{ef}	۲۰/۳۳ ^e	۰/۸۶ ^{abc}	۵۶/۳۶ ^{bc}
۳۰۰	۵۰	۲۹/۶۶ ^{bc}	۴/۵۰ ^{ab}	۱۱/۲۲ ^{bc}	۱۲/۸۳ ^{def}	۲۵/۳۳ ^{cde}	۰/۸۲ ^{bcd}	۵۲/۳۷ ^{bcdde}
۱۰۰	۱۰۰	۲۴/۰ ^d	۴/۴۰ ^{ab}	۸/۰۹ ^d	۱۳/۳۳ ^{def}	۲۰/۸۳ ^{de}	۰/۶۵ ^e	۴۳/۴۷ ^{fg}

میانگین های با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد هستند.

(جدول ۲).

شد (جدول ۲).

صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی: در رابطه با میزان

رنگیزه های فتوسنتزی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش تنش شوری (از ۵۰ به ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) میزان کلروفیل و کارتونئید کل به ترتیب ۲۵/۷، ۳۰/۹ و ۱۹/۴ و ۲۷/۵ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. در مقابل کاربرد نانوذرات سیلیکون منجر به بهبود و یا حفظ رنگیزه های فتوسنتزی گیاه همیشه بهار در شرایط تنش شوری و یا عدم تنش در مقایسه با شاهد مورد نظر شد و از این نظر بین سطوح نانوذرات سیلیکون اختلاف آماری معنی داری وجود داشت (جدول ۲). بیشترین اثر بهبوددهندگی کلروفیل و کارتونئید کل، در غلظت ۷۵ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون در تنش ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم به ترتیب با افزایش ۱۴/۳، ۱۲/۲ و ۱۶/۱ و ۱۲/۷ درصد نسبت به شاهد مورد نظر مشاهده

بررسی تغییرات محتوی نسبی آب برگ در گیاه همیشه بهار حاکی از وجود برهمکنش معنی دار نانوذرات سیلیکون و تنش شوری از نظر این صفت در سطح یک درصد بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که با افزایش تنش شوری (از ۵۰ به ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) میزان محتوی نسبی آب برگ به ترتیب ۱۲/۱ و ۴۲/۹ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. لیکن، بیشترین میزان افزایش محتوی نسبی آب برگ (۱۶/۸ و ۲۲/۵ درصد) به ترتیب با کاربرد نانوذرات سیلیکون در غلظت های ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم حاصل شد (جدول ۳).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین ها، افزایش تنش شوری (از ۵۰ به ۱۰۰ میلی مولار) باعث افزایش معنی دار ($P < ۰/۰۵$) پراکسیداسیون لیپید (مالون دی آلدئید) به ترتیب به میزان ۲۷/۲

جدول ۳- میانگین اثرات متقابل تأثیر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی همیشه‌بهار در شرایط کشت هیدروپونیک

نانو سیلیکون (میلی گرم در لیتر)	تنش شوری (میلی مولار)	محتوی نسبی آب برگ (درصد)	مالون دی‌آلدئید (میکروگرم بر گرم وزن تر)	قند محلول (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	فلاونوئید فنل کل	فعالیت آنتی اکسیدانی (میکروگرم بر گرم وزن خشک)	کوئرستین
۰	۵۰	۷۶/۱۲ ^a	۲/۹۴ ^e	۰/۶۵ ^{cde}	۳/۲۵ ^{cd}	۶/۳۵ ^{bcd}	۱۹۷/۱۲ ^f
۰	۵۰	۶۶/۹۰ ^c	۴/۰۴ ^{bcd}	۰/۶۰ ^{def}	۴/۰۵ ^{ab}	۶/۹۲ ^{abc}	۲۵۹/۲۳ ^{cd}
۱۰۰	۱۰۰	۴۳/۴۳ ^{fg}	۴/۹۳ ^{ab}	۰/۵۴ ^f	۳/۲۶ ^{cd}	۶/۸۲ ^{abc}	۲۴۷/۴۵ ^{de}
۰	۵۰	۷۷/۰۶ ^a	۳/۵۷ ^{cde}	۰/۴۳ ^g	۳/۲۴ ^{cd}	۵/۹۰ ^{de}	۲۰۰/۲۵ ^g
۷۵	۵۰	۶۹/۴۰ ^b	۴/۲۶ ^{bc}	۰/۵۸ ^{def}	۲/۶۲ ^d	۵/۶۶ ^e	۲۸۶/۶۲ ^b
۱۰۰	۱۰۰	۵۶/۰۵ ^e	۴/۷۵ ^b	۰/۷۸ ^b	۳/۹۹ ^{ab}	۶/۶۷ ^{abcd}	۲۱۹/۰۹ ^{fg}
۰	۵۰	۷۶/۹۳ ^a	۳/۰۲ ^{de}	۰/۵۷ ^{ef}	۳/۶۵ ^{abc}	۵/۹۹ ^{de}	۲۷۱/۵۵ ^c
۱۵۰	۵۰	۶۱/۲۶ ^d	۳/۲۱ ^{cde}	۰/۶۲ ^{cdef}	۴/۱۳ ^a	۷/۲۰ ^a	۳۰۹/۷۸ ^a
۱۰۰	۱۰۰	۵۲/۲۰ ^{ef}	۳/۲۳ ^{cde}	۰/۶۷ ^{cd}	۳/۸۸ ^{abc}	۶/۷۰ ^{abcd}	۲۱۴/۱۱ ^{ef}
۰	۵۰	۶۵/۵۰ ^{cd}	۳/۹۹ ^{bcd}	۰/۷۱ ^{bc}	۳/۳۹ ^{bc}	۷/۰۴ ^{ab}	۲۵۶/۶۲ ^d
۳۰۰	۵۰	۴۷/۱۰ ^f	۴/۱۹ ^{bc}	۰/۹۲ ^a	۳/۹۱ ^{abc}	۶/۸۲ ^{abc}	۲۴۸/۱۸ ^{de}
۱۰۰	۱۰۰	۳۸/۷۶ ^h	۵/۹۳ ^a	۰/۷۸ ^b	۳/۲۳ ^{cd}	۶/۱۷ ^{cde}	۱۷۷/۶۷ ^h

میانگین‌های با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد هستند.

