فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۱۳، شماره ۶۰، خرداد و تیرماه ۱۴۰۳ صفحه: ۴۲۹-۴۴۸
https://doi.org/10.22034/13.60.429

مقاله پژوهشی

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

نفیسه وارسته خانلری[۱]، خدیجه کیارستمی[۱*]، منیر حسین‌زاده نمین[۱] و محمد عبدلی[۲]

[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، 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 برگی 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 دی‌آلدهید (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 نانوذرات 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= −۰/۹۵۸) وجود داشت.**

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

مقدمه

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.*, 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

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: kh.kiarostami@alzahra.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

سردرد استفاده می‌شود. بادرشبی دارای ترکیبات فنلی بسیاری مانند کافئیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، آپیجنین 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 دارابودن 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 (Twaij *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 تیمارشده با انواع 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 گونه‌های‌فعال‌اکسیژن (ROS)، فعال نمودن ژن‌های دخیل در دفاع، سنتز فیتواکسین‌ها، ایجاد تغییرات ساختاری در دیواره سلولی و همچنین افزایش جریانات 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).

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 ppm ۹۰ در گیاه بادرشبی (Moradbeygi *et al*., 2020)، و با ppm ۰/۲ 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، H_2O_2 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 آنزیم‌های کلیدی در مسیر فتوسنتز و زنجیره انتقال اکترون است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای گیاه دارویی بادرشبی از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) (http://www.Pakanbazr.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 کوددامی 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 ۲ ± ۲۵ °C و دوره نوری ۸/۱۶ روشنایی/ تاریکی منتقل شدند. گلدان‌ها تا پیش از سبزشدن بذرها، هفته‌ای یکبار آبیاری شده ولی پس از جوانه‌زدن بذرها، هفته‌ای

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]



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 بزرگ‌شدن 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 ۲۵ Cu ppm، ۵۰ Cu ppm، ۱۰۰ Cu ppm، ۲۵۰ Fe ppm، ۵۰۰ Fe ppm، ۱۰۰۰ Fe ppm و ترکیبی از هر دو (۲۵۰ Fe+ ۲۵ Cu، ۲۵۰ Fe+ ۵۰ Cu، ۲۵۰ Fe+ ۱۰۰ Cu، ۵۰۰ Fe+ ۲۵ Cu، ۵۰۰ Fe+ ۵۰ Cu، ۵۰۰ Fe+ ۱۰۰ Cu، ۱۰۰۰ Fe+ ۲۵ Cu، ۱۰۰۰ Fe+ ۵۰ Cu، ۱۰۰۰ Fe+ ۱۰۰ 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 ته‌نشین‌شدن و پایداری نانو ذرات، از Tween 80 استفاده شد. جهت حل‌نمودن نانو ذرات درون آب‌مقطر 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 آون در دمای ۴۵ °C به مدت ۲۴ ساعت خشک و بخش دیگر، در فریزر ۷۰- °C جهت انجام سنجش‌ها نگهداری شدند.

تایید جذب نانو ذرات به گیاهچه‌های تیمارشده: جهت تأیید جذب نانو ذرات آهن و مس از عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) (Model Philips EM 208S) (انیستیتو پاستور تهران، ایران) استفاده شد. از برگ‌های تیمارشده، قطعاتی در اندازه‌های ۱×۱ سانتی‌متری تهیه و در محلول تثبیت‌کننده (بافر فسفات گلیسرآلدهید ۳ درصد با pH=۷/۲) به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. نمونه‌ها توسط بافر فسفات شستشو و یک ساعت در تترااکسید اسیموم ۱ درصد تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در غلظت‌های (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۹۶ و ۱۰۰ درصد) اتانول قرار گرفته و سپس آبگیری شدند. نمونه‌ها دو بار به مدت ۱۵ دقیقه در استون ۱۰۰ درصد قرار گرفته و با رزین استون با نسبت‌های (۱:۳، ۳:۱ و ۱:۰) آغشته شدند. پس از این که رزین‌ها به درون نمونه‌ها نفوذ کردند با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم (RMC MT-7000, USA) از نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برش عرضی با ضخامت ۶۰ نانومتر تهیه شد. نمونه‌ها با محلول اورانیل استات و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ الکترونی با ولتاژ ۶۰ کیلو وات عکس‌برداری انجام شد (Moazzami Farida *et al.*, 2020).

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

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

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

$$\text{Car } (mgg^{-1}FW) = ((1000 \times A480) - (2.27 \times Chla) - (81.4 \times Chlb) / 227 \times V/1000W$$

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

W= وزن تر نمونه، V= حجم محلول صاف‌شده و A= جذب نور در طول‌موج‌ها

سنجش محتوای آنتوسیانین کل: مقدار ۱ گرم بافت تازه برگی در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (حاوی 100% ml HCl ۱+ ml ۹۹ متانول) به خوبی سائیده و به مدت ۲۴ ساعت خیسانده 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 طول‌موج ۵۱۱ نانومتر خوانده شد (Hara *et al.*, 2003).

