

اثرات نانو ذرات آهن و مس بر فاکتورهای تنشی و سنتز رزمارینیک اسید در گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.)

نقیسه وارسته خانلری^۱، خدیجه کیارستمی^{۱*}، منیر حسین زاده نمین^۱ و محمد عبدلی^۲

^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

^۲ گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۲۵)

چکیده

بادرشبی (*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 (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm) و مس (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ ppm) بر گیاهان سه ماهه بادرشبی 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 نانو ذرات به بافت برگ گیاه بادرشبی، 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، مالون دی‌آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بادرشبی 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.

واژه‌های کلیدی: بادرشبی، گونه‌های فعال اکسیژن، محرک، متابولیت‌های ثانویه، میکروسکوپ الکترونی گذاره

مقدمه

(2023). بادرشبی 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 و این گیاه در طب سنتی کاربرد زیادی دارد. از این گیاه برای از بین بردن نفخ شکم، معده درد و

بادرشبی 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.,

مطالعات بسیاری در زمینه اثر نانوذرات بر رشد و متابولیسم گونه‌های گیاهی مختلف صورت گرفته است. به عنوان مثال، استفاده از نانو ذرات آهن با غلظت ۹۰ ppm در گیاه بادرشبی (Moradbeygi *et al.*, 2020)، و با ۰/۲ ppm در گیاه ریحان (Tavallalia *et al.*, 2020) موجب افزایش مقدار رزمارینیک اسید شد.

بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و توأم روی گیاهان بادرشبی انجام شد تا بهترین تیمارها جهت افزایش تولید رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انتخاب شوند و از آنجایی که استفاده از نانو ذرات منجر به ایجاد تنش در گیاهان می‌شود در نتیجه انتظار می‌رود که میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین، MDA، H₂O₂ و پرولین نیز افزایش یابند. در این پژوهش برای نخستین بار اثر ترکیبی نانو ذرات مس و آهن در گیاه بادرشبی مورد بررسی قرار گرفته است. علت استفاده این نانو ذرات، نقش کاربردی آن‌ها در بسیاری از آزیم‌های کلیدی در مسیر فتوسنتز و زنجیره انتقال اکترول است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای گیاه دارویی بادرشبی از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) (<http://www.Pakanbazer.com>) و نانو ذرات آهن و مس با اندازه‌های به ترتیب ۳۵ تا ۴۵ و ۴۰ نانومتر از شرکت نانوصدرا (مشهد، ایران) خریداری شدند.

پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. ۴۸ عدد گلدان اندازه شماره ۴ با ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر تهیه و سپس خاک باغچه، ماسه و کود دامی با نسبت ۱:۱:۲ با یکدیگر ترکیب و در داخل گلدان‌ها ریخته شدند. در داخل هر گلدان با فاصله مناسب ۱۰ عدد بذر کاشته شد. گلدان‌ها به گلخانه دانشگاه الزهرا با دمای 25 ± 2 °C و دوره نوری ۸/۱۶ روشنایی/ تاریکی منتقل شدند. گلدان‌ها تا پیش از سبز شدن بذرها، هفته‌ای یکبار آبیاری شده ولی پس از جوانه زدن بذرها، هفته‌ای

سردرد استفاده می‌شود. بادرشبی دارای ترکیبات فنلی بسیاری مانند کافئیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، آپیجین و فرولیک اسید است (Simea *et al.*, 2023).

مهمترین ترکیب فنلی بادرشبی رزمارینیک اسید است که در مسیر فنیل‌پروپانوئید سنتز می‌شود (Vafadar and Ehsanzadeh, 2023). رزمارینیک اسید به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای درمان بیماری‌هایی مانند سرطان اهمیت زیادی دارد (Simea *et al.*, 2023).

کشت و بهره‌برداری از گیاهان دارویی در طبیعت محدودیت‌هایی دارد. همچنین در مقیاس وسیع از کشت گیاهان دارویی مقدار ناچیزی متابولیت ثانویه استخراج می‌شود. محققین در تلاش هستند که بتوانند در مدت زمان کوتاه و با هزینه کمتر مقادیر قابل توجهی از متابولیت‌های ثانویه را تولید نمایند. یکی از این روش‌ها، تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه با استفاده از محرک‌ها است (Twajj *et al.*, 2022).

محرک‌های زیستی و غیرزیستی ترکیباتی هستند که در غلظت‌های بسیار کم می‌توانند متابولیت‌های ثانویه را در مقیاس وسیعی تولید نمایند. مقدار متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تیمار نشده بسیار ناچیز است، درحالی‌که در گیاهان تیمار شده با محرک‌ها مقدار متابولیت‌های ثانویه به شدت افزایش می‌یابد (Ghosh and Pal, 2023). محرک‌های زیستی با فعال‌نمودن سازوکارهای دفاعی منجر به سنتز متابولیت‌های ثانویه و همچنین منجر به پاسخ‌های فوق‌حساسیتی در گیاهان می‌شوند. سلول‌های گیاهی با درک محرک‌ها، پاسخ‌های دفاعی سریع مانند تولید انواعی از گونه‌های فعال‌اکسیژن (ROS)، فعال نمودن ژن‌های دخیل در دفاع، سنتز فیتواکسین‌ها، ایجاد تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و همچنین افزایش جریان‌های یونی از عرض غشای پلاسمایی پاسخ می‌دهند (Ghosh and Pal, 2023).

یکی از مهمترین محرک‌ها، نانوذرات هستند. این ذرات با داشتن سطح کوچک، بسیار واکنش‌پذیرند و از آنجایی که حلالیت‌پذیری بالایی دارند، در کوتاه‌ترین زمان ممکن می‌توان به بهترین نتیجه دست یافت (Selmani *et al.*, 2022).



شکل ۱- گیاهان ۹۰ روزه بادرشبی آماده برای اعمال تیمار با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا یا توأم

دو بار آبیاری شدند. با بزرگ شدن گیاهان نیاز آبی آن‌ها افزایش یافته و هر دو روز یکبار گیاهان آبیاری شدند. پس از اینکه گیاهان به سن ۹۰ روز رسیدند، با غلظت‌های 25 Cu ppm ، 50 Cu ppm ، 100 Cu ppm ، 250 Fe ppm ، 500 Fe ppm و ترکیبی از هر دو ($25 \text{ Cu} + 250 \text{ Fe}$)، $25 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 250 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $100 \text{ Cu} + 250 \text{ Fe}$ ، $100 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 1000 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $1000 \text{ Fe} + 100 \text{ Cu}$) به روش افشانه برگی تیمار شدند (شکل ۱).