و ۴۰/۳ درصد نسبت به شاهد شد (جدول ۳). همچنین، مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که بیشترین مقدار مالون دی‌آلدئید (۵/۹۳ میکروگرم در گرم وزن تر) مربوط به گیاهان تحت تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بود که افزایش دو برابری نسبت به شاهد نشان داد.

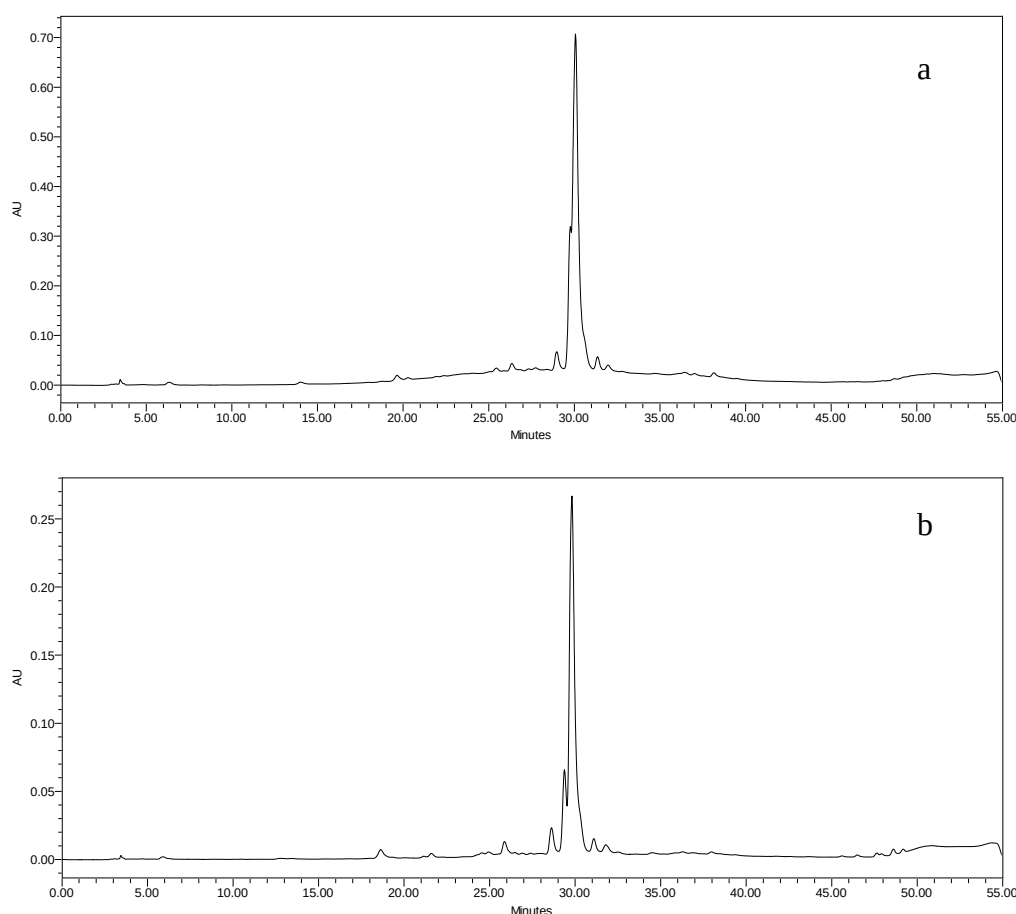
برهمکنش تیمارهای آزمایشی روی میزان قند محلول در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. براساس مقایسه میانگین اثرات متقابل، بیشترین میزان قند محلول (۰/۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در گیاهان تحت تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد که افزایش ۲۹/۳ درصدی نسبت به شاهد داشت (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها تأثیر معنی‌دار ($P < ۰/۰۱$) برهمکنش نانوذرات سیلیکون و تنش شوری روی فلاونوئید کل را نشان می‌دهد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید کل (۴/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در کاربرد ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر

نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار (افزایش ۲۱/۳ درصد نسبت به شاهد) مشاهده شد، درحالی‌که کمترین مقدار آن (۲/۶۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون در همان سطح تنش شوری (۵۰ میلی‌مولار) حاصل شد (جدول ۳).

در بررسی تغییرات فنل کل مشاهده شد که برهمکنش معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که بیشترین شاخص فنل کل (۷/۲۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار بود که نسبت به شاهد ۱۱/۸ درصد افزایش داشت. درحالی‌که کمترین میزان این شاخص (۵/۶۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در کاربرد ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار حاصل شد که نسبت به شاهد ۱۰/۹ درصد کاهش داشت.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی عصاره گل گیاه همیشه‌بهار در تیمارهای مختلف



شکل ۳- نمونه کروماتوگرام HPLC عصاره گل گیاه همیشه بهار (a) در تیمار محلول پاشی ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش ۵۰ میلی مولار در مقایسه با (b) شاهد.