سنجش محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA): جهت بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون دی‌آلدهید در واکنش با تیوباربیتوریک 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 g ۱۰۰۰ (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 تیوباربیتوریک اسید اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۰/۵ ساعت در بن‌ماری با دمای ۹۵ °C قرار گرفت. بعد از این زمان به حمام یخ منتقل شد. سپس نمونه‌ها با سرعت g ۱۰۰۰ (۴۰۰۰ rpm) و به مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان خوانده شدند. مقدار مالون دی‌آلدهید با ضریب خاموشی $cm^{-1}\mu M^{-1}$ ۰/۱۵۵ و براساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر (µM/gFw) و براساس فرمول $A=\varepsilon bc$ گزارش شد که در این فرمول A جذب خوانده شده، ε ضریب خاموشی، b عرض کووت cm ۱ 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 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 طول‌موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان خوانده شد. مقدار H_2O_2 موجود در هر یک از نمونه‌ها بر حسب $\mu mg^{-1}FW$ 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 ۴۰ °C مخلوط شدند. تمامی مراحل در زیر هود انجام شد. این معرف به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °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 ۱۰۰ °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 طول‌موج ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان خوانده و مقدار پرولین بر حسب µg/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 خیسانده 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

۰/۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر با یکدیگر مخلوط شدند. بعد از ۶ دقیقه به نمونه‌ها مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۷ درصد اضافه و با آب‌مقطر حجم نمونه‌ها به ۳ میلی‌لیتر رسید. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب آن‌ها در طول‌موج 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 میلی‌لیتر از عصاره، ۷۵ میکرولیتر محلول سدیم نیترات 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 آب‌مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانیده شدند. پس از ۵ دقیقه جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول‌موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد و با استفاده از نمودار خطی حاصل از منحنی استاندارد کوئرستین میزان فلاونوئید کل موجود در هر یک از نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم در کوئرستین در گرم وزن تر محاسبه شد (Heimler *et al*., 2009).

سنجش محتوای فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون (DPPH): مقدار ۱ گرم از بافت تازه برگی با ۱ میلی‌لیتر از اتانول ۹۰ درصد بخوبی سائیده شد. از هر یک از نمونه‌ها غلظت‌های (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ $\mu g ml^{-1}$) تهیه شد و به هر یک از نمونه‌ها مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۴۰ میکروگرم DPPH در میلی‌لیتر متانول) اضافه و حجم نهایی با استفاده از متانول به ۴ میلی‌لیتر رسانیده شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی جذب آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر CECLL مدل CE1021 ساخت کشور انگلستان در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (Brand- Williams *et al*., 1995).

سنجش مقدار رزمارینیک اسید به روش HPLC: **برای** آماده‌سازی استاندارد رزمارینیک اسید ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از استاندارد رزمارینیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد حل شد. ۲۰ میلی‌لیتر از این محلول با استفاده از اتانول ۵۰ درصد به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت با استفاده از فیلتر با قطر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. روش آماده‌سازی نمونه‌هابه این صورت است که نمونه‌ها در دمای ۴۵ °C به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک شدند. به ۰/۲ گرم از هر یک از نمونه‌های پودر شده، ۵۰ میلی‌لیتر 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 نمونه‌ها توسط Knauer مجهز به ستون Eclipse- XBD- C18 (25cm×4.6cm×5cm) در دمای ۲۰±۱ °C انجام پذیرفت.

سیستم حلال مورد استفاده در این مطالعه شامل حلال A (اسید فسفریک، استونیتیل، آب به نسبت ۱:۱۹:۸۰v/v/v) و حلال B (اسید فسفریک، متانول، استونیتریل به نسبت v/v/v ۱:۴۰:۵۹).همچنین برنامه شستشو به شرح زیر است:

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

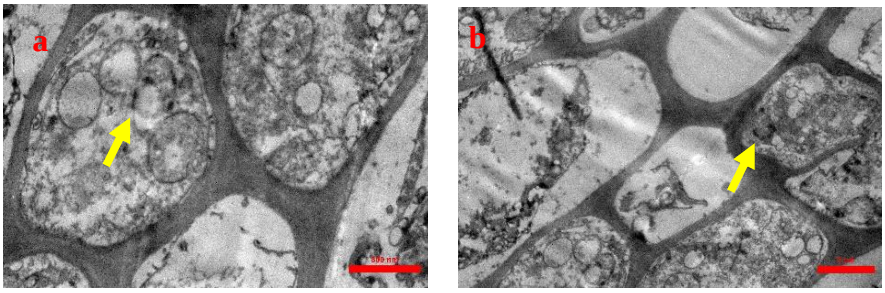
نرخ جریان مورد استفاده جهت شستشوی ستون $1\ ml.min^{-1}$ و حجم نمونه تزریق‌شده به دستگاه ۲۰ میکرولیتر است و پیک‌ها در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. رزمارینیک اسید در کروماتوگرام با تطبیق نمونه استاندارد شناسایی و رزمارینیک اسید موجود در هر نمونه با استفاده از منحنی کالیبراسیون کمی‌سازی شدند.