جهت تیمار گیاهان، ابتدا غلظت‌های مورد نیاز از نانو ذرات تهیه شد. به منظور جلوگیری از ته‌نشین شدن و پایداری نانو ذرات، از Tween 80 استفاده شد. جهت حل نمودن نانو ذرات درون آب مقطر از دستگاه اولتراسونیک با توان ۱۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز استفاده شد. جهت جلوگیری از نفوذ مواد نانو به خاک، سطوح گلدان‌ها با فویل پوشانیده و بر سطح برگ‌ها افشانه شد. ۱۵ روز پس از اعمال تیمارها، گیاهان جمع‌آوری شده و بخشی از آن‌ها در آن در دمای 45°C به مدت ۲۴ ساعت خشک و بخش دیگر، در فریزر 70°C جهت انجام سنجش‌ها نگهداری شدند.

دو بار آبیاری شدند. با بزرگ شدن گیاهان نیاز آبی آن‌ها افزایش یافته و هر دو روز یکبار گیاهان آبیاری شدند. پس از اینکه گیاهان به سن ۹۰ روز رسیدند، با غلظت‌های 25 Cu ppm ، 50 Cu ppm ، 100 Cu ppm ، 250 Fe ppm ، 500 Fe ppm و ترکیبی از هر دو ($25 \text{ Cu} + 250 \text{ Fe}$)، $25 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 250 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $100 \text{ Cu} + 250 \text{ Fe}$ ، $100 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 1000 \text{ Fe}$ ، $50 \text{ Cu} + 500 \text{ Fe}$ ، $1000 \text{ Fe} + 100 \text{ Cu}$) به روش افشانه برگی تیمار شدند (شکل ۱).

جهت تیمار گیاهان، ابتدا غلظت‌های مورد نیاز از نانو ذرات تهیه شد. به منظور جلوگیری از ته‌نشین شدن و پایداری نانو ذرات، از Tween 80 استفاده شد. جهت حل نمودن نانو ذرات درون آب مقطر از دستگاه اولتراسونیک با توان ۱۰۰ وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز استفاده شد. جهت جلوگیری از نفوذ مواد نانو به خاک، سطوح گلدان‌ها با فویل پوشانیده و بر سطح برگ‌ها افشانه شد. ۱۵ روز پس از اعمال تیمارها، گیاهان جمع‌آوری شده و بخشی از آن‌ها در آن در دمای 45°C به مدت ۲۴ ساعت خشک و بخش دیگر، در فریزر 70°C جهت انجام سنجش‌ها نگهداری شدند.

تأیید جذب نانو ذرات به گیاهچه‌های تیمار شده: جهت تأیید جذب نانو ذرات آهن و مس از عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) (Model Philips EM 208S) (انستیتو پاستور تهران، ایران) استفاده شد. از برگ‌های تیمار شده، قطعاتی در اندازه‌های 1×1 سانتی‌متری تهیه و در محلول تثبیت‌کننده (بافر فسفات گلیسرآلدهید ۳ درصد با

انجام شد (Moazzami Farida et al., 2020).

سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقدار 0.5 گرم از بافت تازه برگ‌ها در حجم 15 میلی‌لیتر استون 80 درصد در هاون چینی سائیده شد. همگنای به دست آمده با سرعت 600 دور در دقیقه (rpm) و به مدت 10 دقیقه با سانتریفیوژ مدل Tixelle سانتریفیوژ شدند. روش‌ناور جدا شده و جذب آن در طول موج‌های 663 ، 645 و 470 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان خوانده شد. سپس با توجه به فرمول زیر مقدار هر کدام از رنگیزه‌ها محاسبه شد (Lichthentaler, 1987).

$$\text{Chl a (mgg}^{-1}\text{FW)} = [(11.75 \times A_{663}) - (2.35 \times A_{645})] \times V/1000W$$

$$\text{Chl b (mgg}^{-1}\text{FW)} = [(18.61 \times A_{645}) - (3.96 \times A_{663})] \times V/1000W$$

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

سانتریفیوژ شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از روشناور هر یک از نمونه‌ها بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=۷ به مقدار ۱ میلی‌لیتر و یدید پتاسیم یک مولار به اندازه ۲ میلی‌لیتر اضافه شد و در نهایت جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان خوانده شد. 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: جهت آماده‌سازی معرف پرولین نین‌هیدرین به مقدار ۱/۲۵ گرم به همراه ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار در دمای 40°C مخلوط شدند. تمامی مراحل در زیر هود انجام شد. این معرف به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C پایدار است. سپس 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 صاف‌شده هر نمونه، ۲ میلی‌لیتر معرف پرولین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط و در بن‌ماری در دمای 100°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 شد. 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 خوانده و مقدار پرولین بر حسب $\mu\text{g/g FW}$ گزارش شد (Bates et al., 1973).

سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها: برای آماده‌سازی عصاره مقدار ۲ گرم از برگ‌های تازه به همراه ۳ میلی‌لیتر از اتانول ۷۰ درصد بخوبی سائیده و یک شب خیس‌اندازه شد. پس از سانتریفیوژ عصاره بدست آمده برای سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت (Heimler et al., 2009). در ادامه جهت سنجش ترکیبات فنلی مقدار ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره، ۲۵ میکرولیتر از معرف فولین-سیوکالتو و

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

سنجش محتوای آنتوسیانین کل: مقدار ۱ گرم بافت تازه برگی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (حاوی ۱۰۰% HCl ml +۱ ۹۹ ml متانول) به خوبی سائیده و به مدت ۲۴ ساعت خیس‌اندازه شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و جذب هر یک از نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول موج ۵۱۱ نانومتر خوانده شد (Hara et al., 2003).

سنجش محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA): جهت بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون دی‌آلدئید در واکنش با تیوباربتوریک اسید سنجش شد. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت تازه برگی در محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱ درصد (TCA) به حجم ۵ میلی‌لیتر در هاون سائیده شدند. همگنای بدست آمده با سرعت ۱۰۰۰ g (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 تیوباربتوریک اسید اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۰/۵ ساعت در بن‌ماری با دمای 95°C قرار گرفت. بعد از این زمان به حمام یخ منتقل شد. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰ g (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 خوانده شدند. مقدار مالون دی‌آلدئید با ضریب خاموشی $0.155 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{M/gFW}$) و براساس فرمول $A = \epsilon bc$ گزارش شد که در این فرمول A جذب خوانده شده، ϵ ضریب خاموشی، b عرض کووت ۱ cm و c غلظت کمپلکس است (Heath and Paker, 1968).

محتوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2): جهت بررسی محتوای پراکسید هیدروژن ۰/۴ گرم بافت تازه برگی در حمام یخ با ۴ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه

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 نمونه ها به این صورت است که نمونه ها در دمای °C ۴۵ به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک شدند. به ۰/۲ گرم از هر یک از نمونه های پودر شده، ۵۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد اضافه و در آن حل و با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شدند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه جهت تعیین مقدار رزمارینیک اسید به دستگاه تزریق شد.