کوئرسیتین (۳۰۹/۷۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی مولار بود. در مقابل، کمترین میزان کوئرسیتین (۱۷۷/۶۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک) در شاهد مشاهده شد. نمونه کروماتوگرام HPLC عصاره گل گیاه همیشه بهار در تیمار محلول پاشی ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش ۵۰ میلی مولار در مقایسه با استاندارد کوئرسیتین در شکل ۳ ارائه شده است.

بحث

تعامل گیاه با نانوذرات، سه مرحله را شامل می شود: قرار گرفتن نانوذرات در سطح ریشه یا برگ، نفوذ نانوذرات از طریق کوتیکول و اپیدرم، انتقال و تغییر شکل نانوذرات در داخل

آزمایشی تأثیر معنی داری ($P < 0/01$) بر مهار رادیکال های آزاد DPPH دارد. به طوریکه بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (۱۶/۵۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در تیمارهای ۷۵ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۱۰۰ مشاهده شد که نسبت به شاهد ۱۵/۲ درصد افزایش داشت (جدول ۳). همچنین، کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۹/۶۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در کاربرد ۷۵ میلی گرم در لیتر نانوذرات سیلیکون و تنش شوری ۵۰ میلی مولار حاصل شد که نسبت به شاهد ۳۱/۲ درصد کاهش نشان داد.

برهمکنش معنی داری از نظر محتوی کوئرسیتین در گل گیاه همیشه بهار بین تیمارهای آزمایشی در سطح یک درصد مشاهده شد (جدول ۱). نتایج حاصل از آنالیز عصاره ها با دستگاه HPLC نشان داد که بیشترین میزان ترکیب فلاونوئیدی

گیاه. نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، مانند اندازه کوچک، بالابودن نسبت سطح به حجم، شکل و غیره دارای خواصی هستند که اندازه بزرگتر آن‌ها (بالک)، این ویژگی‌ها را ندارند (Hatami et al., 2016). کاربرد نانوذرات باعث ایجاد تغییراتی در مورفولوژی ریشه و برگ گیاهان می‌شود، به عنوان مثال، سلول‌های اپیدرمی برگ گیاهان بادرنجبویه تیمارشده با نانوکامپوزیت اکسید منیزیم، کوچک و متورم نشان دادند، در حالیکه گیاهان شاهد دارای سلول‌های اپیدرمی صاف و مرتب بودند. همچنین، بسته شدن روزنه‌ها، افزایش تعداد تریکوم‌ها در سطح برگ، افزایش طول تارهای کشنده و تعداد ریشه‌های جانبی از دیگر تغییرات مشاهده شده بود (Rezaei et al., 2019). با این حال، مکانیسم‌های تشکیل منافذ در بافت‌های ریشه پس از قرارگرفتن در معرض نانوذرات هنوز ناشناخته مانده و باید مورد بررسی بیشتری قرار گیرد. ما دو احتمال را پیشنهاد می‌کنیم که می‌تواند تشکیل منافذ در ریشه گیاهان تحت تیمار با نانوذرات را توضیح دهد. اول اینکه اندازه منافذ با غلظت نانوذرات افزایش می‌یابد و احتمال انباشته (آگلومره) شدن نانوذرات در غلظت‌های بالاتر زیاده‌تر (به دلیل تأثیر بر سرعت جریان شیره سلولی) است. بنابراین تشکیل منافذ می‌تواند نتیجه یک برخورد فیزیکی بین ریشه‌ها و تجمع نانوذرات باشد، یعنی انباشته شدن کمتر نانوذرات (در غلظت کم نانوذرات) باعث ایجاد منافذ کوچکتر و تجمع بیشتر (در غلظت زیاد نانوذرات) باعث ایجاد منافذ بزرگتر می‌شود. دوم اینکه تشکیل منافذ در ریشه‌ها یک واکنش گیاه به نانوذرات است به عنوان یک عامل تنش‌زای خارجی، که به وضوح با غلظت نانوذرات ارتباط دارد (Ghorbanpour et al., 2020).

در میان انواع مختلف نانومواد، نانوذرات سیلیکون توانایی بالقوه‌ای در بهبود عملکرد گیاه هم در شرایط مطلوب محیطی و هم در محیط‌های تنش‌زا دارد. مکانیسم‌های مختلفی در اثرات بهبوددهندگی نانوذرات سیلیکون تحت تنش‌های محیطی نقش دارند از جمله فعال‌سازی دفاع آنتی‌اکسیدانی و بهبود توانایی گیاه در جذب آب و مواد مغذی از خاک (Tripathi et al., 2017). شوری، یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی

است که موجب آسیب شدید به محصولات کشاورزی و همچنین کاهش تنوع زیستی گیاهی می‌گردد. مطالعات قبلی نشان داده است که تنش شوری نه تنها از طریق کاهش پتانسیل اسمزی باعث تغییرات مورفولوژیکی و کاهش رشد اندام هوایی می‌شود، بلکه سمیت یونی حاصل از افزایش عناصر مضر در تنش شوری نیز کلیه فعالیت‌های فیزیولوژیکی و متابولیسمی گیاه را مختل می‌کند، که متعاقباً باعث کاهش فشار تورژسانس و کاهش ارتفاع و عملکرد پیکره رویشی می‌شود (صفرنژاد و حمیدی، ۱۳۹۵). گزارش شده است که در شرایط تنش شوری، ارتفاع گیاه و سطح برگ بسیار سریع‌تر از سایر صفات مورفولوژیکی و فنولوژیکی کاهش می‌یابند، زیرا تجمع ماده خشک در گیاه حاصل میزان فتوسنتز خالص و سطح فتوسنتزکننده است (Munns, 2002). تحقیقات نشان می‌دهد که کاهش وزن خشک گیاه در شرایط شور می‌تواند به دلیل کاهش رشد، کاهش سرعت فتوسنتز و آسیب به پایداری غشا توسط نمک باشد (سلامی و همکاران، ۱۳۸۵). بابایی و همکاران (۱۳۸۹) در یک مطالعه روی گیاه آویشن گزارش کردند که تنش شوری موجب کاهش پارامترهای رشد و عملکرد اندام رویشی از جمله ارتفاع بوته شد، که با نتایج آزمایش حاضر همسویی دارد. رشد و ارتفاع بوته به طور قابل ملاحظه‌ای به شرایط محیطی که گیاه در آن رشد می‌کند وابسته است. به دلیل کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک در اثر تنش شوری، جذب آب کاهش و در نتیجه روزنه‌ها بسته شده و نیز میزان تنفس و فتوسنتز کاهش می‌یابد. این موضوع یکی از دلایل اصلی کاهش رشد گیاه در شرایط شوری است (Naveed et al., 2020). همچنین، گزارش شده است که افزایش سطح شوری آب آبیاری موجب کاهش ارتفاع بوته، تعداد و طول شاخه‌های جانبی، قطر ساقه، فواصل میانگره‌ها، تعداد و سطح برگ، عملکرد تر و خشک پیکره رویشی در گیاه دارویی آگاستاکه گردید (Khorsandi et al., 2010). هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، سلامی و همکاران (۱۳۸۵) گزارش کردند که در دو گیاه دارویی سنبل‌الطیب و زیره‌سبز با افزایش سطح شوری، وزن خشک اندام‌های هوایی و زمینی کاهش پیدا

کرد. در این پژوهش نیز کاهش وزن خشک اندام هوایی گیاه، تعداد کاپیتول، عملکرد گل همیشه‌بهار در شرایط تنش شوری مشاهده شد و کاربرد نانوذرات سیلیکون در غلظت‌های خاص سبب بهبود شرایط تنش و افزایش معنی‌دار این پارامترها نسبت به شاهد شد. محققان زیادی اثر سیلیکون در رشد و ارتفاع و عملکرد گیاهان زراعی و همچنین در فیزیولوژی و متابولیسم گیاهان مختلف، را بررسی نمودند (امیری و همکاران، ۱۳۹۲). شواهد فراوانی در درست است که نشان می‌دهد زمانی‌که سیلیکون در اختیار گیاهان قرار گیرد نقش چشمگیری در رشد، تغذیه معدنی، مقاومت مکانیکی و مقاومت در برابر تنش‌های گوناگون دارد (Farooq et al., 2009). براساس مطالعات قبلی، نانوذرات سیلیکون به‌طور مستقیم و غیرمستقیم در بهبود رشد ریشه و اندام هوایی گیاهان مؤثر است (Siddiqui et al., 2014).

در آزمایش حاضر، تنش شوری باعث کاهش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل و کارتنوئید نسبت به شاهد شد، نتایج مشابهی در ژنوتیپ‌های گیاه گندم گزارش گردید (Sairam et al., 2002). کاهش میزان کلروفیل در تنش شوری می‌تواند به دلیل افزایش بیش از حد یون سدیم، کاهش جذب نیتروژن و کمبود منیزیم باشد (Hajiboland and Cheraghvareh, 2014). کاهش میزان کلروفیل به‌عنوان یک شاخص مهم برای نشان دادن آسیب به رشدونمو گیاه در تنش شوری محسوب می‌شود. تنش شوری با تأثیر بر عوامل روزنه‌ای و بسته‌شدن روزنه‌ها باعث کاهش ورود دی‌اکسید کربن به سلول‌های برگ، کاهش واکنش‌های فتوشیمیایی از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در چرخه تثبیت کربن و تولید رادیکال‌های آزاد در کلروپلاست و در نتیجه کاهش کلروفیل می‌شود (Parida and Das, 2005). اما محلول‌پاشی گیاه همیشه‌بهار با نانوذرات سیلیکون در غلظت کمتر باعث افزایش کلروفیل در همه سطوح تنش شوری شد و حتی در غلظت‌های بیشتر باعث افزایش کلروفیل (در تنش شوری ۵۰ میلی‌مولار) و یا حفظ آن در تنش شدید (۱۰۰ میلی‌مولار) شد. این موضوع نشان می‌دهد که نانوذرات سیلیکون (به‌ویژه در

غلظت‌های کمتر) با حذف یا سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد، باعث بهبود سیستم دفاعی گیاه و افزایش کارایی فتوسیستم II و عملکرد کوانتومی می‌شوند (Tripathi et al., 2017). در آزمایش حاضر افزایش محتوی کارتنوئید (به‌عنوان گیرنده کمکی نور در فتوسنتز که کلروفیل را نیز از اکسیداسیون نوری محافظت می‌کند) در تیمار با نانوذرات سیلیکون نسبت به شاهد این است که باعث افزایش ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به نام فلاونوئید شد. این ترکیبات جمع‌آوری‌کننده قوی رادیکال‌های آزاد هستند (Wei et al., 1990). همچنین، گزارش شده است که تأثیر مثبت نانوذرات سیلیکون بر رشد گیاه می‌تواند به دلیل تجمع یکنواخت آن در سطح برگ، افزایش استحکام برگ‌ها، تأثیر بر فراساختار کلروپلاست و نیز افزایش غلظت کلروفیل در واحد سطح برگ باشد (Liang, 1998).

