



Effect of Zinc Oxide nanoparticle on physiological characteristics, rosmarinic acid production and expression of TAT and 4-Cl genes in Lemongrass (*Melissa officinalis* L.)

Farnoosh S^a, Masoudian N^b, Safipour Afshar A^{c*}, Nematpour FS^d, Roudi B^e

^a Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University Damghan Branch, Damghan, Iran

^b Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University Damghan Branch, Damghan, Iran

^c Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University Neyshabur Branch, Neyshabur, Iran

^d Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University Neyshabur Branch, Neyshabur, Iran

^e Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University Damghan Branch, Damghan, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation Ghasemian S, Masoudian N, Safipour Afshar A*, Nematpour FS, Roudi B. Effect of Zinc Oxide nanoparticle on physiological characteristics, rosmarinic acid production and expression of TAT and 4-Cl genes in Lemongrass (*Melissa officinalis* L.). Journal of Cell and Tissue. 2022;13(1):56-70.

<https://10.52547/JCT/13.1.56>

KEYWORDS

Lemongrass, Tyrosine aminotransferase, Rosmarinic acid, Coumarate CoA ligase, Zinc oxide nanoparticles

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the effect of Zinc oxide nanoparticles on growth and physiological characteristics, rosmarinic acid production and the expression of key genes in the biosynthetic pathway of this compound in lemongrass.

Material and Methods: In this study, 30-day-old seedlings of lemongrass were treated with concentrations of 0, 0.06 and 0.12 mg/l Zinc oxide nanoparticles, and then growth parameters, photosynthetic pigments, proline, Glycine betaine, protein, activity of antioxidant enzymes and production of rosmarinic acid were examined. Also, the expression of key genes in the rosmarinic acid biosynthetic pathway was examined by real-time PCR.

Results: The results indicate that Zinc oxide nanoparticles treatment increased chlorophyll photosynthetic pigments, carotenoids and antioxidant activity of this plant. Also, the highest amount of proline and glycine betaine was obtained at a concentration of 12 mg/L of this treatment. Zinc oxide nanoparticles also increased the expression of rosmarinic acid biosynthetic pathway genes (TAT and 4-Cl) and thus increased this compound.

Conclusion: Based on the results of this study, Zinc oxide nanoparticles can affect the growth and physiological stages of lemongrass and therefore it can be used to increase the production of rosmarinic acid.

* Corresponding author. Tel.: +98-51-42613905 ; Fax: +98-51-42615472

E-mail address: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.1.56>

Received: September 29, 2021; Received in revised form: February 22, 2022; Accepted: February 22,

©Author





اثر نانوذره اکسید روی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی، میزان تولید رزمارینیک‌اسید و بیان ژن‌های TAT و 4-Cl در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

سمانه فرنوش^۱، ناهید مسعودیان^۲، اکبر صفی‌پور افشار^{۳*}، فاطمه سعید نعمت‌پور^۴، بوستان رودی^۵

^۱دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران

^۲دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران

^۳دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، نیشابور، ایران asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

^۴دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، نیشابور، ایران

^۵دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نانواکسید روی بر خصوصیات رشدی و فیزیولوژیکی، میزان تولید رزمارینیک‌اسید و بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی این ترکیب در گیاه بادرنجبویه است.</p> <p>مواد و روش‌ها: در این مطالعه، دانه رست‌های ۳۰ روزه بادرنجبویه با غلظت‌های صفر، ۰/۰۶ و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره اکسید روی تیمار شدند و سپس پارامترهای رشدی، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، گلايسين بتائين، پروتئين، فعاليت آنزيم‌های آنتی اکسیدانتي و میزان تولید رزمارینیک‌اسید مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی رزمارینیک‌اسید با روش Real-time PCR بررسی شد.</p> <p>نتایج: نتایج حاکی از این است که تیمار نانوذره اکسیدروی باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیلی، کاروتنوئیدها و فعاليت آنتی اکسیدانتي این گیاه شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان پرولین و گلايسين بتائين نیز تحت غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر این تیمار به‌دست آمد. هم‌چنین نانوذره اکسید روی باعث افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی رزمارینیک‌اسید (TAT و 4-Cl) و در نتیجه افزایش مقدار این ترکیب شد.</p> <p>نتیجه‌گیری: براساس نتایج این تحقیق نانوذره اکسیدروی می‌تواند بر مراحل رشدی و فیزیولوژیکی گیاه بادرنجبویه اثر گذاشته و بنابراین می‌توان از آن به‌منظور افزایش تولید رزمارینیک‌اسید استفاده کرد.</p>	<p>بادرنجبویه، تیروزین آمینوترانسفراز، رزمارینیک‌اسید، کومسارات‌کوآلیگاز، نانواکسید روی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۷</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴</p>

۱- مقدمه

بادرنجبویه یکی از جنس‌های خانواده نعنا (*Lamiaceae*) و از رده دو لپه‌ای‌ها است. بیش‌ترین پراکنش این گیاه علفی و پایا در مناطق مدیترانه و نواحی شمال ایران است. عمده‌ترین ترکیب تشکیل دهنده اسانس بادرنجبویه سیترونال (۱۰ تا ۵۰ درصد) است. از ترکیبات دیگر این گیاه می‌توان به اسانس (میانگین ۰/۱ درصد با سیترال-ژرانیل و نرال، لینالول، اوژنول، سیترونال، ژرانیول)، تانن، رزین، پلی‌فنول، فلاونوئید، سوکسینیک‌اسید و رزمارینیک‌اسید اشاره کرد (۱). اسانس آن دارای خواص ضد میکروبی، ضدباکتری و ضدویروسی است. این گیاه به‌دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و اهمیت بسیاری که در مصارف

پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و نیز صنایع غذایی دارد بسیار مورد توجه است. بیش‌تر خواص درمانی این گیاه را به‌ماده موثره آن یعنی رزمارینیک‌اسید نسبت می‌دهند. رزمارینیک‌اسید یک استر از کافئیک‌اسید و ۳، ۴-دی‌هیدروفنیل‌لاکتیک‌اسید است که در گیاهان از طریق مسیر بیوسنتزی فنیل‌پروپانوییدی تولید می‌شود. اسیدآمین‌های تیروزین و فنیل‌آل‌انین، سوبستراهای این مسیر بیوسنتزی بوده و آنزیم‌های مختلفی از جمله تیروزین‌آمینوترانسفراز (TAT) و ۴-کومارات‌کوآلیگاز (4-Cl) در این مسیر فعالیت دارند (۲).