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

نتایج

جذب بررسی میکروسکوپی: شکل ۲ عکس‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]



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)

میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission Electron Microscopy: TEM) را نشان می‌دهد که نفوذ نانو ذرات آهن و مس به درون بافت‌های برگی 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 کلروزشدن 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 II و I 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 ایجادشده را گرفته و به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌نماید (Collini, 2019).

در طی تنش‌های زیستی و غیرزیستی میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند (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 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 ۱۰۰ Cu +۱۰۰۰Fe با افزایش قابل‌ملاحظه در محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی همراه بود. همین وضعیت در بررسی محتوای آنتوسیانین کل مشاهده شد.

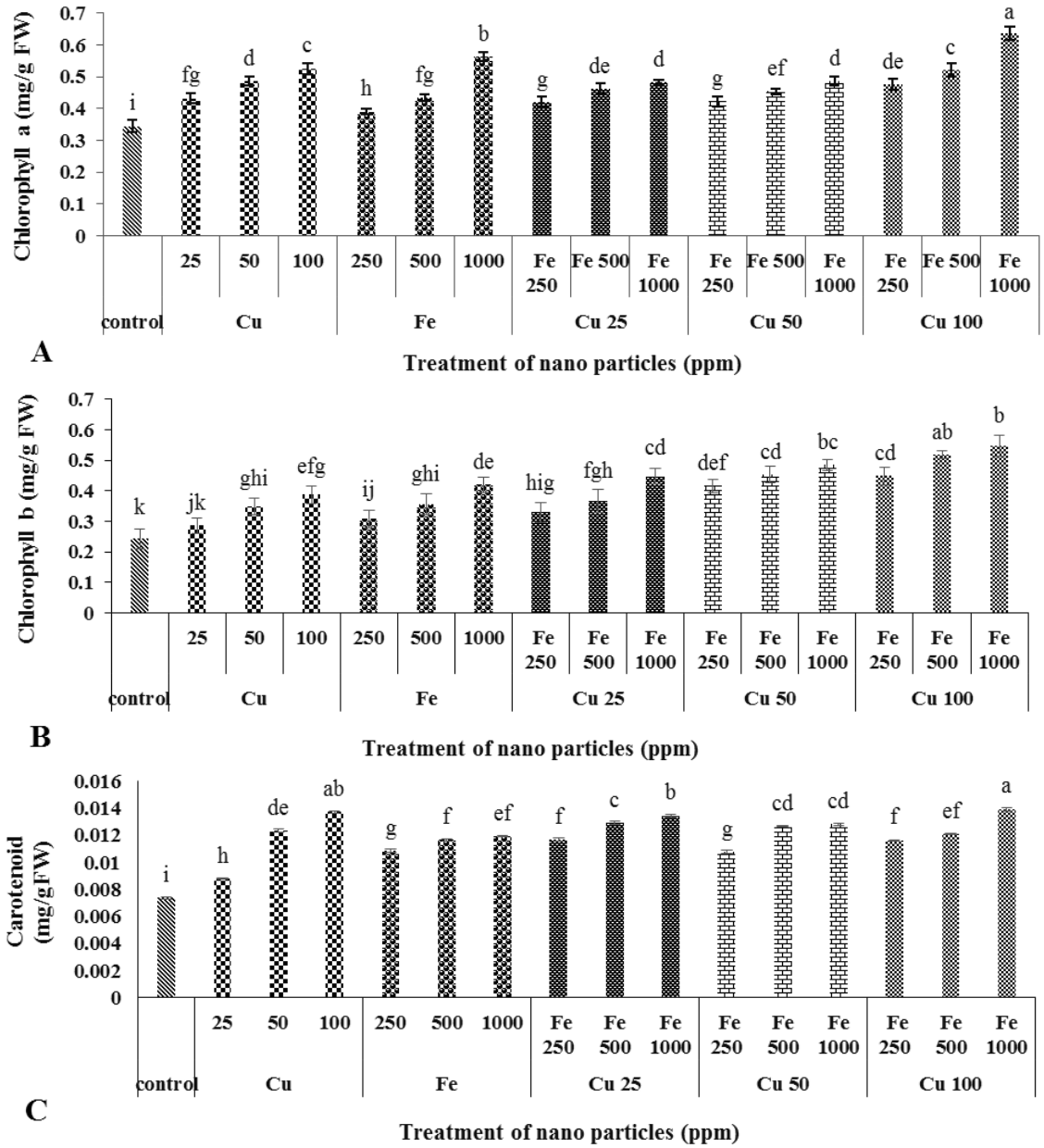
تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که در سطح احتمال یک درصد، تفاوت بسیار معنی‌داری بین تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها وجود داشت ($P\leq0.01$). در برگ‌های تیمارشده با مقادیر مختلف نانو ذرات آهن و مس، محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت. در نمونه‌های تیمارشده 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 تیمارشده با غلظت ppm ۱۰۰ 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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

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

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

(۱۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن + ۱۰۰ ppm 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 3A, B).