در پژوهش حاضر، محتوی نسبی آب برگ در گیاهان تحت تنش کاهش یافت، در مقابل استفاده از نانوذرات سیلیکون باعث بهبود وضعیت آبی گیاه شد. در گیاهان تحت تنش شوری به دلیل کاهش پتانسیل اسمزی میزان جذب آب توسط گیاه کاهش می‌یابد که در نتیجه باعث کاهش محتوی نسبی آب برگ می‌شود (Khan et al., 2015). اما سیلیکون با رسوب در سطح خارجی سلول‌های اپیدرم برگ، باعث کاهش اتلاف آب از روزنه‌ها و متعاقباً افزایش محتوی نسبی آب برگ می‌شود (Liu et al., 2015). علاوه بر این، افزایش محتوی نسبی آب برگ با کاربرد سیلیکون می‌تواند به دلیل افزایش توانایی جذب آب به‌واسطه افزایش نسبت ریشه به شاخساره (Wang et al., 2015)، هدایت هیدرولیکی ریشه (Hattori et al., 2008) و فعالیت ریشه (Chen et al., 2014) باشد.

پراکسیداسیون لیپید (تولید مالون دی‌آلدئید) یکی از شاخص‌های عمده آسیب غشا در شرایط تنش شوری در گیاهان است. نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش سطح شوری میزان پراکسیداسیون لیپید نیز افزایش یافت که می‌تواند به دلیل القا تنش اکسیداتیو در نتیجه تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال باشد که به نوبه خود لیپیدها، پروتئین‌ها و نهایتاً

ساختار غشا سلولی را تخریب می‌کند (Molassiotis *et al.*, 2006). افزایش محتوی مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت از غشاء در اثر تنش شوری در گیاه همیشه‌بهار و گوجه‌فرنگی بیشتر گزارش شده است که با نتایج بدست‌آمده در این پژوهش همخوانی دارد (Stevens *et al.*, 2006). همچنین، گزارش شده است که سیلیکون از آسیب غشای سلولی ناشی از تولید مالون دی‌آلدئید با تنظیم دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) در گیاهان پیشگیری می‌کند (Zhu and Gong, 2014). کاهش تولید مالون دی‌آلدئید و پراکسیداسیون لیپید در کاربرد سیلیکون در گیاهان مختلف از قبیل جو (Liang *et al.*, 2003)، ذرت (Moussa, 2006) و انگور (Soylemezoglu *et al.*, 2009) نیز گزارش شده است. بنابراین، این نتایج پیشنهاد می‌کند که نانوذرات سیلیکون از ساختار غشای سلولی و نفوذپذیری آن در گیاه همیشه‌بهار تحت تنش شوری محافظت می‌کند.

در مطالعه حاضر، تنش شوری باعث کاهش میزان قند محلول شد، اما محلول‌پاشی نانوذرات سیلیکون اثر تنش شوری را کاهش داد و سبب افزایش قند محلول گردید. گزارش شده است که کاربرد سیلیکون می‌تواند تحمل به شوری در گیاه را با تغییر میزان اسمولیت‌ها مانند پرولین (Yin *et al.*, 2013)، گلیسین‌بتائین (Torabi *et al.*, 2015)، کربوهیدرات‌ها (Ming *et al.*, 2012)، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مثل فنل‌ها (Hashemi *et al.*, 2010)، قند محلول و آمینواسیدها (Hajiboland *et al.*, 2016) افزایش دهد. در واقع سیلیکون شوک اسمزی ناشی از سمیت یونی Na^+ و Cl^- را به حداقل می‌رساند. بهبود تنظیم اسمزی از طریق افزایش سطح اسمولیت‌ها در تیمار با سیلیکون در سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت فتوسنتزی و رشد بهتر در شرایط تنش شوری مؤثر است (Pereira *et al.*, 2013).

شواهد زیادی نشان می‌دهد که در شرایط تنش تولید برخی از ترکیبات ثانویه در گیاهان تا چندین برابر افزایش می‌یابد (Selmar *et al.*, 2017). بسیاری از فلاونوئیدها جزء فعالی از گیاهان دارویی بوده و خواص دارویی دارند. آن‌ها به‌عنوان

ترکیبات فعال بیولوژیکی، عوامل محافظت‌کننده در مقابل تنش (حفاظت اسمزی)، تعدیل اسمزی و به‌عنوان جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در مقاومت گیاهان دارند (Chang *et al.*, 2002b). نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت شوری تا سطح ۵۰ میلی‌مولار میزان فلاونوئیدها نیز افزایش می‌یابد. یکی از دلایل افزایش میزان فلاونوئیدها در شرایط تنش، ایجاد محدودیت در انتقال الکترون فتوسنتزی طی تنش است که سبب ایجاد تغییرات متابولیک در گیاه از جمله منجر به القای سنتز فلاونوئیدها برای تعدیل این وضعیت می‌شود. نتایج مشابهی از افزایش محتوی فلاونوئید و فنل کل در گیاه مریم‌گلی در تیمار با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم گزارش شد (Ghorbanpour, 2015). همچنین، نشان داده شده است که محتوی فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کالوس گیاه مرزه خوستانی با قرارگرفتن در معرض سطوح کم نانو لوله‌های کربنی چند دیواره به‌دلیل افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL)، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافت (Ghorbanpour and Hadian, 2015). در پژوهش حاضر، تنش شوری و تیمار نانوذرات سیلیکون (در غلظت‌های مناسب) باعث افزایش معنی‌دار میزان کوئرستین (از ترکیبات فلاونوئیدی) در گیاه همیشه‌بهار شد. افزایش فعالیت آنزیم PAL (آنزیم اصلی در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه) در گیاهان تحت تیمار سیلیکون دلیل اصلی افزایش ترکیبات فنلی گزارش شد (Silva *et al.*, 2010). گزارش شد که محتوی چندین نوع متابولیت ثانویه مانند فنولیک‌ها، فلاونوئیدها، اسید رزمارینیک و اسید کافئیک به‌دنبال افزایش سطح پراکسید هیدروژن ناشی از استفاده از غلظت‌های زیاد نانوذرات افزایش می‌یابد (Hatami *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر، افزایش تولید متابولیت‌های با ارزشی مثل کوئرستین با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکون (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ادامه پیدا نکرد و حتی نسبت به شاهد کاهش هم داشت. یکی از دلایل اصلی کاهش متابولیت‌ها در غلظت‌های بالای نانوذرات، شروع پاسخ فوق حساسیت و سمی‌شدن سلول‌ها به‌دلیل تماس بیشتر محرک‌ها با آنها و ایجاد