بررسی کمی رزمارینیک اسید در نمونه ها توسط Knauer مجهز به ستون Eclipse- XBD- C18 (25cm×4.6cm×5cm) در دمای °C ۲۰±۱ 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 v/v/v) (۱:۴۰:۵۹). همچنین برنامه شستشو به شرح زیر است:

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

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

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده ها، از نرم افزار SPSS19 و جهت مقایسه میانگین داده ها، از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. همبستگی ساده (r) بین صفات از روش پیرسون برآورد شد.

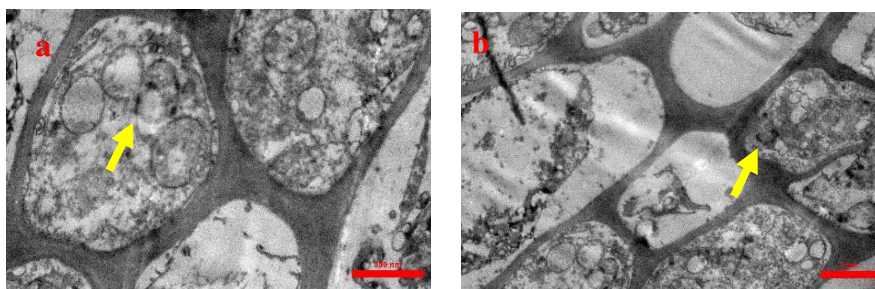
نتایج

جذب بررسی میکروسکوپی: شکل ۲ عکس های

۰/۵ میلی لیتر آب مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. بعد از ۶ دقیقه به نمونه ها مقدار ۱/۲۵ میلی لیتر سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و با آب مقطر حجم نمونه ها به ۳ میلی لیتر رسید. نمونه ها به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب آن ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان خوانده شد. 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). برای سنجش میزان فلاونوئید کل مقدار ۰/۲۵ میلی لیتر از عصاره، ۷۵ میکرولیتر محلول سدیم نترات ۵ درصد، ۷۵ میکرولیتر آمونیوم کلراید ۱۰ درصد تازه و ۰/۵ میکرولیتر 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 نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار خطی حاصل از منحنی استاندارد کوئرستین میزان فلاونوئید کل موجود در هر یک از نمونه ها به صورت میلی گرم در کوئرستین در گرم وزن تر محاسبه شد (Heimler *et al.*, 2009).

سنجش محتوای فعالیت آنتی اکسیدانی با آزمون (DPPH): مقدار ۱ گرم از بافت تازه برگ با ۱ میلی لیتر از اتانول ۹۰ درصد بخوبی سائیده شد. از هر یک از نمونه ها غلظت های (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ μgml^{-1}) تهیه شد و به هر یک از نمونه ها 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 نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی جذب آن ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (Brand- Williams *et al.*, 1995).

سنجش مقدار رزمارینیک اسید به روش HPLC: برای آماده سازی استاندارد رزمارینیک اسید ابتدا ۲۰ میلی گرم



شکل ۲- نمایش نفوذ نانو ذرات به درون بافت‌ها، a: تصویر نفوذ نانو ذره آهن به درون بافت برگ گیاه بادرشبی، b: تصویر نفوذ نانو ذره مس به درون بافت برگ گیاه بادرشبی توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

شده و یا اینکه گونه‌های فعال اکسیژن را جاروب نموده و اثرات منفی آن‌ها را کاهش دهند (Collini, 2019).
براساس یافته‌های این پژوهش تیمار گیاه بادرشبی با نانو ذرات مس و آهن به صورت مجزا و ترکیبی منجر به افزایش معنی‌دار در مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها شد. نانو ذرات مس با غلظت ۱۰۰ ppm و نانو ذرات آهن با غلظت ۱۰۰۰ ppm اثر بیشتری بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی داشتند و نانو ذرات آهن نسبت به نانو ذرات مس مؤثرتر بودند. استفاده از تیمار ترکیبی نانو ذرات در غلظت $1000 \text{ Fe} + 100 \text{ Cu}$ با افزایش قابل‌ملاحظه در محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی همراه بود. همین وضعیت در بررسی محتوای آنتوسیانین کل مشاهده شد.

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که در سطح احتمال یک درصد، تفاوت بسیار معنی‌داری بین تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها وجود داشت ($P \leq 0.01$). در برگ‌های تیمار شده با مقادیر مختلف نانو ذرات آهن و مس، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات 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 نانو ذرات 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 نانو ذرات آهن و مس

میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission Electron Microscopy: TEM) را نشان می‌دهد که نفوذ نانو ذرات آهن و مس به درون بافت‌های برگ گیاه بادرشبی را تأیید می‌کند. رنگیزه‌های فتوسنتزی: کمبود 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 تشکیل‌دهنده پلاستوسیانین است که از کمپلکس‌های کلروپلاست است و کمبود آن می‌تواند باعث کاهش میزان کلروفیل شود (Wang et al., 2023).