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در مرحله شش تا هشت برگی 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 ۵ ppm 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 ۸۰ ppm نسبت به شاهد به ترتیب ۶۶ و ۱۲۳ درصد افزایش یافت (Nekoukhou *et al*., 2023). در پژوهشی دیگر، گیاه بادرشبی ۶۰ روزه با غلظت‌های صفر، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ ppm نانو ذرات آهن تیمار شدند. بالاترین مقدار رنگیزه-های فتوسنتزی زمانی مشاهده شد که از غلظت ۱۰۰۰ ppm 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 بیوسنتز 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 غلظت های مختلف نانو ذرات آهن و مس از نظر تأثیر بر محتوای آنتوسیانین کل وجود داشت ($P\leq0.01$). در برگ‌های تیمارشده با مقادیر مختلف نانو ذرات آهن و مس، محتوای آنتوسیانین کل در مقایسه با شاهد افزایش یافت. بیشترین محتوای آنتوسیانین در تیمار مجزای نانو ذرات در غلظت‌های ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس و ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن بدست آمد که در مقایسه با شاهد به ترتیب ۳۰/۱ و ۳۹/۷ درصد بیشتر بودند. بالاترین مقدار آنتوسیانین در نمونه‌های تیمارشده 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 تیمارشده در مرحله هشت برگی 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 تیمارشده 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 برگی با غلظت‌های (صفر، ۱، ۵ و ۱۰ ppm) با نانو ذرات مس تیمار شدند که بیشترین مقدار آنتوسیانین با غلظت ۵ ppm از نانو ذرات مس بدست آمد (یوسف‌زایی، ۱۳۹۶).

محتوای مالون دی‌آلدهید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و پرولین: برای تخمین مقدار تنش‌های اکسیداتیو، محتوای MDA و H_2O_2 بافت به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید و مقدار آسیب اکسیداتیو گیاهان در معرض تنش بررسی می‌شود (Naghisharifi *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 H_2O_2 شدند. نانو ذرات آهن تأثیر بیشتری بر افزایش MDA و H_2O_2 نشان دادند. در تیمار نانو ذرات مس و آهن به صورت ترکیبی افزایش مقدار MDA و H_2O_2 با غلظت Fe ۱۰۰۰ + Cu ۱۰۰ به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بود.

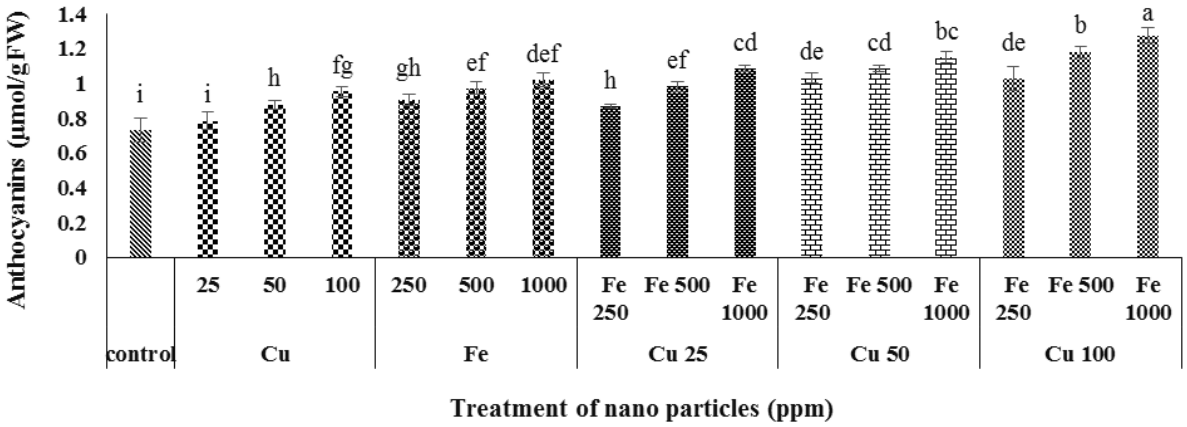
تنش‌ها باعث پراکسیداسیون بسیار شدید لیپیدها به واسطه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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 تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

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

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

گیاهان با نانو ذرات مس و آهن به صورت مجزا به ویژه با نانو مس با غلظت ppm ۱۰۰ و نانو آهن با غلظت ppm ۱۰۰۰، منجر به افزایش معنی‌دار 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.