اثر بازخوردی و عدم بیان ژن ها مؤثر است (Yang et al., 2006). احتمالاً یکی از موانع ادامه تولید و تجمع مواد فنلی و فلاونوئیدی در غلظت های بالای نانوذرات، سمیت نانوذرات مورد استفاده باشد (Hazrati Jahan et al., 2017). به طور کلی، افزایش میزان متابولیت های ثانویه با افزایش فعالیت آنزیم های مربوط به دفاع اکسیداتیو و متابولیسم ثانویه و غالباً با رونویسی ژن های مربوط به آنها ارتباط مثبت دارد. از جمله مکانیسم های آنتی اکسیدانی گیاهان تحت تنش، افزایش سطوح ترکیبات فنلی است، چرا که این گونه ترکیبات به عنوان پالاینده های گونه های فعال اکسیژن عمل کرده و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی و مانع پراکسیداسیون لیپیدها می شوند (Tattini et al., 2004). نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت شوری میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی نیز افزایش می یابد، زیرا با توجه به نقش آنتی اکسیدانی این ترکیبات در گیاه، به نظر می رسد افزایش این متابولیت ها در گیاه تحت شرایط تنش شوری، سبب افزایش مقاومت آن در برابر عوامل نامساعد محیطی می شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، محلول پاشی با نانوذرات سیلیکون باعث بهبود پارامترهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار شد. به طوریکه کاربرد نانوذرات سیلیکون در غلظت ۷۵ میلی گرم بر لیتر باعث افزایش معنی دار پارامترهای مورفولوژیکی (شامل ارتفاع بوته، وزن خشک اندام

منابع

- امیدبگی، ر. (۱۳۷۶) رهیافت های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات طراحان نشر.
- امیری، ا.، باقری، ع. ا.، خواجه، م.، نجف آبادی پور، ف. ا. و یداللهی، پ. (۱۳۹۲) تأثیر محلول پاشی سیلیکون بر عملکرد و آنزیم های آنتی اکسیدانی گلرنگ در شرایط تنش خشکی. مجله پژوهش های به زراعی ۵: ۳۶۱-۳۷۲.
- بابایی، ک.، امینی دهقی، م.، مدرس ثانی، ع. م. و جباری، ر. (۱۳۸۹) بررسی اثر تنش شوری بر برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و شیمیایی گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*). نشریه زراعت ۷۱: ۷۹-۸۶.
- صفرنژاد، ع. و حمیدی، ح. (۱۳۹۵) بررسی ویژگی های مورفولوژی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) تحت تنش شوری. فصل نامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۶: ۱۴۰-۱۲۵.

هوایی و عملکرد گل) و بهبود صفات فیزیولوژیکی (شامل محتوی نسبی آب برگ، رنگیزه های فتوسنتزی و فعالیت آنتی اکسیدانی) گردید. همچنین، استفاده از نانوذرات سیلیکون در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر تحت تنش ۵۰ میلی مولار موجب افزایش متابولیت های ثانویه از جمله فنل و فلاونوئید کل و کوترسیتین شد. همچنین، مشاهده شد که استفاده از غلظت های مناسب نانوذرات سیلیکون نه تنها سبب کاهش اثرات منفی تنش شوری می شود، بلکه در شرایط نرمال باعث افزایش معنی دار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه همیشه بهار گردید که این خود عاملی است که باعث می شود تا خواص دارویی و آنتی اکسیدانی گیاه افزایش یابد. بنابراین، با توجه به جدید بودن فناوری نانو و روند رو به رشد تحقیقات گسترده در زمینه استفاده از این فناوری برای تولید متابولیت های ثانویه گیاهان و به طور کلی دستیابی به محصولات کشاورزی با کیفیت، همچنین با توجه به شوری خاک های ایران و افزایش این اراضی در سال های اخیر می توان به آینده استفاده از این فناوری در بحث کشاورزی و به ویژه گیاهان دارویی امیدوار بود. تحقیقات بیشتر و پژوهش های تکمیلی در شرایط مزرعه ای نیازمند است تا چنین نتایج امیدبخشی تأیید گردد.

تشکر و قدرانی

مقاله حاضر از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه اراک است. لذا از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک به دلیل حمایت در اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر می شود.