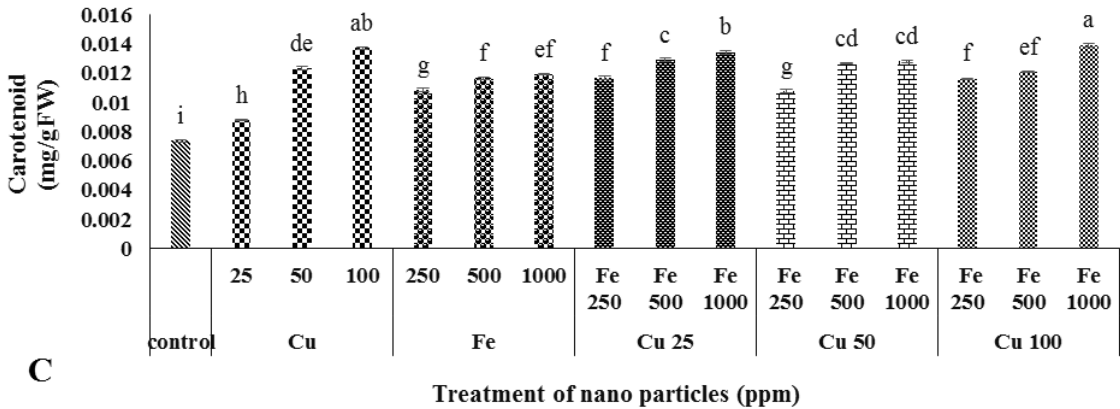
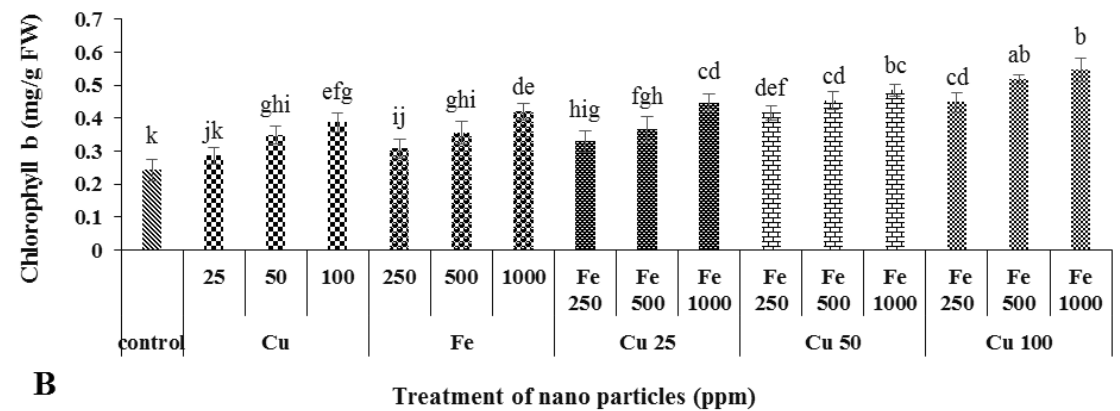
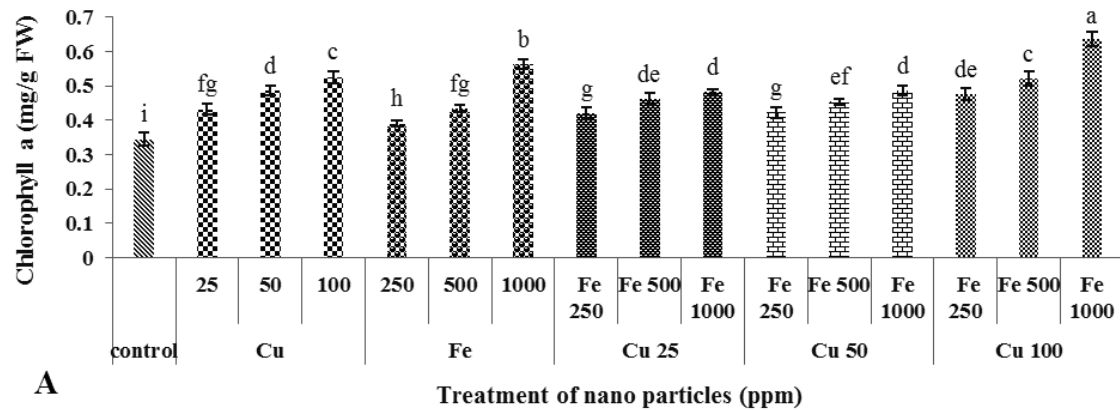
کاروتنوئید یک ترکیب تتراترپنی بوده که از کلروفیل در مقابل اکسیداسیون نوری محافظت کرده و همچنین وظیفه جذب نور و انتقال انرژی را به صورت رزونانس به کلروفیل مرکز فتوسیستم‌های I و II دارد. همچنین کاروتنوئیدها حاوی رنگیزه‌های غیرفتوسنتزی بوده که انرژی اضافی طول‌موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن یکتا را تبدیل 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 هستند که یکی از این ساز و کارها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌هایی همانند کاروتنوئیدها است که باعث می‌شود سلول‌ها مانع تولید گونه‌های فعال اکسیژن

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

میانگین مربعات			درجه	منابع تغییر
کاروتنوئید	کلروفیل b	کلروفیل a	آزادی	
۰/۰۸۷**	۰/۰۹۷**	۰/۰۴۴**	۱۵	غلظت
۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۳۳	۳۲	خطا
			۴۷	کل
۵/۶۸	۴/۷۵	۵/۰۰		ضریب تغییرات (%)

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



شکل ۳- محتوای کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B) و کاروتنوئیدها (C) در گیاهچه‌های بادرشبی تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

کل در مقایسه با شاهد افزایش یافت. بیشترین محتوای آنتوسیانین در تیمار مجزای نانو ذرات در غلظت‌های ppm ۱۰۰ 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 ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + غلظت ppm ۱۰۰ نانو ذرات 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 هشت برگگی با غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm از نانو ذرات اکسید آهن با غلظت ppm ۹۰ بدست آمد (Moradbeygi et al., 2020). به گزارش Nekoukhou و همکاران (۲۰۲۳) بیشترین مقدار آنتوسیانین در گیاه بادرشبی ۷۴ روزه تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۴۰۰ mg/l نانو ذرات اکسید مس با غلظت ppm ۸۰ بدست آمد (Nekoukhou et al., 2023). گیاه ریحان در مرحله شش تا هشت برگگی با غلظت‌های (صفر، ۱، ۵ و ۱۰ ppm) با نانو ذرات مس تیمار شدند که بیشترین مقدار آنتوسیانین با غلظت ppm ۵ از نانو ذرات مس بدست آمد (یوسف‌زایی، ۱۳۹۶).

محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و پرولین: برای تخمین مقدار تنش‌های اکسیداتیو، محتوای MDA و H₂O₂ 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 به صورت مجزا به ویژه در غلظت‌های نانو مس با غلظت ppm ۱۰۰ و نانو ذرات آهن با غلظت ppm ۱۰۰۰ منجر به افزایش معنی‌دار در مقدار MDA و H₂O₂ شدند. نانو ذرات آهن تأثیر بیشتری بر افزایش MDA و H₂O₂ نشان دادند. در تیمار نانو ذرات مس و آهن به صورت ترکیبی افزایش مقدار MDA و H₂O₂ با غلظت Fe ۱۰۰۰ + Cu ۱۰۰ به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود.

تنش‌ها باعث پراکسیداسیون بسیار شدید لیپیدها به واسطه

(ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + ppm ۱۰۰ نانو ذرات 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 C و B و A).

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum L.*) در مرحله شش تا هشت برگگی با غلظت‌های صفر، ۱، ۵ و ۱۰ ppm با نانو ذرات مس تیمار شدند که بالاترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی زمانی مشاهده شد که نمونه‌ها با غلظت ppm ۵ تیمار شده بودند (یوسف‌زایی، ۱۳۹۶). گیاه بادرشبی ۷۴ روزه با غلظت‌های صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۴۰۰ mg/l از نانو ذرات اکسید مس تیمار شدند که بالاترین مقدار کلروفیل a و کلروفیل b در غلظت ppm ۸۰ نسبت به شاهد به ترتیب ۶۶ و ۱۲۳ درصد افزایش یافت (Nekoukhou et al., 2023). در پژوهشی دیگر، گیاه بادرشبی ۶۰ روزه با غلظت‌های صفر، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن تیمار شدند. بالاترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی زمانی مشاهده شد که از غلظت ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن استفاده شده بود (Yousefzadeh and Sabaghnia, 2016) که مشابه نتایج بدست آمده از پژوهش ما بود.