امروزه از نانوذرات به‌عنوان محرک‌های غیرزیستی بسیار استفاده می‌شود. این ترکیبات معمولاً اندازه‌ای حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر دارند و به‌علت همین اندازه کوچک، سطح تماس بیش‌تری دارند و در نتیجه میزان چسبندگی آن‌ها به‌سلول بیش‌تر است و همین امر باعث افزایش کارایی آن‌ها می‌شود (۳). کاهش اندازه مواد در حد نانومتر به‌دلیل افزایش نسبت سطح به حجم باعث تغییر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن‌ها شده به‌گونه‌ای که ویژگی‌هایی متفاوت از ترکیبات با ابعاد بزرگ‌تر از نانو ایجاد می‌کنند. نانوذرات کاربردهای بسیار متنوعی در صنایع مختلف از قبیل صنایع غذایی، میکروالکترونیک، نساجی، ساختمان‌سازی، پزشکی و کشاورزی دارند و مطالعات مختلفی بر روی اثر این نانوذرات بر سنتز و میزان متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است. تحقیقات مختلفی در گذشته صورت گرفته و ثابت شده است که محرک‌ها (عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی) در گیاهان منجر به‌بروز پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و به‌طور کلی پاسخ‌های دفاعی مانند تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند.

مطالعات انجام شده توسط Aminzadeh و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که محتوای سولفارافان در گیاهچه‌های *Lepidum draba* تحت تیمار با نانوذرات اکسیدمس و آهن تحت تاثیر قرار گرفته است (۴). علاوه‌بر آن تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر تولید مواد موثره در گیاه *Artemisia annua* و *Calendula officinalis* ثابت شده است (۵، ۶). افزایش محتوای ترکیبات فنلی و رزمارینیک‌اسید در گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustiflora*) تحت تیمار با نانوذرات نقره گزارش شده است (۷). در بررسی اثر کود آهن و نانوکود آهن در گیاه ریحان، تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین مشاهده شد (۸). همچنین در مطالعه دیگری گزارش شده است که در گیاه نخود میزان متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر نانوذرات اکسیدتیتانیوم در شرایط کشت درون-شیشه افزایش پیدا کرده است (۹). در تحقیقی دیگر که توسط Homaee و Ehsanpor در گیاه سیب‌زمینی انجام شد مشخص شد که تحت تنش نانوذرات نقره میزان کلروفیل به‌طور قابل توجهی در غلظت‌های پایین افزایش و در سطوح بالاتر کاهش یافته است. نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر مثبت بر کلروفیل a و محتویات کلروفیل کل در گیاهچه خردل (*Brassica juncea*) داشته که با ۲۵ و ۴۰ درصد افزایش همراه بوده است (۱۰).

بنابراین با توجه به کاربردهای بسیار زیاد این گیاه در صنایع مختلف و ارزش دارویی آن، بهبود کمیت و کیفیت مواد موثره این گیاه مخصوصاً رزمارینیک‌اسید امری ضروری است. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر دو غلظت نانوذره اکسید روی بر شاخص‌های رشد، میزان متابولیت‌های ثانویه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و بیان دو ژن کلیدی مسیر بیوسنتزی رزمارینیک‌اسید می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه بادنرنبویه (*Melisa officinalis*) در گلدان حاوی ماسه و پرلیت کاشته شد. گلدان‌های حاوی بذرهای به‌گل‌خانه با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط دوره روشنایی/تاریکی (۸/۱۶) و شدت روشنایی (۱۲۰-۱۵۰ لوکس) انتقال داده شد. بعد از ۳۰ روز گلدان‌ها با ۲۰ میلی‌لیتر از تیمار نانواکسیدروی (خریداری شده به‌صورت پودر از شرکت بازرگانی نوترینو، میانگین اندازه ذرات ۳۰ نانومتر و خلوص ۹۹/۹ درصد) با غلظت‌های (۰، ۰/۰۶ و ۰/۱۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور هفتگی و برای سه هفته اسپری شدند. این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

سنجش پارامترهای رشدی: پس از هر مرحله برداشت نمونه‌های شاهد و تیمار، طول ریشه از ناحیه‌ی یقه تا نوک ریشه و طول ساقه از ناحیه یقه تا نوک جوانه انتهایی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه‌های گیاهان مربوط به هر گلدان با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند. سپس نمونه‌ها به منظور انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: به منظور سنجش میزان کلروفیل‌های a ، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها از استون ۸۰ درصد استفاده شد. سپس جهت محاسبه‌ی غلظت‌ها، جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده از شاهد (استون ۸۰ درصد) در دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل T80 شرکت (PG Instruments) خوانده شد (۱۱).
میزان کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از روابط زیر بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه شد:

$$Ca = 12/25A663/2 - 2/79A646/8$$

$$Cb = 21/50A646/8 - 5/10A663/2$$

$$Tchl = Ca + Cb$$

$$Cx+c = (1000A470 - 1/82Ca - 852/02Cb) / 198$$

Ca: غلظت کلروفیل a

Cb: غلظت کلروفیل b

Tchl: کلروفیل کل

Cx+c: غلظت کاروتنوئیدها

سنجش میزان پروتئین: غلظت مقدار پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد (۱۲). برای تعیین غلظت پروتئین‌های نمونه از هر عصاره پروتئینی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در لوله آزمایش ریخته و ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد به آن اضافه شد. سپس جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین هر نمونه براساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش آنزیم کاتالاز با استفاده از ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH (۲۸۰۰/۸) میکرولیتر، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر) و عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) انجام شد. با اضافه کردن عصاره به محیط، واکنش شروع و میزان تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه در دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و فعالیت آنزیمی به صورت تغییرات جذب به ازای گرم وزن تر در دقیقه سنجیده شد (۱۳).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: براساس روش Ranieri و همکاران (۲۰۰۳) سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH (۲۷۵۰/۸) میکرولیتر، بنزیدین ۲۰ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر)، آب اکسیژنه ۴۰ میلی‌مولار (۱۰۰ میکرولیتر) و عصاره آنزیمی (۵۰ میکرولیتر) انجام و تغییرات جذب نیز در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه در دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. سپس فعالیت آنزیمی به صورت تغییرات جذب به ازای گرم وزن تر در دقیقه سنجیده شد (۱۴).

سنجش میزان رزمارینیک اسید: مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت خشک گیاهچه‌های تیمار شده و شاهد آسیاب شده و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۳۰ درصد به آن اضافه شد. محلول حاصل از استخراج به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. محلول رویی با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شده و به وسیله فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری صاف شد. جذب نمونه‌ها در ۳۳۰ نانومتر خوانده شده و مقدار رزمارینیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد (۱۵).