- Aghai, K., Talai, N., Kanani, M. and Yazdani, M. (2014) Effect of salt stress on some physiological and biochemical parameters of two *Salvia* species. *Journal of Plant Process and Function* 3: 85-96.
- Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal* 23: 112-121.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002a) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chang, W. C., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K. and Kim, S. K. (2002b) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163: 1161-1168.
- Chen, D., Yin, L., Deng, X. and Wang, S. (2014) Silicon increases salt tolerance by influencing the two-phase growth response to salinity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Physiology Plant* 36: 2531-2535.
- Cui, J., Zhang, E., Zhang, X. and Wang, Q. (2021) Silicon alleviates salinity stress in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) by regulating carbon and nitrogen metabolism. *Scientific Reports* 11: 1115.
- Duan, D., Liu, X., Ajmal khan, M. and Gul, B. (2004) Effects of salt and water stress on the germination of *Chenopodium glaucum* L. seed. *Pakistan Journal of Botany* 364: 793-800.
- Etesami, H. and Jeong, B. R. (2018) Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 881-896.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. A. (2009) Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Fsles, F.W. (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates of yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 193: 113-116.
- Ghorbanpour, M. (2015) Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal Plant Physiology* 20: 249-256.
- Ghorbanpour, M. and 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.
- Ghorbanpour, M., Mohammadi, H. and Kariman, K. (2020) Nanosilicon-based recovery of barley (*Hordeum vulgare*) plants subjected to drought stress. *Environmental Science: Nano* 7: 443-461.
- Hajiboland, R. and Cheraghvareh, L. (2014) Influence of Si supplementation on growth and some physiological and biochemical parameters in salt-stressed tobacco (*Nicotiana rustica* L.) plants. *Journal of Sciences* 25: 205-217.
- Hajiboland, R., Cheraghvareh, L. and Dashtebani, F. (2016) Effect of silicon supplementation on wheat plants under salt stress. *Journal of Plant Process and Function* 5: 1-12.
- Hashemi, A., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H. R. (2010) Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L. plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 56: 244-253.
- Hatami, M., Naghdi Badi, H. and Ghorbanpour, M. (2019) nano-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells: A review. *Journal of Medicinal Plants* 3: 6-36.
- Hatami, M., Kariman, K. and Ghorbanpour, M. (2016) Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science of the Total Environment* 571: 275-291.
- Hattori, T., Sonobe, K., Araki, H., Inanaga, S., An, P. and Morita, S. (2008) Silicon application by sorghum through the alleviation of stress-induced increase in hydraulic resistance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 31: 1482-1495.
- Hazrati Jahan, R., Zare, N., Dezhsetan, S. and Sheikhzadeh Mosaddeg, P. (2017) Enhanced taxol-precursor. *Journal of System and Management Sciences* 33: 73-89.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular of California Agricultural Experiment Station*. 2nd Ed.
- Khan, M. S. A., Karim, M. A., Abullah, A. M., Parveen, S., Bazzaz, M. M. and Hossain, M. A. (2015) Plant water relations and proline accumulations in soybean under salt and water stress environment. *Journal of Plant Sciences* 3: 272-278.
- Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 6: 2128-2135.
- Khorsandi, O., Hassani, A., Sefidkon, F., Shirzad, H. and Khorsand, A. (2010) Effect of salinity (NaCl) on growth, yield, essential oil content and composition of *Agastache foeniculum* Kuntz. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 26: 438-451.
- Liang, Y. C. (1998) Effect of si on leaf ultrastuture, chlorophyll content and photosynthetic active in baeley under salt stress. *Pedosphera* 8: 289-296

- Liang, Y., Chen, Q. I. N., Liu, Q., Zhang, W. and Ding, R. (2003) Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology* 160: 1157-1164.
- Liu, P., Yin, L., Wang, S., Zhang, M., Deng, X., Zhang, S. and Tanaka, K. (2015) Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L. *Environmental and Experimental Botany* 111: 42-51.
- Ming, D. F., Pei, Z. F., Naeem, M. S., Gong, H. J. and Zhou, W. J. (2012) Silicon alleviates PEG - induced water - deficit stress in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *Journal of Agronomy and Crop Science* 198: 14-26.
- Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Kofidis, G., Diamantidis, G. and Therios, E. (2006) Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia Plantarum* 50: 61-8.
- Moussa, H. R. (2006) Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Agriculture and Biology* 8: 293-297.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Nair, S. H., Varghese, B. G., Nair, T., Maekawa, Y., Yoshida, D. and Kumar, S. (2010) Nano particulate material delivery to plants. *Plant Science* 179: 154-163.
- Naveed, M., Sajid, H., Mustafa, A., Niamat, B., Ahmad, Z., Yaseen, M., Kamran, M., Rafique, M., Ahmar, S. and Chen, J. T. (2020) Alleviation of salinity-induced oxidative stress, improvement in growth, physiology and mineral nutrition of canola (*Brassica napus* L.) through calcium-fortified composted animal manure. *Sustainability* 12: 846.
- Ozturk, A., Unlukara, A., Ipek, A. and Gurbuz, B. (2004) Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Pakistan Journal of Botany* 36: 787-792.
- Parida, A. K. and Das, A. B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants. A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Parida, A. K., Dagaonkar, V. S., Phalak, M. S. and Auramgabadkar, L. P. (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnology Reports* 1: 37-48.
- Pereira, T. S., da Silva Lobato, A. K., Tan, D. K. Y., da Costa, D. V., Uchoa, E. B., do Nascimento Ferreira, R., dos Santos Pereira, E., Avila, F. W., Marques, D. J. and Guedes, E. M. S. (2013) Positive interference of silicon on water relations, nitrogen metabolism, and osmotic adjustment in two pepper (*Capsicum annum*) cultivars under water deficit. *Australian Journal of Crop Science* 7: 1064.
- Rastogi, A., Tripathi, D. K., Yadav, S., Chauhan, D. K., Zivcak, M., Ghorbanpour, M., El-Sheery, N. I. and Brestic, M. (2019) Application of silicon nanoparticles in agriculture. *3Biotech* 9: 90.
- Razmjoo, K., Heydarizadeh, P. and Sabzalian, M. R. (2008) Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomilla*. *International Journal of Agriculture and Biology* 10: 451-454.
- Rezaei, Z., Jafarirad, S. and Kosari-Nasab, M. (2019) Modulation of secondary metabolite profiles by biologically synthesized MgO/perlite nanocomposites in *Melissa officinalis* plant organ cultures. *Journal of Hazardous Materials* 380: 120878.
- Ritchie, S. W. and Nguyen, H. T. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30: 105-111.
- Sairam, R. K., Veerabhadra Rao, K. and Serivastava, G. C. (2002) Differential response wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Selmar, D., Kleinwachter, M., Abouzeid, S., Yahyazadeh, M. and Nowak, M. (2017) The impact of drought stress on the quality of spice and medicinal plants. In: *Medicinal Plants and Environmental Challenges* (eds. Ghorbanpour, M. and Varma, A.) Pp. 159-188. Springer International Publishing AG.
- Shyu, Y. S. and Hwang, L. S. (2002) Antioxidant activity of the crude extract of lignin glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Research International* 35: 357-65.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Faisal, M. and Al Sahli, A. A. (2014) Nano-silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 2429-2437.
- Silva, I. T., Rodrigues, F. A., Oliveira, J. R., Pereira, S. C., Andrade, C. C. L., Silveira, P. R. and Conceicao, M. M. (2010) Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. *Journal of Phytopathol* 158: 253-262.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Soylomezoglu, G., Demir, K., Inal, A. and Gunes, A. (2009) Effect of silicon on antioxidant and stomatal response of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) rootstocks grown in boron toxic, saline and boron toxic-saline soil. *Scientia*