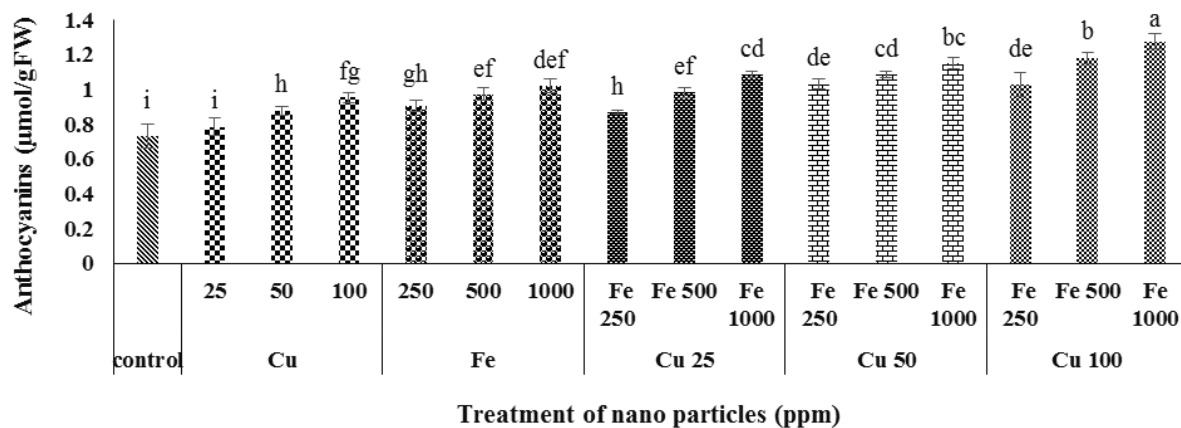
آنتوسیانین کل: در تنش‌های زیستی و غیرزیستی، مقدار گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان به شدت افزایش می‌یابد و آسیب‌های جدی به گیاهان وارد می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند به عنوان مولکول‌های علامت‌دهنده عمل نموده و منجر به فعال‌شدن سازوکارهای تحمل به تنش در گیاهان شوند. یکی از این سازوکارها، رونویسی 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 (جدول ۲) 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

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

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

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



شکل ۴- محتوای آنتوسیانین موجود در برگ بادرشبی تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

گیاهان با نانو ذرات مس و آهن به صورت 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 به صورت ترکیبی و در غلظت ۱۰۰ Cu + ۱۰۰۰ Fe پرولین افزایش زیادی نشان داد.

انباشته شدن مواد محلول سازگار، باعث حفظ تعادل اسمزی می شود (Bhutto et al., 2023). پرولین یک نوع آمینواسید ضد تنش است. در گیاهان در معرض تنش، اسمولیت‌هایی همانند پرولین تولید می شوند که منجر به جاروب شدن رادیکال هیدروکسیل و ROS می شوند. پرولین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده و گونه‌های فعال اکسیژن را حذف نموده و منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو می شود (Haghpavar et al., 2022). بنابراین پرولین نقش دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات آهن و مس افزایش می یابد.

پرولین در گیاهان در معرض تنش باعث تنظیم رشد آن‌ها

برداشتن اتم هیدروژن توسط گونه‌های فعال اکسیژن از اسیدهای چرب اشباع نشده، موجب ایجاد رادیکال‌های لیپیدی می شوند (Engwa et al., 2022). پراکسید هیدروژن یکی از انواع اکسیژن واکنش گر بوده که موجب پراکسیداسیون لیپیدهای موجود در غشا و در نهایت منجر به مرگ سلولی می شوند (Engwa et al., 2022).

یون‌های آزاد مس می توانند با مولکول‌های آب وارد واکنش شده، رادیکال‌های هیدروکسیل را آزاد نمایند و بدین صورت موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می شوند (Rovetta et al., 2023). نتایج بررسی‌ها نشان می دهند که مس یک کاتالیزور قدرتمند برای تشکیل رادیکال‌های آزاد است و یون‌های مس می توانند 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 می شود و رادیکال هیدروکسیل‌های تولید شده از این طریق به غشای سلولی آسیب می رساند (Engwa et al., 2022).

تیمار گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) ۴۵ روزه با غلظت‌های ۲ و ۱ درصد از نانو ذرات آهن بیشترین مقدار پرولین با غلظت ۲ درصد از نانو ذرات آهن بدست آمد (Asle Mohammadi et al., 2021).

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 غیرزیستی 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 بیوستیزی 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 است (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 شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن (محمدپرست، ۱۳۹۳)، گیاه بادام‌زمینی (*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 به صورت مجزا منجر به افزایش معنی‌دار در مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد.

شده و اثرات منفی تنش را بازگردانده و به عنوان یک پروتئین محافظت‌کننده عمل می‌کند (Ghosh et al., 2022). پرولین مانع دهیدراته شدن آنزیم‌ها در برابر تنش می‌شود (Ghosh et al., 2022).

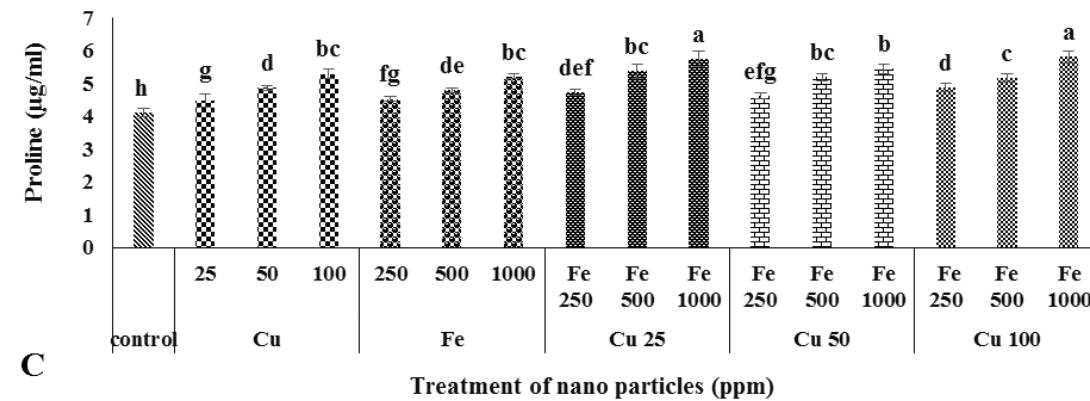
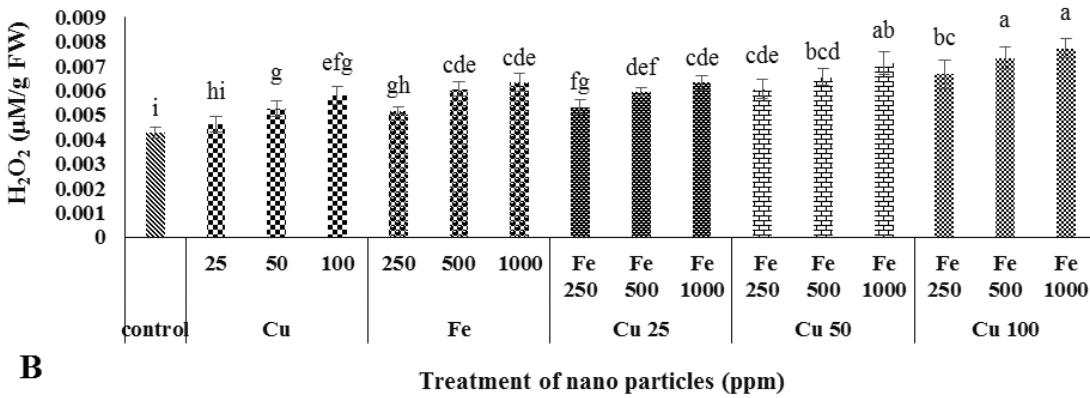
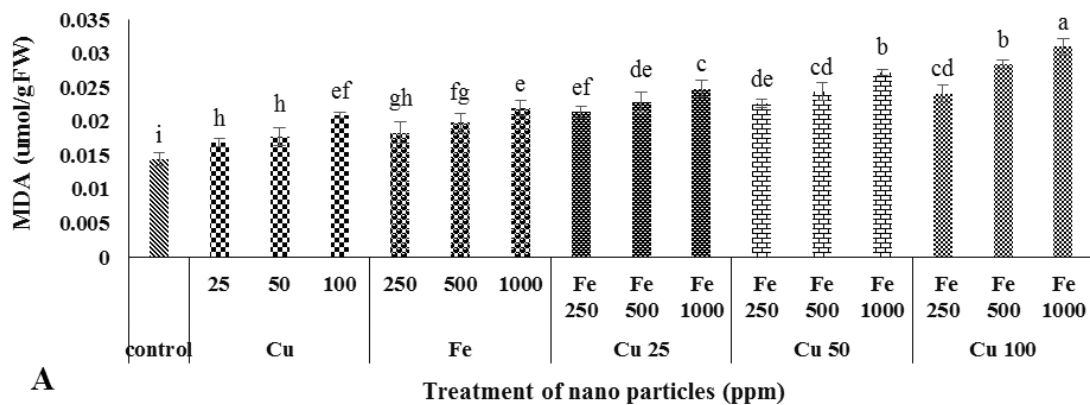
نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) داده‌ها نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر محتوای MDA، H_2O_2 و پرولین وجود داشت ($P \leq 0.01$). نتایج نشان داد در برگ‌های تیمار شده با مقادیر مختلف نانو ذرات آهن و مس، محتوای MDA، H_2O_2 و پرولین در 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 (شکل C و B و A).