انباشته‌شدن مواد محلول سازگار، باعث حفظ تعادل اسمزی می‌شود (Bhutto *et al.*, 2023). پرولین یک نوع آمینواسید ضدتنش است. در گیاهان در معرض تنش، اسمولیت‌هایی همانند پرولین تولید می‌شوند که منجر به جاروب‌شدن رادیکال هیدروکسیل و ROSها می‌شوند. پرولین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده و گونه‌های فعال اکسیژن را حذف نموده و منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود (Haghparvar *et al.*, 2022). بنابراین پرولین نقش دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو داشته و با افزایش غلظت نانو ذرات آهن و مس افزایش می‌یابد.

پرولین در گیاهان در معرض تنش باعث تنظیم رشد آن‌ها

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

شده و اثرات منفی تنش را بازگردانده و به عنوان یک پروتئین محافظت‌کننده عمل می‌کند (Ghosh *et al*., 2022). پرولین مانع دهیدراته‌شدن 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 ($P\leq0.01$). نتایج نشان داد در برگ‌های تیمارشده 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 ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس و ppm ۱۰۰۰ 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 ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس، مقادیر این ترکیبات افزایش بیشتری نشان داد، به‌طوری‌که افزایش ۱۱۴ درصد برای MDA، ۸۰/۹ درصد برای H_2O_2 و ۴۳/۵ درصد برای پرولین مشاهده شد (شکل 5A, B و C).

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 و۹۰ ppm از نانو ذرات اکسید آهن در غلظت ppm ۹۰ بالاترین مقدار MDA و H_2O_2 بدست آمد (Moradbeygi *et al*., 2020). در پژوهش دیگر گیاه بادرشبی ۷۴ روزه تیمارشده با غلظت‌های صفر، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۴۰۰ mg/l از نانو اکسید مس بالاترین مقدار MDA و H_2O_2 در غلظت ppm ۸۰ بدست آمد (Nekoukhou *et al*., 2023). در تیمار گیاه بادرشبی ۶۰ روزه با غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ ppm از نانوذرات مس، بالاترین مقدار پرولین با غلظت ppm ۵۰ بدست آمد (Haddadian *et al*., 2018). در 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 آمونیالیاز (PAL) افزایش می‌یابد. مثلاً در گیاه کتان (*Linum usitatisimum*) تیمارشده با نانو ذرات اکسید روی (Karimzadeh *et al*., 2019) و مریم گلی باغی (*Salvia officinalis*) تیمارشده با نانو ذرات نقره (Moazzami *et al*., 2020) میزان آنزیم PAL افزایش یافت. آنزیم PAL یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها است. این ترکیبات از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که آنزیم PAL با عمل دآمیناسیون 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).