سنجش پرولین: پس از کوبیدن نمونه‌ها در هاون چینی، ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه کرده و محتوای هاون را هم‌زده و با کاغذ صافی صاف شد. به ۲ میلی‌لیتر محلول حاصل، ۲ میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین اضافه شد. محتوی حاصل هم‌زده و در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. سپس لوله‌های محتوی حاصل را در یخ قرار داده، پس از یکی شدن دمای آن با دمای محیط به آن ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه مخلوط و سپس نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده و میزان پرولین نیز بر حسب فرمول زیر محاسبه شد (۱۶). در این رابطه X: مقدار پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ، A: مقدار پرولین به دست آمده از منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر، B: مقدار تولوئن استفاده شده بر حسب میلی‌لیتر، C: عدد مولکولی پرولین ۱۱۵/۱۳ میکروگرم بر میکرومول و D: مقدار نمونه گیاهی وزن شده بر حسب گرم می‌باشد.

سنجش گلیسین بتائین: برای اندازه‌گیری گلیسین بتائین از روش Grieve and Grattan (1983) استفاده شد (۱۷). جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۳۶۵ نانومتر برآورد شد و غلظت گلیسین بتائین بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر بیان شد.

استخراج RNA کل، سنتز cDNA، تکثیر و بررسی بیان ژن‌ها: به منظور بررسی بیان ژن آنزیم TAT و 4CL، استخراج RNA کل از گیاهچه‌های فریز شده با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن، به شماره کاتالوگ RN7713C) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در نهایت پس از حذف DNA ژنومی با استفاده از DNase1، کیفیت و کمیت RNA تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ c ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific) بررسی شد. رشته اول cDNA با استفاده از ۰/۵ میکروگرم RNA کل به وسیله کیت First Strand cDNA Synthesis kit (شرکت Thermo Fisher Scientific) انجام و به عنوان الگو برای واکنش‌های ریل‌تایم مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی بیان ژن‌های TAT و 4-Cl از آغازگرهای اختصاصی با طول قطعه تکثیر شونده ۱۳۰ جفت باز برای هر ژن برگرفته از مقاله Doring و همکاران (۲۰۱۴) با مشخصات ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد.

مخلوط واکنش شامل ۰/۲۵ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت، ۴ میکرولیتر cDNA رقیق شده و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین با حجم ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. دستگاه ریل‌تایم مدل plus ۹۶۰۰ (شرکت Linegene) برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد. مراحل واکنش سه مرحله شامل مرحله ۱- ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله ۲- ۴۰- چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، مرحله ۳- منحنی ذوب از ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با فاصله‌های افزایشی ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۵ ثانیه بود. با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تعداد نسخه‌های تکثیر شده برای هر ژن محاسبه شد.

آنالیز آماری

کشت گیاه با سه تکرار مستقل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین داده‌های حاصل از سه تکرار مستقل با استفاده از نرم‌افزار SPSS، توسط آزمون دانکن و با در نظر گرفتن سطح اطمینان $p \leq 0/05$ مورد تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) قرار گرفتند. معنی‌دار بودن نتایج با حروف بر روی هر ستون مشخص شد. حروف متفاوت بیان‌گر معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشند و حروف مشابه و مشترک بیان‌گر عدم معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵ درصد ($p \leq 0/05$) می‌باشند.

جدول ۱. پرایمرهای مربوط به تکثیر ژن های TAT و 4Cl و کنترل داخلی (β -Actin) (۱۸)

نام پرایمر	توالی	TM (°C)
4Cl-forward	5'-AGACGATCATGCTCTTGCTCCC-3'	۵۲
4Cl-reverse	5'-GGCCTTGGCTTGCTTGATTACC-3'	۵۲
TAT-forward	-CCTACAAGCTACCAGCCGACTC-3''5	۵۴/۴
TAT-reverse	-AGCCCGTAGATTGGGAAACACG-3''5	۵۴/۳
β -Actin-forward	5'-TGTATGTTGCCATCCAGGCCG-3'	۵۵
β -Actin-reverse	5'-AGCATGGGGAAGCGCATAACC-3'	۵۵

3- نتایج

پارامترهای رشدی گیاه بادرنجبویه

جدول ۲، مقادیر محاسبه شده صفات رشدی تحت تاثیر دو غلظت تیمار نانوذره اکسیدروی را بر وزن تر و خشک برگ، اندام هوایی و ریشه و همچنین طول اندام هوایی و ریشه نشان می دهد. همان طور که در نتایج نیز دیده می شود هیچ کدام از غلظت های این تیمار تغییر معنی داری ($p \leq 0/05$) در مقایسه با شاهد در وزن تر و خشک برگ، اندام هوایی و ریشه ایجاد نکرد. همچنین در طول اندام هوایی نیز تغییر معنی داری ($p \leq 0/05$) نسبت به شاهد مشاهده نشد اما هر دو غلظت تیمار نانو اکسیدروی باعث افزایش معنی دار طول ریشه نسبت به شاهد شدند ($p \leq 0/05$).

جدول ۲. مقادیر محاسبه شده صفات رشدی

نوع تیمار	غلظت تیمار (mg/l)	برگ		اندام هوایی		ریشه	
		وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)
شاهد	۰	۰/۱۶۵ ^{a*}	۰/۰۴۰ ^a	۴/۷۵۷ ^a	۰/۸۳۱ ^a	۲۲/۱۶۷ ^a	۱۸/۵۰۰ ^c
	۰/۰۶	۰/۱۶۵ ^a	۰/۰۴۲ ^a	۴/۹۸۳ ^a	۰/۹۰۹ ^a	۲۴/۸۳۳ ^a	۲۷/۳۳۳ ^{ab}
نانو اکسیدروی	۰/۱۲	۰/۱۸۲ ^a	۰/۰۴۸ ^a	۶/۳۰۰ ^a	۱/۳۱۴ ^a	۲۲/۵۰۰ ^a	۲۶/۸۳۳ ^{ab}

رنگیزه های فتوسنتزی

رنگیزه هایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید می باشند. غلظت ۰/۰۶ میلی گرم در لیتر روی تغییر معنی داری را نسبت به شاهد ایجاد نکرده است، در صورتی که استفاده از تیمار ۰/۱۲ میلی گرم در لیتر نانو روی موجب افزایش معنی دار مقدار کلروفیل a در مقایسه با شاهد و غلظت ۰/۰۶ میلی گرم در لیتر روی شده است. دو غلظت نانو روی به کار رفته نیز نسبت به شاهد و یکدیگر افزایش معنی داری را نشان داده است. تیمارهای نانو روی استفاده شده نیز موجب افزایش معنی دار در مقدار کلروفیل کل در مقایسه با شاهد شده است (شکل ۱).

در مورد میزان کاروتنوئید نیز نتایج نشان داد که غلظت $0/06$ میلی‌گرم در لیتر نانوروی تغییری در مقایسه با شاهد را نشان نداده است، در صورتی که غلظت $0/12$ میلی‌گرم در لیتر نانوروی افزایش معنی‌دار در محتوای کاروتنوئید را نشان داده است (شکل ۵۲).