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 هشت برگی با غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm از نانو ذرات اکسید آهن در غلظت ۹۰ 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 صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۴۰۰ mg/l از نانو اکسید مس بالاترین مقدار MDA و H_2O_2 در غلظت ۸۰ ppm بدست آمد (Nekoukhou et al., 2023). در تیمار گیاه بادرشبی ۶۰ روزه با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ ppm از نانو ذرات مس، بالاترین مقدار پرولین با غلظت ۵۰ ppm بدست آمد (Haddadian et al., 2018). در

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر میزان تغییرات MDA، H₂O₂ و پرولین در گیاه بادرشبی

میانگین مربعات			درجه	منابع تغییر
پرولین	H ₂ O ₂	MDA	آزادی	
۰/۴۳۱**	۰/۶۵۱**	۰/۹۷۸**	۱۵	غلظت
۰/۰۱۷	۰/۰۲۸	۰/۰۳۳	۳۲	خطا
			۴۷	کل
۶/۱۷	۷/۹۰	۸/۳۶		ضریب تغییرات (%)

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد

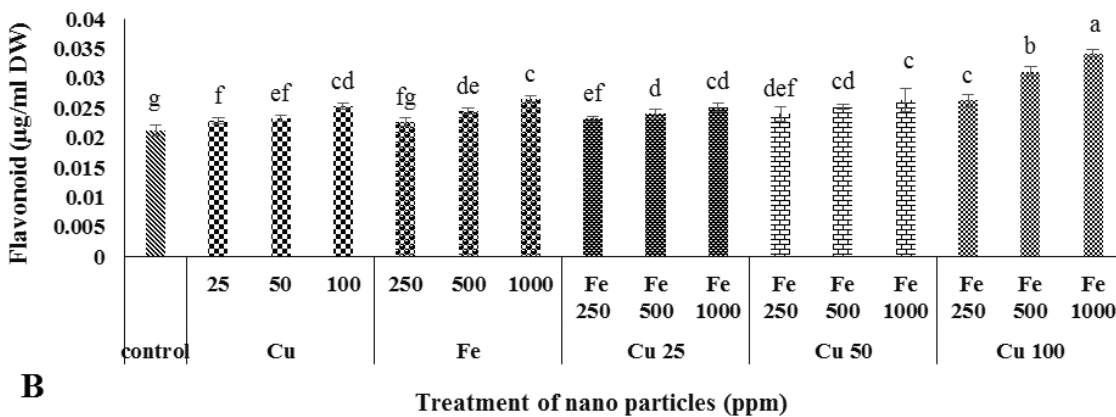
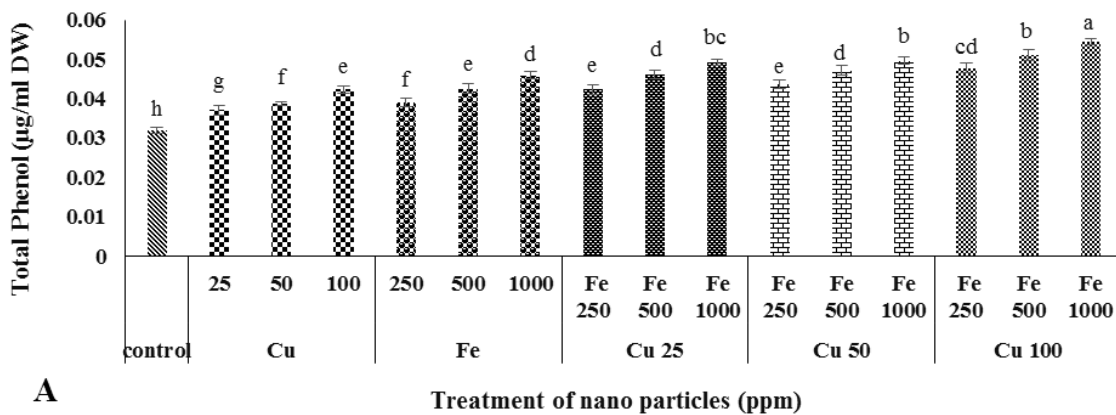


شکل ۵- محتوای MDA (A)، H₂O₂ (B) و پرولین (C) در گیاهچه‌های بادرشبی تیمار شده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر میزان تغییرات فلاونوئیدها در گیاه بادرشی

میانگین مربعات		درجه	منابع تغییر
فلاونوئیدها	ترکیبات فنلی	آزادی	
۰/۶۵۱**	۰/۹۷۸**	۱۵	غلظت
۰/۰۲۸	۰/۰۳۳	۳۲	خطا
		۴۷	کل
۸/۴۹	۹/۱۲		ضریب تغییرات (%)

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



شکل ۶- محتوای ترکیبات فنلی (A) و فلاونوئیدها (B) در گیاهچه‌های بادرشی تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

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

براساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، تفاوت بسیار معنی داری 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

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 هشت برگی با غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm 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 صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/l از نانو ذرات اکسید مس نشان داد که کمترین مقدار IC_{50} با غلظت ۱۰۰ ppm بدست آمد (Nazir et al., 2021).