- Horticulturae 123: 240-246.
- Stevens, J., Senaratna, T. and Sivasithamparam, K. (2006) Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): Associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regulation* 49: 77-83.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. and Agati, G. (2004) Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547-561.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., Dubey, N. K. and Chauhan, D. K. (2017) Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 70-81.
- Torabi, F., Majd, A. and Enteshari, S. (2015) The effect of silicon on alleviation of salt stress in borage (*Borago officinalis* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 61: 788-798.
- Wang, S., Liu, P., Chen, D., Yin, L., Li, H. and Deng, X. (2015) Silicon enhanced salt tolerance by improving the root water uptake and decreasing the ion toxicity in cucumber. *Frontiers in Plant Science* 6: 759.
- Wei, H., Tye, L., Bresnick, E. and Birt, D. F. (1990) Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Research* 50: 499-502.
- Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C. and Yang, P. (2006) Influence of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research* 110: 179-190.
- Yin, L., Wang, S., Tanaka, K., Fujihara, S., Itai, A., Den, X., et al. (2016) Silicon-mediated changes in polyamines participate in silicon-induced salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. *Plant, Cell and Environment* 39: 245-258.
- Zhu, Y. and Gong, H. (2014) Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agronomy for Sustainable Development* 34: 455-472.

The effects of silicon nanoparticles on morpho-physiological and biochemical parameters of *Calendula officinalis* L. plants under salinity stress in hydroponic culture conditions

Zeinab Veisi, Mansour Ghorbanpour*, Morteza Akramian

¹ Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

(Received: 07/06/2021, Accepted: 02/10/2021)

Abstract

Nanoparticles depending on the plant species, methods used, culture conditions, concentration, etc. may have different effects on the induction of physiological and metabolic processes in plants. In this study, the effects of different levels of silicon nanoparticles (0, 75, 150 and 300 mg/L) and salinity stress (0, 50 and 100 mM NaCl) were investigated as a factorial experiment based on completely randomized design with three replications under hydroponic culture conditions on morphological, physiological and biochemical parameters of *Calendula officinalis* L. plant. Scanning Electron Microscopy (SEM) confirmed the adsorption and translocation of silicon nanoparticles through leaves and roots upon experimental treatments. The results of analysis of variance (ANOVA) showed that the interaction effects of silicon nanoparticles and salinity stress on all measured traits were significant ($P < 0.05$). Results showed that salinity stress reduced plant height, shoot dry weight, number of capitols, the largest flower diameter, flower yield, total chlorophyll as well as carotenoids and leaf relative water content. In contrast, the application of silicon nanoparticles reduced the negative effects of salinity stress (lipid peroxidation), improved growth parameters, photosynthetic pigments, quantitative (flower production) and qualitative (quercetin content) yield of the plant compared to the control, and there were a statistically significant differences in this regard between silicon nanoparticle levels. The results of analysis of extracts by HPLC showed that the highest amount of quercetin (309.78 $\mu\text{g/g}$ dry weight) was related to the treatment of 150 mg/L silicon nanoparticles and salinity stress of 50 mM. Also, the antioxidant activity of plant flower extracts in different experimental treatments showed a significant ($P < 0.01$) difference on inhibition of DPPH free radicals and had a similar trend with phenolic and flavonoid contents. Therefore, the use of appropriate concentration of silicon nanoparticles seemed to be effective in reducing the negative effects of salinity stress and increasing the content of pharmacologically active metabolites in marigold.

Keywords: *Calendula officinalis*, Nano-silicone, Salinity stress, Quercetin, Flower yield.

Corresponding author, Email: m-ghorbanpour@araku.ac.ir