محتوای پروتئین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که هر دو غلظت تیمار نانوروی مورد استفاده در این مطالعه، موجب ایجاد افزایش معنی‌دار در محتوای پروتئینی بادرنجبویه نسبت به شاهد و یکدیگر شدند ($p \leq 0/05$). در مورد آنزیم کاتالاز نیز تغییرات مشاهده شده به این صورت بود که تیمار اول نانوروی با غلظت $0/06$ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری ($p \leq 0/05$) ایجاد نکرد ولی با افزایش غلظت نانوذره اکسیدروی استفاده شده، بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزوده شد به طوری که هم با گروه شاهد هم با غلظت اولیه نانوذره اکسیدروی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p \leq 0/05$). در مورد آنزیم پراکسیداز نیز نتایج نشان داد که هر دو غلظت تیمار نانو اکسیدروی باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم نسبت به شاهد و یکدیگر شدند ($p \leq 0/05$) (شکل ۲).

محتوای پرولین و گلابسین بتائین

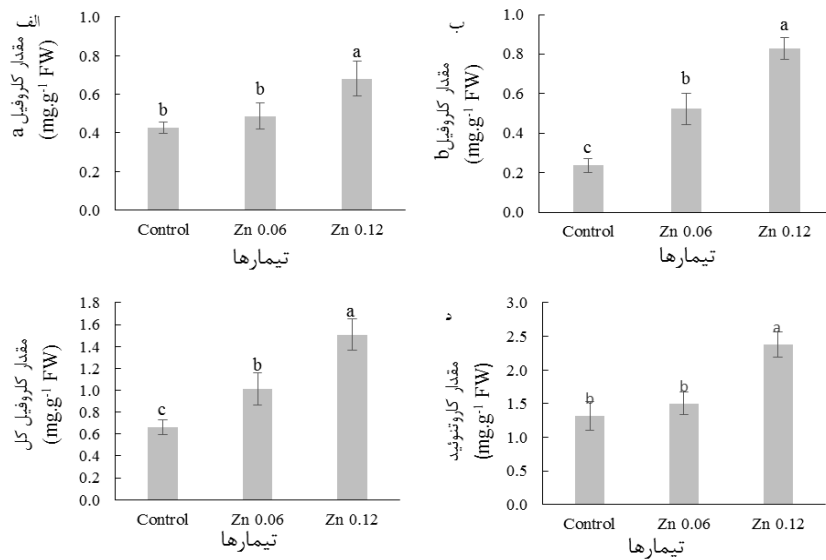
همان‌طور که در شکل ۳ نیز مشاهده می‌شود، هر دو غلظت تیمار نانوروی موجب افزایش معنی‌دار مقدار پرولین و گلابسین بتائین نسبت به شاهد و یکدیگر شده‌اند ($P \leq 0/05$).

محتوای رزمارینیک‌اسید

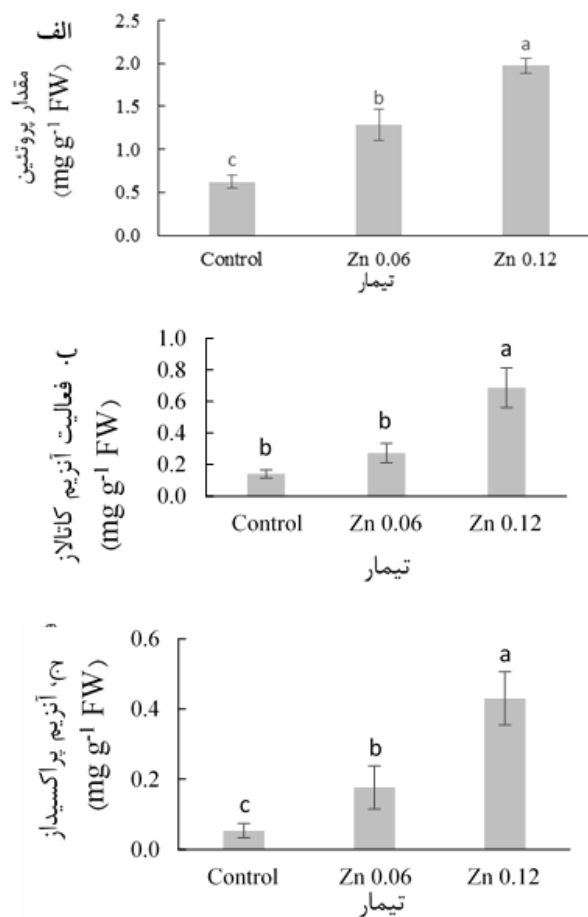
مطابق شکل ۳ ج، تیمار اول نانوروی در مقایسه با شاهد تغییر معنی‌داری را نشان نداده است ($p \leq 0/05$)، در صورتی که تیمار دوم آن (دارای غلظت نانو روی معادل $0/12$ میلی‌گرم در لیتر) افزایش معنی‌داری را هم نسبت به تیمار اول و هم نسبت به شاهد نشان داده است ($p \leq 0/05$).

میزان بیان ژن‌های TAT و 4Cl

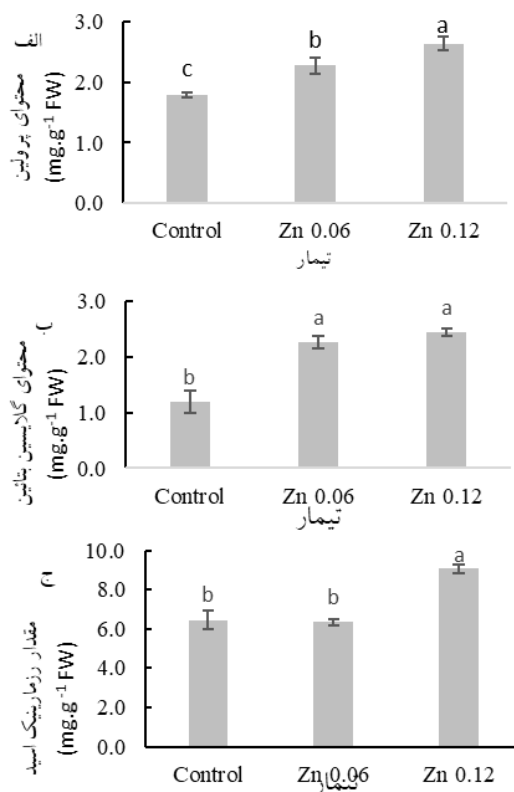
همان‌طور که در نتایج نیز قابل مشاهده است (شکل ۴)، تیمار با غلظت $0/06$ میلی‌گرم در لیتر نانوذره اکسیدروی تغییر معنی‌داری ($p \leq 0/05$) در بیان ژن TAT نسبت به شاهد ایجاد نکرد، اما در غلظت بالاتر یعنی $0/12$ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری ($p \leq 0/05$) هم نسبت به شاهد و هم نسبت به غلظت $0/06$ میلی‌گرم در لیتر ایجاد شد. اما در مورد ژن 4-Cl هر دو غلظت تیمار باعث افزایش معنی‌دار ($p \leq 0/05$) بیان ژن نسبت به شاهد و یکدیگر شدند.



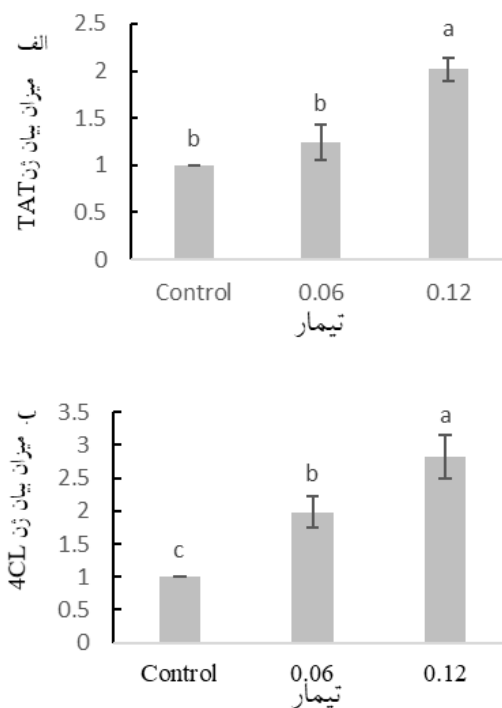
شکل ۱. الف) مقادیر کلروفیل a، ب) مقادیر کلروفیل b، ج) مقادیر کلروفیل کل و د) مقادیر کلروفیل کل تحت تاثیر تیمارهای نانوروی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p \leq 0.05$) می باشد. هر داده میانگین سه تکرار می باشد.



شکل ۲. الف) مقادیر پروتئین، ب) فعالیت آنزیم کاتالاز و ج) فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر تیمارهای نانوآکسیدروی. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p \leq 0.05$) می باشد. هر داده میانگین سه تکرار می باشد.



شکل ۳. الف) میزان پروتئین، ب) میزان گلاسیسین بتائین و ج) میزان رزمارینیک‌اسید تحت تاثیر تیمارهای نانوآکسیدروی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) می‌باشد. هر داده میانگین سه تکرار می‌باشد.



شکل ۴: میزان بیان ژن. تحت تاثیر تیمارهای نانوآکسیدروی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p \leq 0.05$) می‌باشد. هر داده میانگین سه تکرار می‌باشد.

۴- بحث

امروزه استفاده از نانوذرات در کلیه عرصه‌های علمی از جمله بخش‌های مختلف کشاورزی در حال گسترش است، در سال‌های اخیر نحوه تاثیر تغذیه عناصر مورد نیاز با شکل نانوذرات بر رشدونمو گیاهان مورد توجه قرار گرفته و نتایج مثبتی در این رابطه گزارش شده است. در این پژوهش از تیمار نانوذره اکسیدروی به‌عنوان یک محرک غیرزیستی بر مسیر بیوسنتزی رزمارینیک‌اسید در گیاه بادرنجبویه استفاده شد و هم‌چنین تاثیر آن بر پارامترهای رشدی و فیزیولوژیکی گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

تاثیر فلزات سنگین مختلف برروی فاکتورهای رشد گیاهان بسیار متنوع است و این اثر به‌گونه گیاهی، ژنوتیپ و نوع بافت گیاهی بستگی دارد. بنابراین صفات رشدی پارامترهای بسیار حساسی هستند که شاخصی برای اندازه‌گیری پاسخ گیاهان در برابر سمیت فلزات سنگین مختلفند به‌طوری‌که می‌توانند در برخی غلظت‌ها موجب افزایش و در غلظت‌های بالاتر موجب کاهش شوند (۱۹، ۲۰). روی به‌عنوان یک ماده مغذی در گیاه عمل می‌کند، اما در غلظت‌های بالاتر سمی است. سمیت روی در گیاهان با مهار رشد و کاهش تولید زیست توده به‌وضوح قابل مشاهده است. سمیت شدید نیز می‌تواند کشنده باشد. سمیت روی ممکن است نتیجه برهم‌کنش‌های پیچیده یون‌های سمی اصلی مانند کادمیوم، مس و سرب با کلسیم، منیزیم، آهن و فسفر و سایر عوامل محیطی باشد. مسمومیت روی تقریباً به‌طور قطع با متابولیسم از طریق رقابت برای جذب، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و جابجایی عناصر ضروری از مکان‌های عملکردی درگیر می‌باشد. به‌طور کلی، سمیت روی باعث کوتاه شدن ساقه، پیچ خوردن و غلتیده شدن برگ‌های جوان، مرگ نوک برگ‌ها، کلروز و در برخی موارد مهار انتقال آهن می‌شود. مطالعات متعددی از اثرات غلظت‌های مختلف این تیمار برروی گیاهان متنوع انجام شده است و نشان داده است که سمیت روی در گیاهان مختلف متفاوت است و به pH نیز بستگی دارد، اما به‌طور کلی مرگ‌ومیر سلول‌ها همراه با افزایش غلظت روی (۷-۱۰ تا ۴-۱۰ مولار) و افزایش زمان تیماردهی (روز دوم تا دوازدهم) افزایش می‌یابد. از آن‌جمله می‌توان به گیاهچه‌های *Typha latifolia* اشاره کرد که در حضور غلظت‌های حدود ۸۰ میکرومولار روی دچار کلروز شدند و یا کلروز برگ‌گی که روی گیاهچه‌های *Thlaspi ochroleucum* تیمار شده با ۱ میلی مولار روی پس از ۴ روز کشت ظاهر شد (۲۱). در این پژوهش، نتایج پارامترهای رشدی نشان دادند که تحت تاثیر دو غلظت تیمار نانوذره اکسیدروی وزن خشک و تر برگ، اندام هوایی و ریشه تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند است، البته غلظت بالاتر باعث افزایش این پارامترها شد ولی این افزایش معنی‌دار نبود. هم‌چنین طول اندام هوایی نیز در اثر تیمار اکسیدروی نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد اما طول ریشه نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. در مطالعه‌ای برروی گیاه یونجه نیز طی گزارش رضانی و همکاران (۱۳۹۳) استفاده از نانوذرات روی باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک گیاهچه‌های یونجه در مقایسه با شاهد شد. هم‌چنین طول شاخساره نیز با استفاده از نانوذرات روی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (۲۲). در گزارش دیگری Hassanpour و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر محلول پاشی نانواهن (با غلظت‌های ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌مولار) و نانوروی (۰ و ۳ میلی‌گرم بر لیتر) را بر عملکرد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه *Rosmarinus officinalis* در یک سیستم کشت بدون خاک باز مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که هر دو تیمارهای نانواهن و نانوروی باعث افزایش رشد گیاه می‌شود (۲۳). از جمله دلایلی که برای این افزایش در رشد و طویل شدن سلول‌ها قابل ذکر است این است که نانوذرات می‌توانند توزیع هورمون و سازمان‌دهی میکروتوبول‌ها را در جهت تسریع رشد و تقسیم سلولی تحت تاثیر قرار دهند. هم‌چنین نانوذرات می‌توانند با ایجاد پروتئین‌های حامل، از طریق آکواپورین‌ها و کانال‌های یونی به‌وسیله ایجاد منفذهای جدید وارد سلول‌های گیاهی شوند و منجر به اصلاح بیان ژن گیاه و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط شده و در نهایت باعث افزایش بازدهی و عمل‌کرد، بهبود سیستم‌های رشدی محصول و بهبود کیفیت در

بسیاری از گیاهان شوند (۲۴).

تیمارهای نانوذره اکسیدروی استفاده شده نیز موجب افزایش معنی‌دار در مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل و همچنین میزان کاروتنوئیدها در مقایسه با شاهد شده است. کلروفیل‌ها نقش بسیار مهمی در فرآیندهای رشدی گیاهان ایفا می‌کنند. بیوسنتز و تخریب این رنگیزه‌ها تحت مسیرهای پیچیده سلولی و مولکولی است که توسط فاکتورهای مختلفی تنظیم می‌شوند. این افزایش میزان کلروفیل در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در سال ۲۰۱۴، هلالی و همکارانش بر روی تیمار گیاهان موز با نانوذرات روی و اکسیدروی مطالعه‌ای انجام دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که این تیمار باعث افزایش کلروفیل کل و نسبت کلروفیل a/b نسبت به شاهد شد. این دو فاکتور که با کاربرد تیمار نانوذرات تحت تاثیر قرار گرفته بودند، بیش‌ترین میزان توسعه کامل سلول‌های بازسازی شده در شرایط درون شیشه‌ای را به خود اختصاص دادند. در این مطالعه علت افزایش نسبت کلروفیل a/b را افزایش میزان فتوسیستم I و فتوسیستم II بیان کردند که منجر به افزایش میزان فتوسنتز در شرایط استرس می‌شود (۲۵). همچنین در مطالعه دیگری Vankhadeh در سال ۲۰۰۲ نشان داد که محتوای کلروفیل برگ و وزن خشک گیاه در تیمارهای حاوی نانو ذرات روی افزایش می‌یابند (۲۶). کارتنوئیدها نیز ترکیبات تتراترپنی می‌باشند که وظیفه حفظ کلروفیل از اکسیداسیون نوری، جذب نور و انتقال انرژی به کلروفیل a را برعهده دارند. همچنین به‌عنوان حامی رنگیزه‌های غیرفتوسنتزی شناخته شده‌اند که می‌توانند انرژی اضافی طول موج‌های کوتاه را بگیرند و اکسیژن تکی را به اکسیژن سه‌تایی تبدیل کرده و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولید شده، نقش آنتی‌اکسیدانتی از خود بروز دهند (۲۷). افزایش در میزان کاروتنوئیدها در مقاله ثریا و همکاران در سال ۱۳۹۸ نیز گزارش شده است. این محققان تاثیر نانوذره روی را بر میزان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانت گیاهچه‌های بادرنجبویه بررسی کرده و افزایش در میزان کاروتنوئیدها را در پاسخ به غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره روی اعلام داشتند (۲۸).

در این تحقیق مشاهده شده که نانوذره اکسیدروی منجر به افزایش پروتئین و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه بادرنجبویه شده است که این به دلیل فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش فلز سنگین می‌باشد. این پاسخ افزایشی در کاربرد دیگر نانوذرات نیز مشاهده شده است و با نتایج این تحقیق مطابق است. در گزارشی شاه‌ولی‌پر و اسماعیل زاده (۱۳۹۶) اثرات نانوذرات نقره را بر رشد و شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه سنجیدند و افزایش میان پروتئین را گزارش کردند (۲۹). همچنین با نتایج Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی اثرات نانوذرات نقره روی گونه *Bacopa monnieri* مطالعه کرده و گزارش کردند که میزان پروتئین افزایش نشان داده است، مطابقت دارد (۳۰). علاوه بر این Anusuya و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که نانوذرات نقره-کیتوزان به‌طور قابل توجهی میزان پروتئین کل را در گیاهچه نخود افزایش می‌دهد (۳۱). همچنین در مطالعه دیگری Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی اثرات نانوذرات نقره بر روی رشد و خواص فیزیوشیمیایی گیاه *Brassica juncea* مطالعه کردند و گزارش دادند که نانوذرات نقره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌هایی آنتی‌اکسیدانتی از جمله کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شده است. آن‌ها بیان داشتند که این افزایش مشاهده شده در فعالیت‌های آنزیمی یکی از مکانیسم‌های اصلی حفاظت در مقابل تولید ROS می‌باشد. این تغییرات فعالیت آنزیم‌ها بسته به غلظت، نوع نانوذره و مدت زمانی که تحت تاثیر قرار می‌گیرد و همچنین نوع گیاه متنوع است (۳۲).

نتایج سنجش میزان پرولین در حضور تیمار نانوذره اکسیدروی نیز نشان داد که در هر دو غلظت تیمار میزان پرولین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. پرولین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتیو، و با حذف فعالیت اکسیژن واکنش پذیر (ROS)، مقاومت گیاه به استرس اکسیدانتیو را افزایش می‌دهد، بنابراین باعث حفظ فعالیت ردوکس می‌شود (۳۳). این نتایج مطابق است با گزارش Karimi و Mohsenzadeh که در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای روی گیاه گندم انجام دادند و اعلام کردند که میزان پرولین در گیاه گندم تحت تاثیر نانوذرات نقره با افزایش غلظت در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است و

حداکثر افزایش در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بوده است (۳۴). بنابراین به نظر می رسد در گیاه میزان پرولین به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو عمل می کند و با افزایش غلظت نانوذره نقره، افزایش می یابد.

میزان گلايسين بتائين نیز تحت هر دو غلظت تیمار نانواکسیدروی افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. این نتایج مطابق است با گزارش های غیرزیستی تشکیل می شود (۳۵). این مولکول نه تنها به عنوان یک اسمولیت برای تنظیم اسمزی عمل می کند، بلکه به عنوان یک ترکیب با دو حوزه آب گریز و آب دوست می تواند با کمپلکس های پروتئینی و غشاها تعامل داشته باشد. این امر به تثبیت و حفظ یک پارچگی ساختاری و عمل کردی آن ها کمک می کند و باعث حفظ آن ها در برابر اثرات مضر گونه های فعال اکسیژن بسیار واکنش پذیر (ROS) می شود (۳۶، ۳۷ و ۳۸). علاوه بر این، می تواند پایداری ترمودینامیکی ماکرومولکول ها را حفظ کند، و پیچ خوردگی های نادرست و/یا تجمع پروتئین را بدون آسیب رساندن به فعالیت های عمل کردی بومی آن ها برطرف کند (۳۹). هنگامی که گلايسين بتائين در سطوح بالا وجود دارد، همراه با پرولین، در محافظت از گیاهان در برابر استرس اکسیداتیو بسیار کارآمد است (۴۰ و ۴۱). هم چنین این افزایش در میزان گلايسين بتائين با گزارش دیگری نیز که توسط Jahani و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد مطابق است. آن ها به بررسی اثرات نانوذرات اکسیدسریوم بر پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L) پرداختند و افزایش میزان گلايسين بتائين را گزارش کردند (۴۲).

رزماری نیک اسید از دسته متابولیت های ثانویه از گروه فلاونوئیدها جزو اسیدهای فنولیک می باشد. این ترکیب برای گیاه اهمیت دفاعی داشته و در شرایط نامساعد از قبیل استرس های محیطی و حمله پاتوژن ها بیوسنتز آن افزایش می یابد. هنگامی که سلول های گیاه در معرض تنش های غیرزیستی و زیستی مانند تیماردهی با محرک ها قرار می گیرند، سیگنالی دریافت شده توسط گیرنده های غشا یک سیگنال هدایت شبکه ای ایجاد می کند که بیان ژن های درگیر در بیوسنتز متابولیت های ثانویه گیاهی و به علاوه آنزیم های کلیدی که بیوسنتز متابولیت های ثانویه هدف را کاتالیز می کنند، تنظیم می نمایند. استفاده از نانوذرات نیز به طور موثری باعث افزایش بیوسنتز ترکیبات دارویی با ارزش می شد (قربانپور و هادیان، ۲۰۱۵). در غلظت های بالای نانوذرات که گیاهان دچار تنش می شوند درصد اسانس اکثر گیاهان دارویی افزایش می یابد، چون در مواقع تنش متابولیت های بیش تری تولید شده و این مواد به عنوان آنتی اکسیدانت باعث جلوگیری از عمل اکسیداسیون در سلول می شوند (۴۳). البته این اثرات بسته به مقدار و نوع ترکیب تیمار ممکن است پاسخ های متنوعی ایجاد کند (۴۴).

متابولیت های ثانویه در گیاهان به سازگاری و ارتباط گیاه کمک می کنند. باین حال، تعدیل متابولیسم ثانویه گیاهان در پاسخ به نانوذرات هنوز مبهم است. بیان ژن های مختلف در ارتباط مستقیم با سیستم آنتی اکسیدانتی (۴۵ و ۴۶) و فتوسنتز (۴۷) است و در گونه های مختلف گیاهی در پاسخ به قرارگرفتن در معرض نانوذره اکسیدروی تغییر می کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت ۰/۰۶ میلی گرم در لیتر تیمار نانوذره اکسیدروی باعث افزایش بیان ژن TAT نسبت به شاهد شد. البته در مورد ژن Cl-۴ این افزایش در هر دو غلظت رخ داد. نتایج این پژوهش هم چنین با یافته های Xun و همکاران (۲۰۱۷) سازگار است که افزایش بیان ژن ها در ریشه های در معرض نانوذره اکسیدروی گزارش کرده است (۴۸). هم چنین در تحقیق دیگری Babajani و همکارانش (۲۰۱۹) اثرات به نانوذرات اکسیدروی (۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) را بر گیاه بادرنجبویه مطالعه کردند و گزارش کردند که قرارگرفتن در معرض نانوذره اکسیدروی به شدت بیان ژن رزماری نیک اسید سنتاز (RAS) و ژن های هیدروکسی فنیل پیرووات ردوکتاز (HPPR) را افزایش داد (۴۹).

۵- نتیجه‌گیری

همان‌طور که در مطالعات گذشته نیز بیان شده است محرک‌های غیرزیستی یکی از روش‌های کارآمد جهت افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف است. در این مطالعه از غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه استفاده شد. هم‌چنین جزئیات اثر این نانوذره بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های بادرنجبویه مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات تجربی نشان داد که نانوذرات می‌توانند در غلظت‌های پایین به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش پارامترهای رشد و پرآوری و هم‌چنین پارامترهای بیوشیمیایی مثل شاخص‌های فتوسنتزی، میزان پرولین و گلاسیسین بتائین و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی شوند. نانوذره اکسیدروی با مکانیسم‌های خاصی از جمله افزایش جذب آب و املاح، باعث افزایش رشد و طویل شدن سلول‌ها و هم‌چنین بهبود فعالیت سلول‌های گیاهی می‌شود. به‌دنبال افزایش رشد سلول‌ها و افزایش سرعت متابولیسم در آن‌ها، متابولیت‌های تولیدی توسط سلول‌ها نیز با سرعت بیش‌تری افزایش پیدا می‌کنند. هم‌چنین این نانوذره با اثرگذاری بر سیستم دفاعی گیاه باعث تحریک افزایش بیان برخی آنزیم‌های بیوسنتزی ترکیبات ثانویه شده و آن‌ها را افزایش می‌دهد.

۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه دامغان به‌لحاظ تامین امکانات لازم جهت انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۷- منابع

1. Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, et al. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009;23(8):1075-1081.
2. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003; 62(2):121-5.
3. Shah V, Belozeroval I. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2009;197(1): 143-148.
4. Aminizadeh M, Riahi-Madvar A, Mohammadi M. Nano-Metal Oxides Induced Sulforaphane Production and Peroxidase Activity in Seedlings of *Lepidium draba* (Brassicaceae). *Progress in Biological Sciences*. 2016;6(1):75-83.
5. Ghanati F, Bakhtiarian S. Effect of Methyl Jasmonate and Silver nanoparticles on Production of Secondary Metabolites by *Calendula officinalis* L (Asteraceae). *Trop J Pharm Res*. 2014;13(11):1783-1789.
6. Wei C, Zhang Y, Guo J, Han B, et al. Effects of silica nanoparticles on growth and photosynthetic pigment contents of *Scenedemus obliquus*. *Journal of Environmental Sciences*. 2010;22(1):155-160.
7. Alirezaee F, Kiarostami Kh, Hosseinzadeh Namin M. Effects of nano-silver on phenolic contents and rosmarinic acid in tissue cultured Lavandula. First national conference of Irani Biology and Natural science, Tehran. 2014.
8. Peyvandi M, Kamali Jamakani Z, Mirza M. Comparison of nano Fe chelat with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of *Satureja hortensis*. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2011;2(5):25-32.
9. Al-Oubaidi HM, Kasid NM. Increasing (phenolyic and flavonoids compounds of *Cicer arietinum* L.) from embryo explant using titanium dioxide nanoparticle in vitro. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;4(11):1791-1799.
10. Homae MB, Ehsanpour AA. Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2016;57(6):544-553.

11. Sand-Jensen K. Metabolic adaptation and vertical zonation of *Littorella uniflora* (L.) Aschers. and *Isoetes lacustris* L. Aquatic Botany. 1978;4:1-10.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72(1-2):248-254.
13. Aebi H. Catalase. In Methods of enzymatic analysis (pp. 673-684). Academic press. 1974.
14. Ranieri A, Castagna A, Pacini J, Baldan B, et al. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. J Experi Botany. 2003;54(392):2529-2540.
15. Nasiri-Bezenjani MA, Riahi-Madvar A, Baghizadeh A, Ahmadi AR. Rosmarinic acid production and expression of tyrosine aminotransferase gene in *Melissa officinalis* seedlings in response to yeast extract. J Agr Sci Tech. 2014;16:921-930.
16. Irigoyen JJ, Einerich DW, Sánchez-Díaz M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia plantarum. 1992;84(1):55-60.
17. Grieve CM, Grattan SR. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium compounds. Plant and soil. 1983;70(2):303-307.
18. Doring AS, Pellegrini E, Della Batola M, Nali C, et al. How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? Journal of plant physiology. 2014;171(5):35-41.
19. Imtiaz M, Tu S, Xie Z, Han D, et al. Growth, V. uptake, and antioxidant enzymes responses of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under vanadium stress. Plant and Soil. 2015; 390(1): 17-27.
20. Mondal NK, Chittaranjan D, Satinath R, Datta JK, et al. Effect of varying cadmium stress on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings: an ultrastructural study. Annals of Environmental Science. 2013;7:59-70.
21. Gyana Rout, Premananda Das. Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. Agronomie, EDP Sciences, 2003;23(1):3-11.
22. Ramezani F, Shayanfar A, Afshari RT, Rezaee K. Effects of silver, nickel, zinc and zinc-copper nanoparticles on germination, seedling establishment and enzyme activity of alfalfa (*Medicago sativa*) seed. Iranian Journal of Field Crop Science. 2014;45(1):107-118.
23. Hassanpouraghdam MB, Mehrabani LV, Tzortzakis N. Foliar application of nano-zinc and iron affects physiological attributes of *Rosmarinus officinalis* and quietens NaCl salinity depression. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2020;20(2):335-345.
24. Aslani F, Bagheri S, Muhd Julkapli N, Juraimi AS, et al. Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. Scientific World Journal. 2014; 2014:641759.
25. Helaly MN, El-Metwally MA, El-Hoseiny H, Omar SA, et al. Effect of nanoparticles on biological contamination of 'in vitro' cultures and organogenic regeneration of banana. Australian Journal of Crop Science. 2014;8(4):612-624.
26. Vankhadeh S. Response of sunflower to applied Zn, Fe, P, N. nes. S. zz. 2002;1:143-5.
27. Pandey Renu. Mineral nutrition of plants. Plant biology and biotechnology. Springer, New Delhi, 2015;499-538.
28. Soraya E, Gohari GhR, Motalebi Azad AR, Alizadeh saleteh S. Nano-zinc effects on *Melissa officinalis* in vitro sterilization and establishment states. Environmental Physiology. 2019;15(60):48-60.
29. Shavalibor A, Esmailzadeh Bahabadi S. The effect of silver nanoparticles synthesized by biological method on growth, physiological and biochemical properties of *Melissa officinalis* L. Plant procedure and application. 2018;8(32):19-34.
30. Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, et al. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. Process biochemistry. 2012;47(4):651-658.
31. Anusuya S, Muthamilan M, Revathy N, Ananthan M. Prevalence, symptomatology, pathogenicity and nutritional requirements of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli causing Fusarium yellows of French bean in Thandikudi. International Journal of Plant Sciences (Muzaffarnagar). 2016;11(2):161-166.
32. Sharma P, Bhatt D, Zaidi MGH, Saradhi PP, et al. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. Applied biochemistry and biotechnology. 2012;167(8):2225-2233.

33. Matysik J, Alia BB, Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. 2002;82:525–32.
34. Karimi J, Mohsenzadeh S. Physiological effects of silver nanoparticles and silver nitrate toxicity in *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 2017;41(1):111-120.
35. Jain P, Pandey B, Singh P, Singh R, et al. Plant Performance and Defensive Role of Glycine Betaine Under Environmental Stress. In *Plant Performance Under Environmental Stress*. Springer, Cham. 2021;225-248.
36. Islam MS, Yoshida H, Matsuki N, Ono K, et al. Antioxidant, free radical-scavenging, and NF-κB-inhibitory activities of phytosteryl ferulates: structure-activity studies. *Journal of pharmacological sciences*. 2009;111(4):328-337.
37. Banu MNA, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Islam MM, et al. Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2010;74(10):2043-249.
38. Gupta B, Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*. 2014; 2014:701596.
39. Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, et al. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Research in microbiology*. 2010;161(10):816-823.
40. Annunziata MG, Ciarmiello LF, Woodrow P, Dell'Aversana E, et al. Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses. *Frontiers in plant science*. 2019;10(230):1-13.
41. Woodrow CJ, White NJ. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. *FEMS microbiology reviews*. 2017;41(1):34-48.
42. Jahani S, Saadatmand S, Mahmoodzadeh H, Khavari-Nejad RA. Effect of foliar application of cerium oxide nanoparticles on growth, photosynthetic pigments, electrolyte leakage, compatible osmolytes and antioxidant enzymes activities of *Calendula officinalis* L. *Biologia*. 2019;74(9):1063-1075.
43. AliAbadi Farahani H. The effect of sowing date and planting density on the essential oil content and composition of *Valeriana officinalis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2019;25(2):272-282.
44. Rad MS, Rad JS, Heshmati GA, Miri A, et al. Biological synthesis of gold and silver nanoparticles by *Nitraria schoberi* fruits. *American Journal of Advanced Drug Delivery*. 2013;1(2):174-179.
45. Saleh AM, Abdel-Mawgoud M, Hassan AR, Habeeb TH, et al. Global metabolic changes induced by arbuscular mycorrhizal fungi in oregano plants grown under ambient and elevated levels of atmospheric CO₂. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020;151:255-263.
46. Venkatachalam S, Ko SB. Design of power and area efficient approximate multipliers. *IEEE Transactions on Very Large Scale Integration (VLSI) Systems*. 2017; 25(5):1782-1786.
47. Wang J, Lu W, Tong Y, Yang Q. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Frontiers in plant science*. 2016;7:1-10.
48. Xun H, Ma X, Chen J, Yang Z, et al. Zinc oxide nanoparticle exposure triggers different gene expression patterns in maize shoots and roots. *Environmental Pollution*. 2017; 229:479-488.
49. Babajani A, Iranbakhsh A, Ardebili ZO, Eslami B. Differential growth, nutrition, physiology, and gene expression in *Melissa officinalis* mediated by zinc oxide and elemental selenium nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019; 26(24):24430-24444.