رزمارینیک اسید: رزمارینیک اسید یکی از مهمترین و ارزش‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهان خانواده نعناع است که ارزش دارویی بسیار زیادی دارد (Kianersi et al., 2022). رزمارینیک اسید از مسیر فنیل پروپانوئید در گیاهان سنتز می‌شود (Ru et al., 2022).

تیروزین و فنیل آلانین دو سوبسترای مهم این مسیر بیوسنتزی را تشکیل می‌دهند. تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) و فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) دو آنزیم مهم در مسیر بیوسنتزی رزمارینیک اسید هستند. در انواع تنش‌ها مانند محرک‌ها، باکتری‌ها، اشعه UV، عناصر سنگین و غیره آنزیم PAL فعال شده و باعث بیش تولید ترکیبات فنلی می‌شود (Zhang et al., 2022).

زمانی که سلول‌های یک گیاه تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند تیمار با محرک‌ها قرار می‌گیرند، ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مانند WRKY (ژن دخیل در بیوسنتز آلکالوئیدها)، MYB (ژن دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها) و ERF (ژن دخیل در بیوسنتز اتیلن) بیان شده و منجر به فعال شدن آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Sun et al., 2020; Hao et al., 2020). استفاده از نانو ذرات نیز می‌تواند به‌طور چشمگیری منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه ارزشمند شود (Kruszka

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 (شکل B و ۶A).

بیشترین مقدار فلاونوئیدها در گیاه بادرشبی ۷۴ روزه تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۴۰۰ mg/l 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 هشت برگی با غلظت‌های (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) از نانو ذرات آهن زمانی بود که از غلظت ۹۰ ppm استفاده شده بود (Moradbeygi et al., 2020). بالاترین میزان فلاونوئیدها در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) ۳۰ روزه تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/l 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.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH): در تنش اکسیداتیو به

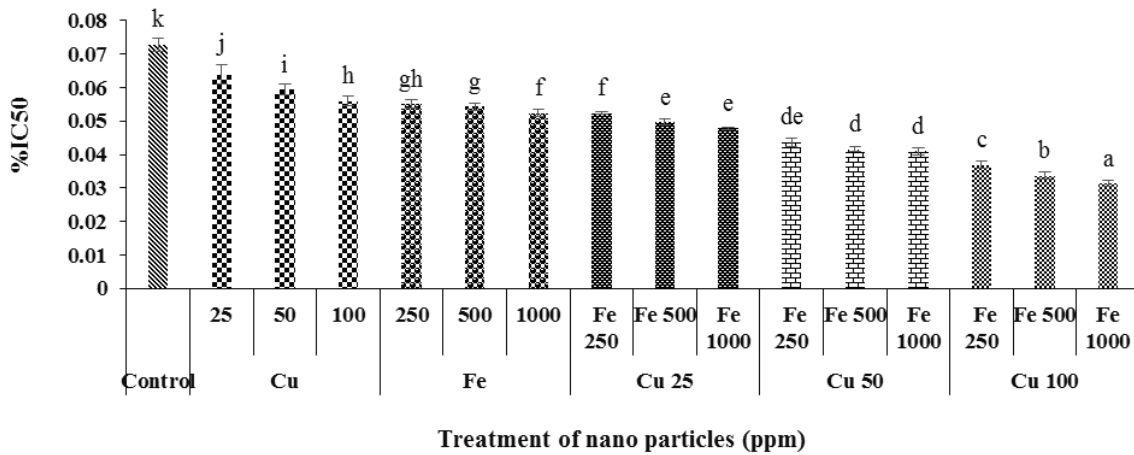
علت نبود تعادل بین رادیکال‌های آزاد تولید شده و واکنش‌های متابولیسمی باعث آسیب جدی به پروتئین‌ها، لیپیدها و نوکلئیک اسیدها می‌شود که این آسیب‌ها به علت کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها و یا بیش تولید رادیکال‌های آزاد است (Haji Rostamloo et al., 2019). نانو ذرات می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن را تولید نمایند 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 (جدول ۵) 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 نانو ذرات 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

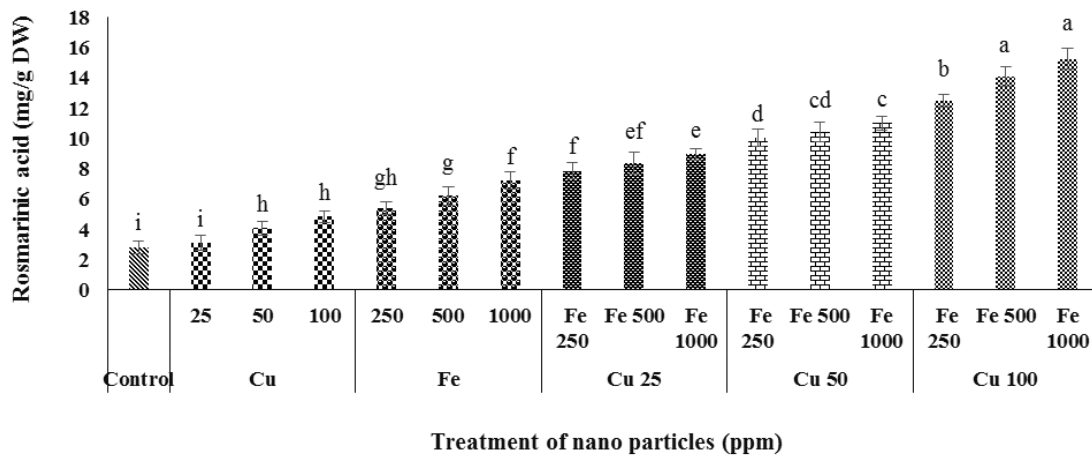
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر میزان تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رزمارینیک اسید در گیاه بادرشی

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

**تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



شکل ۷- میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهچه‌های بادرشی تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی



شکل ۸- محتوای رزمارینیک اسید موجود در گیاهچه‌های بادرشی تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

دچار تنش شده، درصد اسانس در آن‌ها افزایش می‌یابد زیرا در شرایط تنش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش یافته و

زمانی که گیاهان تحت تأثیر غلظت‌های بالای نانو ذرات

(et al., 2022).