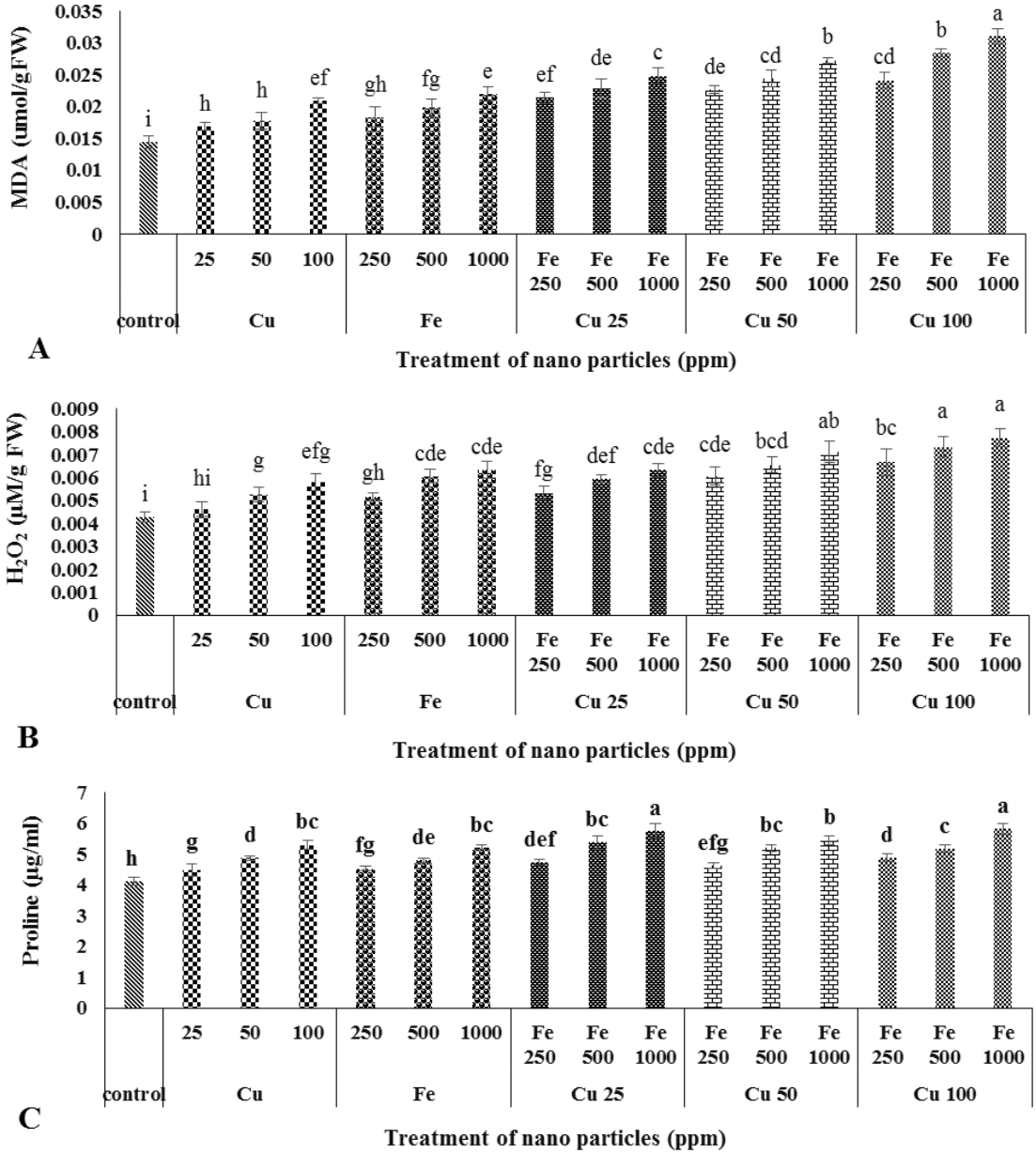
گزارش‌های چندی در مورد اثر نانو ذرات بر افزایش محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی وجود دارد. به عنوان مثال در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن (محمدپرست، ۱۳۹۳)، گیاه بادام‌زمینی (*Arachis hypogaea*) تیمارشده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن (Rui *et al*., 2016)، 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر میزان تغییرات MDA، H_2O_2 و پرولین در گیاه بادرشبی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		MDA	H_2O_2	پرولین
غلظت	۱۵	۰/۹۷۸**	۰/۶۵۱**	۰/۴۳۱**
خطا	۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۲۸	۰/۰۱۷
کل	۴۷			
ضریب تغییرات (٪)		۸/۳۶	۷/۹۰	۶/۱۷

** تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



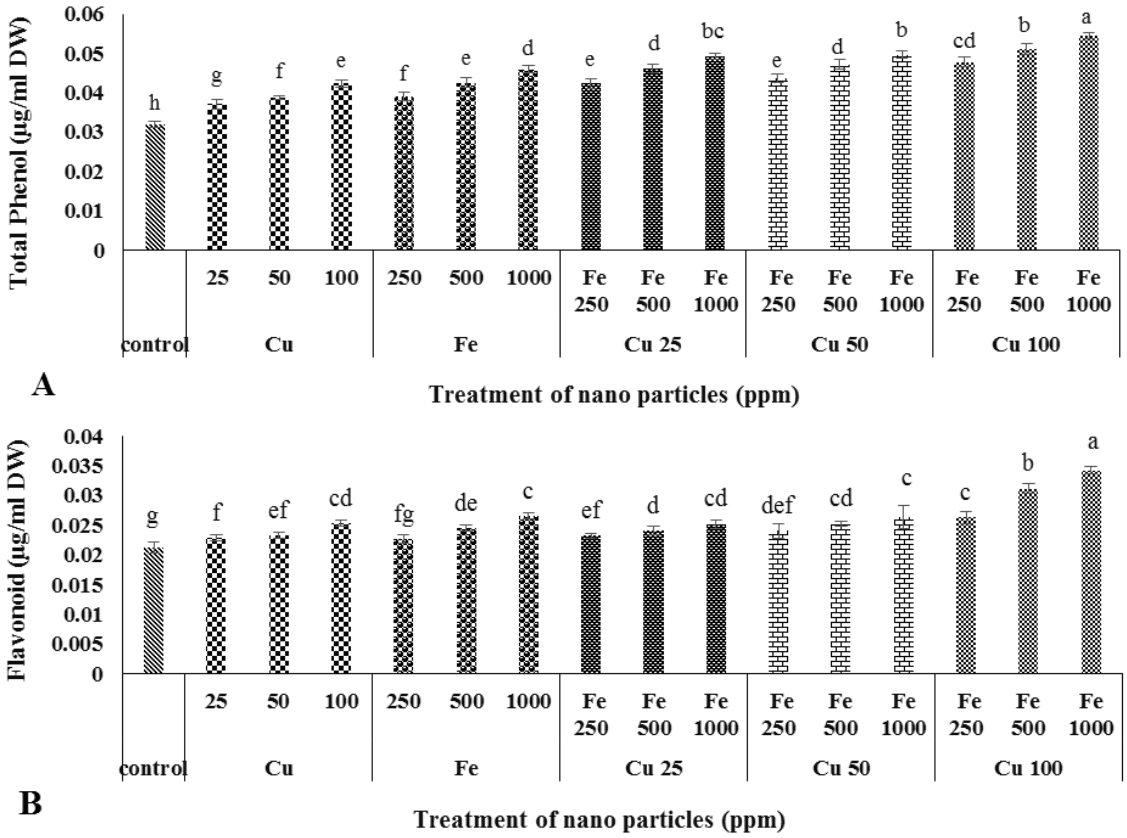
شکل ۵- محتوای MDA (A)، H_2O_2 (B) و پرولین (C) در گیاهچه‌های بادرشبی تیمارشده با نانوذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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

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

**تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



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

براساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۴)، تفاوت بسیار معنی‌داری بین تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی وجود داشت ($P\leq0.01$). نتایج نشان داد که در برگ‌های تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس در مقایسه با نمونه شاهد مقدارترکیبات فنلی و فلاونوئیدی افزایش یافت. بالاترین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی زمانی مشاهده شد که نمونه‌ها با ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس و ppm ۱۰۰۰ 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 تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس به صورت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

ترکیبی با غلظت ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + ppm ۱۰۰ 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 6A).

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 ppm ۸۰ بدست آمد (Nekoukhou *et al.*, 2023). بیشترین مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها در گیاه بادرشبی تیمارشده در مرحله هشت برگی با غلظت‌های (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ppm) از نانو ذرات آهن زمانی بود که از غلظت ppm ۹۰ استفاده شده بود (Moradbeygi *et al.*, 2020). بالاترین میزان فلاونوئیدها در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) ۳۰ روزه تیمارشده با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۲۰۰، ۵۰۰ ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ mg/l از نانو ذرات اکسید مس با غلظت ppm ۱۰۰۰ 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 تولیدشده 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 ($P\leq0.01$). در برگ‌های تیمارشده 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 ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس و ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن بدست آمد که نسبت به شاهد به ترتیب ۲۳/۶ و ۲۷/۷ درصد کاهش یافته بودند و کمترین مقدار IC_{50} در تیمار ترکیبی نانو ذرات آهن و مس با غلظت ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + ppm ۱۰۰ 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 IC50 با غلظت ppm ۳۰ 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 ppm ۱۰۰ بدست آمد (Nazir *et al.*, 2021).

رزمارینیک اسید: رزمارینیک اسید یکی از مهمترین و با 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 آمونیالیاز (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).

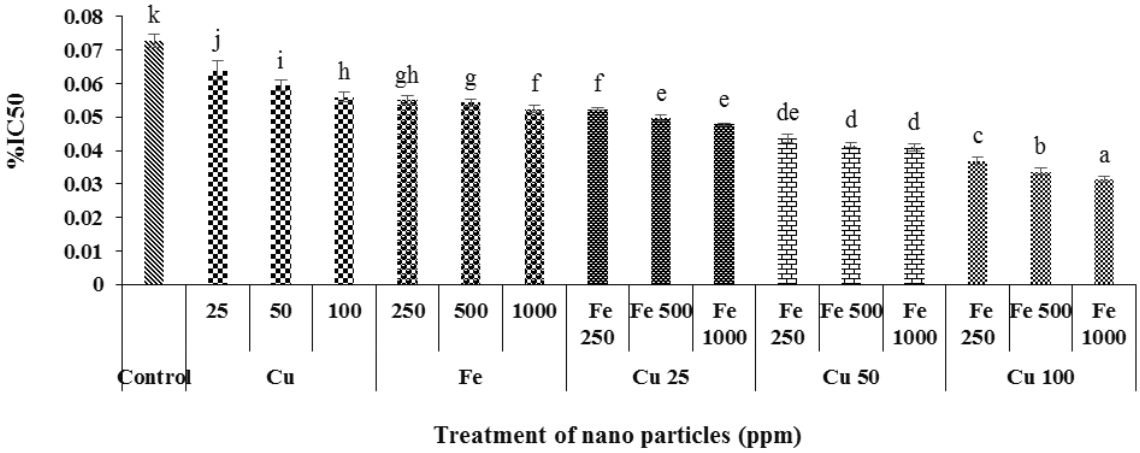
زمانی که سلول‌های یک گیاه تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند تیمار با محرک‌ها قرار می‌گیرند، ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مانند WRKY (ژن دخیل در بیوسنتز آلکالوئیدها)، MYB (ژن دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها) و ERF (ژن دخیل در بیوسنتز اتیلن) بیان شده و منجر به فعال‌شدن آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Hao *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2019). استفاده از نانو ذرات نیز می‌توانند به‌طور چشمگیری منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه ارزشمند شود (Kruszka

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

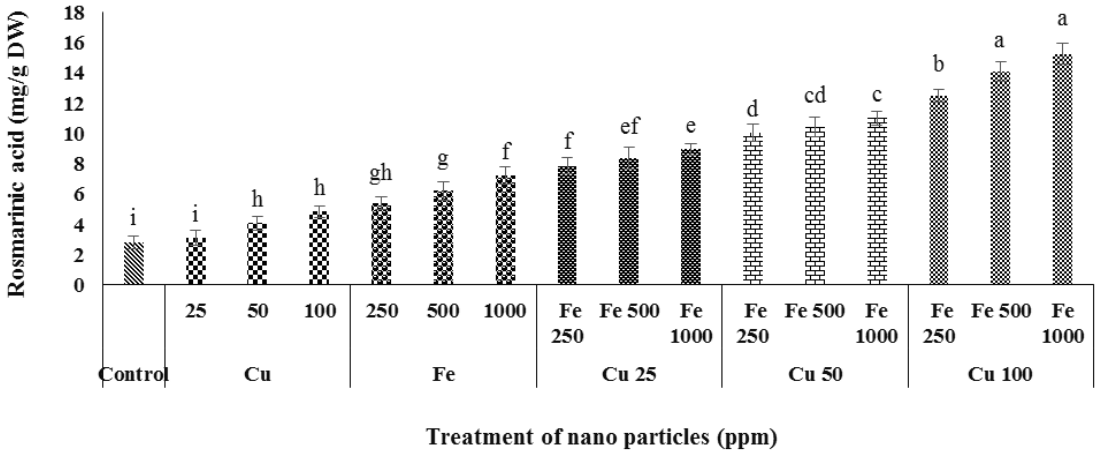
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات آهن و مس بر میزان تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رزمارینیک اسید در گیاه بادرشبی

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

**تفاوت معنی دار در سطح ۱ درصد



شکل ۷- میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهچه‌های بادرشبی تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی



شکل ۸- محتوای رزمارینیک اسید موجود در گیاهچه‌های بادرشبی تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس به صورت مجزا و ترکیبی

et al., 2022).

دچار تنش شده، درصد اسانس در آن‌ها افزایش می‌یابد زیرا در زمانی که گیاهان تحت تأثیر غلظت‌های بالای نانو ذرات شرایط تنش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش یافته و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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

صفات	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	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 دی‌آلدهید، ۶) پراکسید هیدروژن، ۷) پرولین، ۸) ترکیبات فنلی، ۹) فلاونوئیدها، ۱۰) IC50، ۱۱) رزمارینیک اسید

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 - Maranciuc *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 ($P\leq0.01$). علاوه‌براین نتایج نشان داد در برگ‌های تیمارشده 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 ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس و ppm ۱۰۰۰ 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 تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس به صورت ترکیبی با غلظت ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس بدست آمد که نسبت به شاهد ۴۶۵ درصد بیشتر بود (شکل ۸).

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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 =۰/۹۸۳**). نتایج همبستگی بین صفات مختلف نشان داد که محتوای IC_{50}، همبستگی منفی بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، مالون دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن، پرولین و رزمارینیک اسید دارد که بیشترین همبستگی منفی معنی‌دار را با رزمارینیک اسید (r= −۰/۹۵۸**) 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 فتوسنتزی، آنتوسیانین، MDA، H_2O_2، 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 ppm ۱۰۰ نانو ذرات مس و ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن نسبت به شاهد، بیشترین میزان ترکیبات مورد سنجش را افزایش دادند. بیشترین مقدار صفات مذکور در نمونه‌های تیمارشده با نانو ذرات آهن و مس به صورت ترکیبی (غلظت ppm ۱۰۰۰ نانو ذرات آهن + ppm ۱۰۰ 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.

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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)

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

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

Haghparvar, 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

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

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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

Moazzami Farida, S. H., Karamian, R., & Albrectsen, 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

Naghisharifi, H., Kolahi, M., Javaheriyan, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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

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/wjtcm.wjtcm_16_22

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]

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

Nafise Varasteh Khanlari[1], Khadijeh Kiarostami*[1], Monir Hosseinzadeh Namin[1], Mohammad Abdoli[2]

[1] Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[2] Department 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 (H_2O_2), proline, and antioxidants in *D. moldavica* was highly significant ($P<0.01$) and the best results were obtained by the combined effect of the Fe (1000 ppm) + Cu (100 ppm) treatment. In the best treatment, the amounts of chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid were 90.9, 125 and 91.6%, respectively; anthocyanin was 73.9%; phenolic compounds and flavonoids were 74.1 and 57.1%; MDA, H_2O_2 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 mount of rosmarinic acid production and other traits, except antioxidant activity ($r = -0.958^{**}$).

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

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-19]