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

ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	۱										
۲	۰/۷۱۸**	۱									
۳	۰/۷۱۶**	۰/۶۹۰**	۱								
۴	۰/۷۱۱**	۰/۹۰۵**	۰/۷۱۳**	۱							
۵	۰/۶۸۵**	۰/۹۱۸**	۰/۶۹۰**	۰/۹۲۵**	۱						
۶	۰/۷۰۵**	۰/۹۱۷**	۰/۶۸۱**	۰/۸۹۶**	۰/۹۰۱**	۱					
۷	۰/۷۷۳**	۰/۷۵۸**	۰/۸۵۲**	۰/۷۶۷**	۰/۷۸۱**	۰/۷۳۲**	۱				
۸	۰/۷۲۸**	۰/۹۲۳**	۰/۷۶۴**	۰/۹۲۹**	۰/۹۴۹**	۰/۹۲۶**	۰/۸۳۸**	۱			
۹	۰/۶۹۰**	۰/۶۵۰**	۰/۵۸۰**	۰/۷۰۳**	۰/۷۳۵**	۰/۶۹۲**	۰/۹۸۳**	۰/۷۶۱**	۱		
۱۰	-۰/۵۹۸**	-۰/۸۹۶**	-۰/۶۳۸**	-۰/۹۰۱**	-۰/۹۲۵**	-۰/۹۰۰**	-۰/۶۳۶**	-۰/۹۲۶**	-۰/۶۷۲**	۱	
۱۱	۰/۶۱۳**	۰/۸۷۱**	۰/۵۵۶**	۰/۸۷۵**	۰/۹۱۹**	۰/۸۹۶**	۰/۶۰۲**	۰/۹۰۰**	۰/۷۲۷**	-۰/۹۵۸**	۱

* نشان‌دهنده اختلاف بسیار معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

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

تأثیر نانو ذرات در افزایش مقدار رزمارینیک اسید توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. در گیاه ریحان ۴۵ روزه تیمار شده با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ ppm از نانو ذرات آهن بیشترین مقدار رزمارینیک اسید با غلظت ۰/۲ ppm بدست آمد (Tavallalia et al., 2020). در گیاه بادرشبی ۳۰ روزه تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ mg/l از نانو ذرات اکسید مس بالاترین سطح رزمارینیک اسید با غلظت ۵۰ mg/l بدست آمد (Riahi et al., 2018). در گیاه بادرشبی تیمار شده در مرحله هشت برگی با غلظت‌های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm از نانو ذرات آهن بالاترین مقدار رزمارینیک اسید زمانی بدست آمد که نمونه‌ها با غلظت ۹۰ ppm تیمار شدند (Moradbeygi et al., 2020).

همبستگی ساده بین صفات مختلف در گیاه دارویی بادرشبی: نتایج همبستگی بین رزمارینیک اسید گیاه دارویی بادرشبی با سایر صفات نشان داد که رزمارینیک اسید در سطح احتمال ۱ درصد با ترکیبات فنلی کل، محتوای مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن بیشترین همبستگی معنی‌دار و مثبت را

این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانت داشته و از عمل اکسیداسیون در سلول‌ها جلوگیری می‌نماید (Roy et al., 2022)، البته این پاسخ‌ها بسته به مقدار و نوع نانو ذرات می‌توانند نتایج متفاوتی داشته باشند (Nicolae - Maranciu et al., 2022).

بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری بین غلظت‌های 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 برگ‌های تیمار شده با نانو ذرات آهن و مس، مقدار رزمارینیک اسید افزایش یافت و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید در تیمار نمونه‌ها با نانو ذرات آهن و مس در غلظت‌های ۱۰۰ ppm نانو ذرات مس و ۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۷۷/۵ و ۱۲۰ درصد بیشتر بودند و بیشترین مقدار رزمارینیک اسید 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 ۴۶۵ درصد بیشتر بود (شکل ۸).

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. به غیر 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.

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 معنی‌دار 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 IC₅₀ همبستگی منفی بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با میزان رنگیزه‌های فتوستتزی، آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، پرولین و رزمارینیک اسید دارد که بیشترین همبستگی منفی معنی‌دار را با رزمارینیک اسید ($r = -0/958^{**}$) نشان داد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس با روش اسپری برگی، به صورت مجزا یا ترکیبی تأثیر متفاوتی بر میزان مقادیر رنگیزه‌های فتوستتزی، آنتوسیانین، MDA، H₂O₂، پرولین، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، DPPH و رزمارینیک اسید داشت. استفاده 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

منابع

- محمدپرست، بهروز و رسولی، موسی (۱۳۹۳). بررسی تأثیر برخی نانو کودها روی خصوصیات کمی و کیفی گیاه شیرین بیان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ملایر، همدان، ایران.
- یوسف‌زایی، فروغ (۱۳۹۶). بررسی تأثیر نانو ذرات مس و محلول کلرید مس بر جوانه‌زنی و برخی فاکتورهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.). 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>
- 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. *Pakistan Journal of Botany*, 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
- Ghosh, P. & Pal, H. (2023). Climate-Resilient Agriculture, Vol 2: Agro-Biotechnological Advancement for Crop Production. Cham: Springer International Publishing. 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.
- 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., Karimi, N., & Abbaspour, H. (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
- Haghpavar, F. R., Hashemabadi, D., & Kaviani, B. (2022). Effect of arginine, proline and glutamine amino acids on morphological and physiological traits of two African Marigold. *Journal of Ornamental Plants*, 12(3), 191-202.
- 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.
- Karimzadeh, F., Haddad, R., Garoosi, G., & Khademian, R. (2019). Effects of nanoparticles on activity of lignan biosynthesis enzymes in cell suspension culture of *Linum usitatissimum* L. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66, 756-762.
- 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*.

- 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., Jamei, R., Heidari, R., & Darvishzadeh, R. (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>
- Naghisarifi, 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
- 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>
- Pratyusha, S. (2022). Phenolic compounds in the plant development and defense. An overview. *Plant Stress Physiology-Perspectives in Agriculture*, 125-140.
- Reyes Jara, A. M., Gomez Lobato, M. E., Civello, P. M., & Martinez, 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, A., Nasiri Bezenjani, M., Rezaei, F., & Baghizadeh, A. (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., Ma, C., Hao, Y., Guo, J., Rui, Y., Tang, X., Zhao, Q., Fan, X., Zhang, Z., & Hou, T. (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., Kovacevic, 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
- 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*. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 1(2), 174-179.
- Simea, S., 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>
- Tavallali, V., Rowshan, V., Gholami, H., & Hojati, S. (2020). Iron-urea nano-complex improves bioactive compounds in essential oils of *Ocimum basilicum* L. *Scientia Horticulturae*, 265, 109222.

- <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 and Behavior*, 13(3), 1364-77. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1451708>
- Yousefzadeh, S. & Sabaghnia, N. (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.)

Nafise Varasteh Khanlari¹, Khadijeh Kiarostami*¹, Monir Hosseinzadeh Namin¹,
Mohammad Abdoli²

¹Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

²Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

(Received: 2023/11/16, Accepted: 2024/01/15)

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 (H₂O₂), 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, H₂O₂ 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 ($r = -0.958^{**}$).

Keywords: *Dracocephalum moldavica* L., Reactive oxygen species, Elicitor, Secondary metabolites, Transmission electron microscope

Corresponding author, Email: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir