



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>

IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY

E-ISSN: 2322-2204

Vol. 14, Issue, No. 4, Winter 2022

Document Type: Research Paper

Received: 31/01/2023

Accepted: 29/08/2023

The Effect of Salicylic Acid and Nitric Oxide Pretreatment on Reducing the Toxicity of Zinc Nanoparticles in *Phlomis tuberosa*

Elham Ghasemifar^{1*} , Ghader Habibi¹

¹Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Abstract

In this study, the effect of salicylic acid and sodium nitroprusside on the toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) and zinc sulfate (ZnSO₄) in *Phlomis tuberosa* was investigated. The purpose of this research was to investigate new methods of increasing the tolerance threshold of *Phlomis* plants under the influence of zinc oxide and zinc sulfate nanoparticles toxicity. This experiment was conducted in the form of a completely randomized design with three replications in the form of pot cultivation in a perlite bed, and the plants were harvested after 21 days of treatment. The measured factors included total chlorophyll, carotenoid, total phenol, flavonoid, the activity of phenylalanine ammonia lyase, catalase, superoxide dismutase, and ascorbate peroxidase. The results of the analysis of the variance of the data in the laboratory showed that the application of 1000 mgL⁻¹ of zinc oxide nanoparticles or zinc sulfate caused more toxicity. The interaction effect of salicylic acid and sodium nitroprusside pretreatments on zinc oxide nanoparticles in *Phlomis* seedlings was significant and salicylic acid pretreatment increased the amount of proline in the treatment of zinc oxide nanoparticles. Phenol antioxidants increased significantly under the effect of zinc oxide and zinc sulfate nanoparticles, which was associated with an increase in the activity of the phenylalanine ammonia lyase enzyme. Salicylic acid pretreatment showed the greatest effect in the *Phlomis* plant compared to the combination of salicylic acid and nitric oxide.

Introduction

Engineered zinc oxide nanoparticles (ZnONPs), due to their unique physicochemical properties, have many applications in industrial, optical, electrical, cosmetic, biomedical, pharmaceutical, and agricultural fields (Pullagurala et al., 2018; Mosquera-Sánchez et al., 2020). Despite the application of Zn nanoparticles in agriculture, some reports show that Timarin nanoparticles can lead to Zn accumulation and toxic effects in

* Corresponding Author: e_ghasemifar@pnu.ac.ir



plants (Molnár et al., 2020; Zoufan et al., 2020). The toxicity mechanism of zinc oxide nanoparticles is better understood by using compounds that increase the tolerance and performance of plants during the treatment of nanoparticles. Salicylic acid, as a phenolic compound, plays a role in controlling plant growth, seed germination, photosynthesis and flowering (Arif et al., 2020). Under heavy metal stress, treatment with salicylic acid reduces the toxic effects of these metals and increases plant tolerance through changes in the antioxidant system (Zengin, 2014; Kotapati et al., 2017; Lu et al., 2018). When stresses cause the accumulation of excess reactive oxygen species, nitric oxide reacts with superoxide anions, thereby reducing the formation of other oxygen radicals (Domingos et al., 2015). There are few studies on the effects of nitric oxide on the tolerance of nanoparticle toxicity in plants, which confirms this hypothesis (Siddiqui et al., 2015). Tripathi et al. (2017) showed that sodium nitroprusside reduces the accumulation of zinc, reactive oxygen species and malondialdehyde and increases the amount of chlorophyll and the efficiency of photosynthesis in wheat shoots under the stress of zinc oxide nanoparticles. In this research, in order to better understand the effects of zinc oxide nanoparticles, the physiological and molecular reactions of the plant when exposed to zinc were compared to zinc sulfate. The importance of the role of salicylic acid and nitric oxide in reducing the tension of zinc oxide nanoparticles in plants was mentioned. These results showed that salicylic acid pretreatment alone is effective for *Phlomis tuberosa* plants under the stress of zinc oxide nanoparticles.

Materials and Methods

The seeds of *Phlomis tuberosa* (Jerusalem sage) were collected from Madagh near Marand city, 65 km south of Tabriz (45°38'E and 38°22'N) at an altitude of 1800 meters in East Azarbaijan province (Northwest of Iran). The seeds were planted in cylindrical plastic pots containing perlite and then watered with 500 ml of Hoagland solution. For pre-treatment, the seeds of gerbera and phlomis were soaked in solutions of sodium nitroprusside (SNP, as NO donor) and salicylic acid (SA) at a concentration of 0.1 mM for 12 hours). Sixteen weeks after sowing, when the plants were about 10 cm (30 inches) tall, the pots were irrigated with 1000 ppm ZnONPs or ZnSO₄ solution dissolved in tap water for 21 days (Zn treatment). Plants in the greenhouse with day and night temperatures of 25-30 degrees Celsius and 19-21 degrees Celsius respectively, day and night light periods of 16 and 8 hours respectively, relative humidity of 60-65% and daily light flux density of about 350-400 micromoles per square meter per second were tested during the maintenance period. After 21 days of Zn treatment, plants were harvested for morphological and physiological analysis. After the determination of fresh weight (FW), leaves were dried for 48 h at 70 °C for the determination of dry weight (DW). For the latter physiological analysis, samples were stored immediately in liquid N₂ until assay. For the determination of leaf concentration of chlorophyll and carotenoids, samples were homogenized in the methanol according to Lichtenthaler and Wellburn (1983). Proline was calculated as described by Bates et al., 1973. Soluble sugar concentrations were determined according to the method of Quentin et al. (2015). The resulting precipitate was used for starch analysis following the method of Magne et al. (2006). The activity of phenylalanine ammonialyase was determined by measuring the absorbance of cinnamic acid with spectrophotometry at a wavelength of 290 nm based on the modified method of Zucker (1965). Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was estimated according to the method of Giannopolitis and Ries (1977). Nitric oxide concentration was measured using the modified method described

by Wu et al. (2016). The digested plant solution was diluted in distilled water, and zinc content was estimated by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES, INTEGRA XL2, GBC, Australia). HPLC analysis was performed using an Agilent 1290 Santa Clara, CA, USA HPLC high-performance liquid chromatography system with a diode array detector (DAD) according to Sinrod et al. (2019). Experiments were done in a complete randomized block design with 3 replications. Statistical analysis was carried out using Sigma Stat (3.5) with the Tukey test ($P < 0.05$).

Results and Discussion

This research showed that the effect of pretreatment of seeds with salicylic acid, nitric oxide and the combination of salicylic acid and nitric oxide at a concentration of 0.1 mM on the physiological and biochemical parameters of *Phlomis* under the influence of the application of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate at a concentration of 1000 mM Gram per liter was studied and the following general results were obtained: Zinc oxide and zinc sulfate nanoparticles at a concentration of 1000 ppm caused a significant decrease in plant growth due to the increase in zinc content, lipid peroxidation, hydrogen peroxide and oxidative stress. The amount of sinapyl alcohol, chlorogenic acid, ascorbic acid and cinnamic acid compounds of salicylic acid pretreated leaves showed a significant increase under the influence of zinc oxide nanoparticles. The greatest effect of priming seeds with salicylic acid under the influence of zinc stress with the accumulation of phenolic compounds (sinapil-alcohol, chlorogenic-acid, ascorbic-acid, cinnamic-acid) and the amount of flavonoid, activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase), increased proline Obtained. Salicylic acid may have an important function in increasing the integrity of membranes by controlling the function of the antioxidant system.

Conclusion

We showed that both ZnONPs and ZnSO₄ adversely decreased growth, due to enhanced levels of Ag and significant lipid peroxidation. Strong amelioration of Zn-induced stress was achieved under SA priming. These findings provide valuable information for the development of sustainable strategies in order to reduce the negative impact of ZnONPs and ZnSO₄ on crops.

Keywords: Pretreatment, Salicylic Acid, *Phlomis*, Nanoparticles, Sodium Nitroprusside

تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید بر کاهش سمیت نانوذرات روی در گیاه فلومیس (*Phlomis tuberosa*)

الهام قاسمی فر^{۱*}، قادر حبیبی^۱

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، اثر سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوساید سدیم بر میزان سمیت نانوذرات اکسیدروی (ZnONPs) و سولفات روی ($ZnSO_4$) در فلومیس (*Phlomis tuberosa*) بررسی شد. آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به شکل کشت گلدانی در بستر پرلیت انجام شد. پس از ۲۱ روز تیمار، گیاهان برداشت و شاخص‌های کلروفیل کل، کاروتنوئید، فنول کل، فلاونوئید، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در آزمایشگاه نشان دادند اعمال ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسیدروی یا سولفات روی می‌تواند سمیت بیشتری ایجاد کند. اثر متقابل پیش تیمارهای سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوساید سدیم بر نانوذرات اکسیدروی در گیاهچه‌های فلومیس معنادار بود و پیش تیمار سالیسیلیک‌اسید مقدار پرولین در تیمار نانوذرات اکسیدروی را افزایش داد. افزایش آنتی‌اکسیدان‌های فنول تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی معنادار و با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز همراه بود. پیش تیمار سالیسیلیک‌اسید در گیاه فلومیس در مقایسه با ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید بیشترین تأثیر را نشان داد. هدف پژوهش حاضر، بررسی روش‌های جدید افزایش آستانه تحمل گیاه فلومیس به سمیت نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی بود.

واژه‌های کلیدی: پیش تیمار، سالیسیلیک‌اسید، فلومیس، نانوذرات، نیتروپروپوساید سدیم

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: e_ghasemifar@pnu.ac.ir، شماره تماس: ۰۸۷۳۸۲۱۱۸۶۴



مقدمه

نانوذرات اکسیدروی مهندسی شده (ZnONPs) به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد خود، کاربردهای فراوانی در زمینه‌های صنعتی، نوری، الکتریکی، آرایشی، زیست‌پزشکی، دارویی و کشاورزی دارند (Pullagurala et al., 2018; Mosquera-Sánchez et al., 2020). گیاهان، موجودات فتوسنتزکننده و مسیر اصلی ورود نانوذرات به زنجیره غذایی هستند. با وجود کاربرد نانوذرات روی در کشاورزی، برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند تیمار این نانوذرات به تجمع روی و آثار سمی آن در گیاهان منجر می‌شود (Molnár et al., 2020; Zoufan et al., 2020). سازوکار سمیت نانوذرات اکسیدروی با استفاده از ترکیباتی که تحمل و عملکرد گیاهان هنگام تیمار نانوذرات را افزایش می‌دهند، بهتر درک می‌شود.

سالیسیلیک‌اسید، ترکیبی فنولی است که در کنترل رشد و نمو گیاه، جوانه‌زنی بذر، فتوسنتز و گل‌دهی نقش دارد (Arif et al., 2020). محلول‌پاشی سالیسیلیک‌اسید، آثار نامطلوب تنش خشکی بر وضعیت آب و رشد رویشی گیاه را کاهش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش می‌دهد (Estaji & Niknam, 2020). برخی مطالعه‌ها نشان داده‌اند تیمار سالیسیلیک‌اسید آسیب ناشی از تنش دما بر رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی را کاهش می‌دهد (Wang et al., 2019; Ignatenko et al., 2010). در شرایط تنش فلزات سنگین، تیمار سالیسیلیک‌اسید آثار سمی فلزات را کاهش و تحمل گیاهان را از طریق تغییر عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌دهد

(Zengin, 2014; Kotapati et al., 2017; Lu et al., 2018). با وجود نقش تأیید شده سالیسیلیک‌اسید در کاهش سمیت فلزات سنگین، اطلاعات اندکی در زمینه واکنش گیاهان تحت تأثیر تیمار نانوذرات به سالیسیلیک‌اسید وجود دارد.

نیتریک‌اکسید، مولکول سیگنالی است که واکنش‌های متعددی نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نشان می‌دهد. هنگامی که تنش‌ها سبب تجمع گونه‌های فعال اکسیژن اضافی می‌شوند، نیتریک‌اکسید با آنیون‌های سوپراکسید واکنش و تشکیل سایر رادیکال‌های اکسیژن را کاهش می‌دهد (Domingos et al., 2015). نیتریک‌اکسید ممکن است به طور مستقیم و به شکل مولکول آنتی‌اکسیدانی عمل کند یا به طور غیرمستقیم و با فعال کردن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها، آثار تنش اکسیداتیو را کاهش دهد. مطالعه‌های اندکی در زمینه آثار نیتریک‌اکسید بر تحمل سمیت نانوذرات در گیاهان وجود دارند که فرضیه یاد شده را تأیید می‌کنند (Siddiqui et al., 2015). Tripathi et al. (2017) نشان دادند نیتروپروپیل‌سایدسدیم تجمع روی، گونه‌های فعال اکسیژن و مالون‌دی‌آلدهید را کاهش و مقدار کلروفیل و کارایی فتوسنتز در نشای گندم در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی را افزایش می‌دهد (Tripathi et al., 2017). Chen et al. (2015) بیان کردند نیتروپروپیل‌سایدسدیم گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاهان را کاهش و رونوشت‌ها و فعالیت‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز را در برنج در معرض تنش

نیتریک اکسید (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار) و سالیسیلیک اسید (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار) روی جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه‌ها آزمایش شدند. غلظت مؤثر نانوذرات (۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) با توجه به تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی و نقره (۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) بر جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه انتخاب شد. بذرها به مدت ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی و نقره خیس‌انده شدند.

مواد گیاهی و تیمار: بذر *Phlomis tuberosa*

(مریم گلی اورشلیم) از میشوداغ، در نزدیکی شهر مرند، ۶۵ کیلومتری جنوب تبریز (۴۵ درجه و ۳۸ دقیقه شرقی و ۳۸ درجه و ۲۲ دقیقه شمالی)، در ارتفاع ۱۸۰۰ متری استان آذربایجان شرقی (شمال غربی ایران) جمع‌آوری شد. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی استوانه‌ای شکل حاوی پرلیت کاشته و سپس با ۵۰۰ میلی لیتر محلول هوگلند آبیاری شدند؛ قطر گلدان‌ها ۱۴ سانتی متر و عمق آنها ۴۵ سانتی متر بود. به منظور پیش تیمار، بذرها در گل راعی و فلومیس به مدت ۱۲ ساعت در محلول‌های نیتروپروپوساید سدیم (SNP) به عنوان اهداکننده (NO) و سالیسیلیک اسید (SA) در غلظت ۰/۱ میلی مولار خیس‌انده شدند. شانزده هفته پس از کاشت، زمانی که بوته‌ها حدود ۱۰ سانتی متر ارتفاع داشتند، گلدان‌ها به مدت ۲۱ روز با ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره و اکسیدروی یا نترات نقره و سولفات روی محلول در آب دیونایزر (تیمار روی) آبیاری شدند. محصول نانوذرات اکسیدروی از شرکت معتبر

نانوذرات اکسیدروی افزایش می‌دهد (Chen et al., 2015). Habibi & Rostampoor (2020). گزارش کردند گیاه فلومیس توبروزا به واسطه انباشت نیتریک اکسید، مقاومت زیادی به تنش مس نشان می‌دهد. (Ghasemifar et al. (2022). نشان دادند پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید، آثار سمیت نانوذرات نقره و نترات نقره در گیاه فلومیس توبروزا را کاهش می‌دهد (Ghasemifar et al., 2022). گیاه فلومیس توبروزا به خانواده لامیاسه تعلق دارد و در خاک‌های سبک (ماسه)، لومی و سنگین به خوبی رشد می‌کند (Javzan & Selenge, 2013). چنانچه گیاه یادشده بتواند مقادیر زیاد سمیت روی را تحمل کند، نتایج پژوهش حاضر قابلیت استفاده در پژوهش‌های مربوط به جستجوی نامزد مناسب برای گیاه پالایی را دارند. در پژوهش حاضر، تأثیر غلظت زیاد نانوذرات روی و نمک آن بر رشد، میزان انباشت نانوذرات و فلز آن، رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار محلول‌های سازگار، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه گیاه فلومیس توبروزا بررسی شد و هدف مطالعه، بررسی آستانه تحمل گیاه فلومیس توبروزا در معرض سمیت نانوذرات اکسیدروی (ZnONPs) و سولفات روی (ZnSO₄) با استفاده از پیش تیمار نیتریک اکسید و سالیسیلیک اسید بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های مقدماتی: در مطالعه مقدماتی، به منظور تعیین غلظت‌های مؤثر نیتریک اکسید و سالیسیلیک اسید، غلظت‌های مختلف

اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

تعیین قندهای محلول، نشاسته و پرولین:

غلظت قندهای محلول بر اساس روش Quentin et al. (2015) تعیین شد. پس از استخراج عصاره، مواد رویی مورد تجزیه و تحلیل قندهای محلول به کمک معرف آنترون سولفوریک در ۶۳۰ نانومتر قرار گرفتند. به منظور رسم منحنی استاندارد از گلوکز (سیگما) استفاده شد. رسوب حاصل برای تجزیه و تحلیل نشاسته به روش Magne et al. (2006) استفاده و جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد؛ نشاسته (Merck) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. به منظور استخراج و سنجش پرولین آزاد نمونه‌ها از روش Bates et al. (1973) استفاده شد. پس از استخراج عصاره‌های گیاهی، جذب آنها در ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار پرولین نمونه‌ها بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز (PAL) و

متابولیت‌های آن: فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز به کمک اندازه‌گیری میزان جذب سینامیک اسید با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس روش اصلاح شده Zucker (1965) تعیین شد. یک واحد (U) از فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز به عنوان مقدار آنزیمی که یک نانومول سینامیک اسید در ساعت تولید می‌کند، تعریف شده است. محتوای فنولی کل به روش Velioglu et al. (1998) اندازه‌گیری شد. گالیک اسید برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج به شکل میلی‌گرم گالیک اسید (GA) به ازای هر گرم وزن

پیشگامان نانومواد ایران (مشهد، ایران) تهیه شد؛ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانومحصول یاد شده به شرح زیر بود: خلوص: ۹۹ درصد، APS: ۱۰ تا ۳۰ نانومتر، SSA: ۲۰ تا ۶۰ مترمربع بر گرم، رنگ: سفید، مورفولوژی: کروی، چگالی واقعی: ۵/۶۰۶ گرم بر سانتی‌مترمکعب. نمک سولفات روی ($ZnSO_4$) از شرکت سیگما خریداری و به منظور کنترل حجم استفاده شد. گیاهان شاهد با محلول غذایی بدون روی، نیتریک اکسید و سالیسیلیک اسید آبیاری شدند. گیاهان در گلخانه‌ای با دمای روز و شب به ترتیب ۲۵ تا ۳۰ و تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری روز و شب به ترتیب ۱۶ و ۸ ساعت، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۶۵ درصد و تراکم جریان نوری روزانه حدود ۳۵۰ تا ۴۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه در طول دوره آزمایش نگهداری شدند.

محصول: پس از ۲۱ روز از تیمار روی، گیاهان

برای تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی برداشت شدند. پس از تعیین وزن تر (FW) و به منظور تعیین وزن خشک (DW)، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. به منظور آزمایش‌های بعدی، نمونه‌ها بی‌درنگ در N_2 مایع تا زمان سنجش ذخیره شدند. **سنجش کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها:** به منظور تعیین غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها، نمونه‌ها در متانول همگن (Lichtenthaler & Wellburn, 1983) و سپس همورنه و صاف شدند. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه، مایع رویی برای تعیین رنگدانه‌ها استفاده شد. رنگدانه‌های فتوسنتزی به روش

Sinrod et al. (2019) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از Sigma Stat 3.5 با آزمون Tukey انجام شد ($P < 0.05$).

نتایج و بحث

تعیین غلظت‌های مؤثر نیتریک اکسید، سالیسیلیک اسید و نانوذرات اکسیدروی: مطالعه حاضر نشان داد جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در پیش تیمار نیتریک اکسید و سالیسیلیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی مولار، افزایش معناداری دارد (شکل ۱). در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسیدروی، درصد جوانه‌زنی در مقایسه با شاهد به نصف کاهش یافت و به عنوان غلظت نیمه کشنده نانوذرات برای آزمایش‌های بیشتر انتخاب شد (شکل ۲) (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) (Zhang et al., 2008).

تجمع نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی و تأثیر آن بر شاخص‌های رشد: مقدار وزن تر و خشک اندام‌های هوایی تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی کاهش معناداری در مقایسه با شاهد نشان داد (شکل ۳) که با یافته‌های Mahajan et al. (2011) مطابقت داشت؛ آنها نشان دادند رشد و تکامل در گیاهان *Vigna radiate* و *Cicer arietinum* (نخود) پس از تیمار با نانوذرات اکسیدروی کاهش می‌یابد. (Zoufan et al. (2020) نشان دادند نانوذرات اکسیدروی رشد گیاه را کاهش می‌دهند. رشد اندام‌های هوایی تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی کاهش معناداری نشان داد که

تازه تعریف شدند. محتوای فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کورستین اندازه‌گیری و بر اساس میزان معادل میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و

متابولیت‌های آن: فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) بر اساس روش Giannopolitis & Ries (1977) بررسی و جذب عصاره آنزیمی در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی که ۵۰ درصد مهار کاهش نیتروکلرید تترازولیوم در شرایط سنجش را ایجاد می‌کند، تعریف شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) با پیروی از کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس روش Boominathan & Doran (2002) تعیین شد. به منظور تعیین کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6)، عصاره آنزیمی با ۵۰ میلی مولار بافر فسفات (pH=7) همگن و به روش اسپکتروفتومتری با دنبال کردن تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر طبق روش Simon et al. (1974) سنجش شد.

تعیین محتوای روی: محلول هضم شده گیاهی در آب مقطر رقیق و محتوای روی با طیف سنجی انتشار پلاسما- اتمی القایی جفت شده، ICP-AES (INTEGRA XL2, GBC، استرالیا) برآورد شد.

تجزیه و تحلیل HPLC:

تجزیه و تحلیل HPLC: تجزیه و تحلیل HPLC با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Agilent 1290 Santa Clara, CA, HPLC)، آمریکا) با آشکارساز آرایه دیود (DAD) مطابق

پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید با غلظت‌های مختلف اثر سمیت نانوذرات اکسیدروی کاهش داد (شکل ۳).

می‌تواند با افزایش تجمع روی در ریشه و اندام هوایی دانه‌رست‌های تیمار شده با نانوذرات اکسیدروی ارتباط داشته باشد؛ باوجوداین،



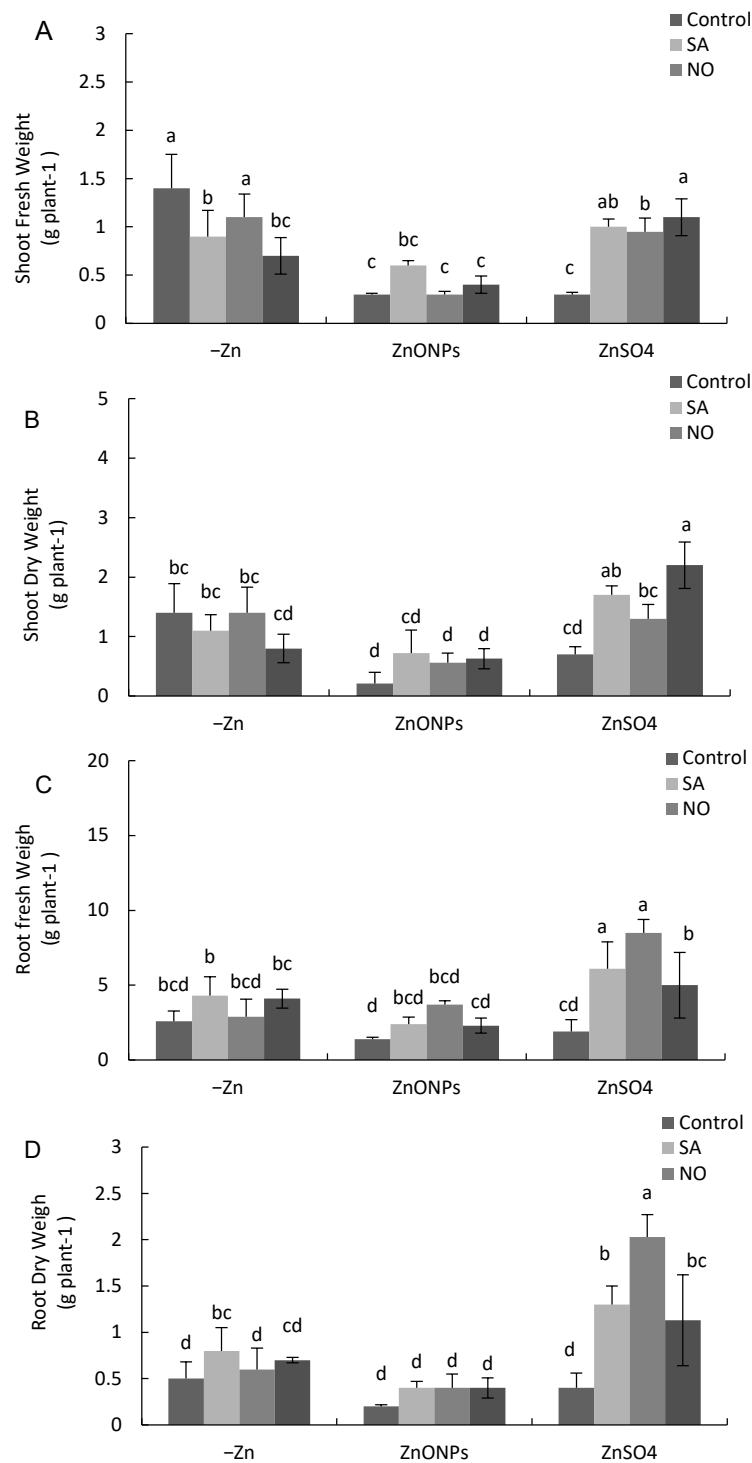
شکل ۱- تأثیر نیتریک‌اکسید و سالیسیلیک‌اسید بر جوانه‌زنی بذر گیاه فلومیس. بذرها به مدت ۱۲ ساعت در غلظت‌های مختلف نیتریک‌اکسید (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) و سالیسیلیک‌اسید (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) خیسانده شدند.

Figure 1- Effect of NO and SA on the germination *Phlomis tuberosa* of seeds. Seeds were exposed to 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 mM SNP or SA for 12 h.



شکل ۲- تأثیر نانوذرات اکسیدروی بر جوانه‌زنی بذر گیاه فلومیس. بذرها به مدت ۴۸ ساعت در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی (۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم برلیتر) خیسانده شدند.

Figure 2- Effect of ZnONPs on the germination of *Phlomis tuberosa* seeds. Seeds were exposed to 0, 5, 50, 100, 1000 and 2000 ppm ZnONPs for 48 h.



شکل ۳- تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر (A) وزن تر اندام‌های هوایی، (B) وزن خشک اندام‌های هوایی، (C) وزن تر ریشه، (D) وزن خشک ریشه گیاه فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجود نداشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 3- Effect of SA and NO addition on the shoot and root fresh and dry weight of *Phlomis tuberosa* under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Bars indicated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD (n=3)

(جدول ۱). مطالعه‌های (Landa et al., 2015) نشان دادند نانوذرات اکسیدروی در گیاهان احتمالاً به جای باقی ماندن در شکل نانوذرات به یون روی تبدیل می‌شوند. مطالعه حاضر نشان داد کاربرد سالیسیلیک‌اسید در گیاهان فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی نسبت به ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید مؤثرتر است. گیاهان پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک‌اسید در رویارویی با تنش نانوذرات اکسیدروی، رشد بهتری را نشان دادند (جدول ۱).

مقدار وزن خشک و تر ریشه تحت تأثیر سولفات‌روی در گیاهان پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید افزایش معناداری نشان داد. تیمار سالیسیلیک‌اسید در گیاهان، سیستم آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کند، رشد و عملکرد گیاه را بهبود می‌بخشد و سبب کاهش آسیب اکسیداتیو در شرایط تنش فلزات سنگین می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2020). در تیمار نانوذرات اکسیدروی و سولفات‌روی، مقدار روی در اندام هوایی و ریشه‌ها افزایش معناداری داشت و این افزایش در تیمار نانوذرات اکسیدروی بیشتر بود

جدول ۱- تأثیر پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید بر مقدار روی (میکروگرم بر گرم) در گیاه فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات‌روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Table 1- Effect of SA and NO addition on the Ag concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) within *Phlomis tuberosa* under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Data of each row within each parameter indicated by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD (n=3).

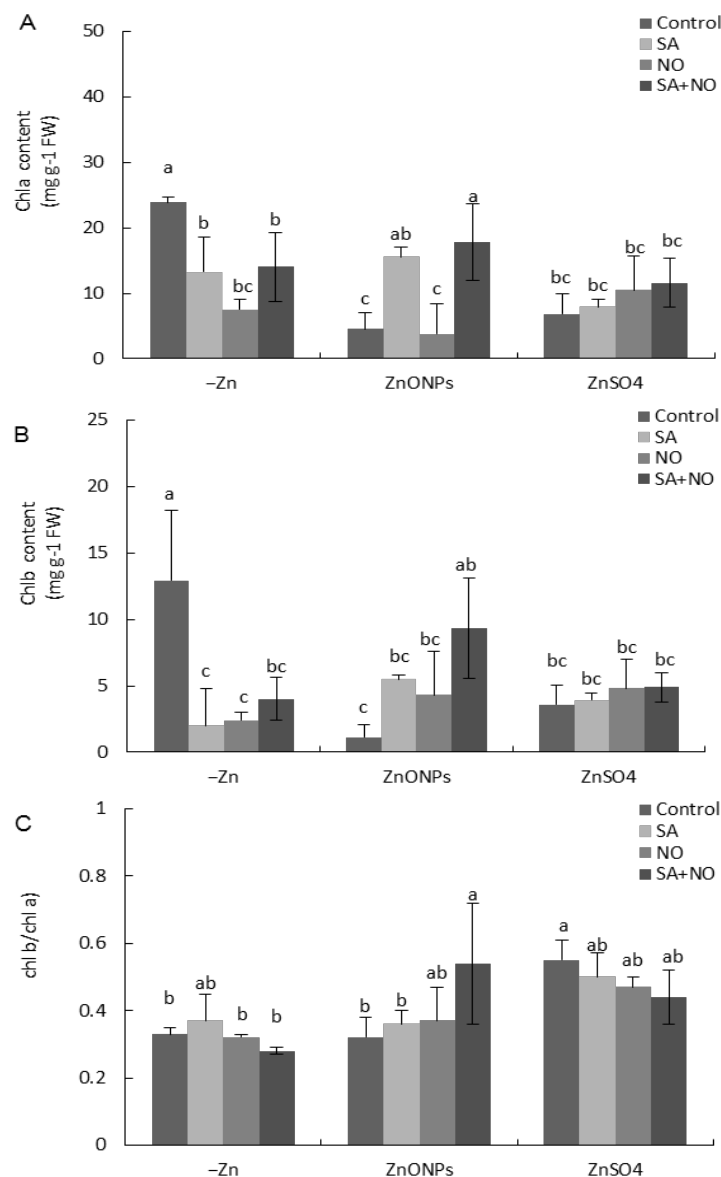
Treatment	Shoot Zn ⁺² concentration	Root Zn ⁺² concentration
Control	0.2 \pm 0.02 ^d	0.97 \pm 0.08 ^c
ZnONPs	5.4 \pm 0.25 ^a	9.7 \pm 0.5 ^b
ZnONPs+SA+NO	3.83 \pm 0.3 ^b	15.3 \pm 1.4 ^a
ZnSO ₄	4.8 \pm 0.5 ^a	4.5 \pm 0.3 ^d
ZnSO ₄ +SA+NO	2.2 \pm 0.16 ^c	6.8 \pm 0.63 ^c

می‌یابد. مقدار کلروفیل برگ خردل (*Brassica juncea* L.) تحت تأثیر تنش نانوذرات اکسیدروی کاهش می‌یابد و این کاهش به طور مثبت با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی مرتبط است (Bhat et al., 2021). در فلومیس توپروزا، افزودن روی سبب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی شد و احتمالاً پدیده یادشده به این دلیل رخ داده است که کلروپلاست‌ها محلی ترجیحی برای تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن هستند و نانوذرات اکسیدروی می‌توانند سبب آسیب شدید

تأثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات‌روی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقدار کلروفیل به عنوان شاخص درخور توجه در زمینه آلودگی و سمیت فلزات سنگین در گیاهان طبقه‌بندی شده است (Mazaheri Tirani et al., 2018). بر اساس نتایج، نانوذرات اکسیدروی و سولفات‌روی سبب کاهش معنادار مقدار کلروفیل a و b در فلومیس شدند (شکل ۴). نتایج مشابه (Ruiz-Torres et al., 2021) با نتایج حاضر نشان دادند با اعمال سولفات‌روی، مقدار کلروفیل در *Coriandrum sativum* کاهش

به غشاهای تیلاکوئید گیاه فلومیس شوند (Du et al., 2017). پیش تیمار سالیسیلیک اسید و ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید، مقدار کلروفیل a و b برگها تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی را بهبود بخشید (شکل ۴). مطابق با نتایج یادشده،

Arshad et al. (2017) نشان دادند کاربرد سالیسیلیک اسید با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در گیاهان، مقدار کلروفیل a و b را در گیاه جو در معرض تنش سرب افزایش می دهد.

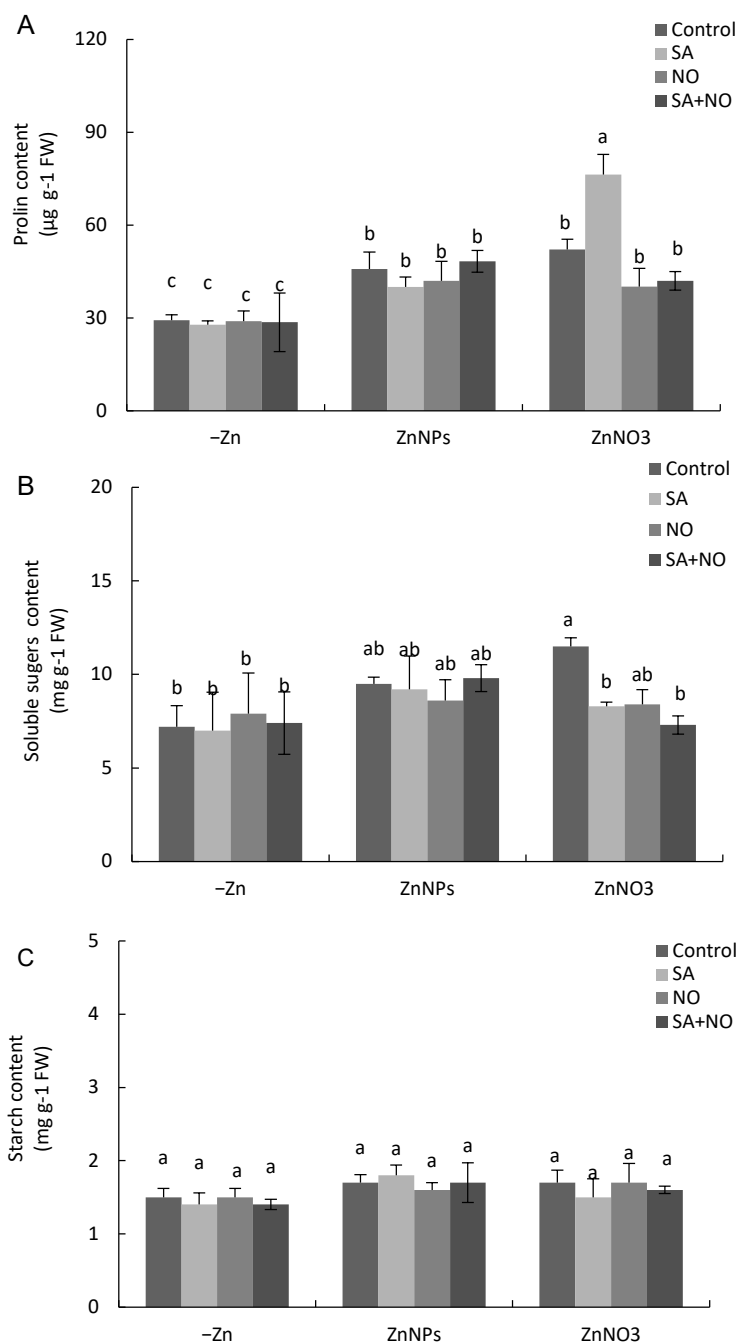


شکل ۴- تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر مقدار (A) کلروفیل a، (B) کلروفیل b، (C) نسبت کلروفیل b به a برگهای گیاه فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار بین میانگینها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می دهند.

Figure 4- Effect of SA and NO addition on the chlorophyll a and b content *Phlomis tuberosa* leaves under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Bars indicated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD ($n=3$)

پرویلین برگ‌ها تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات‌روی افزایش معناداری دارد (شکل ۵).

تأثیر نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی بر مقدار مواد محلول سازگار: نتایج نشان دادند مقدار



شکل ۵- تأثیر پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید بر (A) مقدار پرویلین، (B) قندهای محلول و (C) نشاسته برگ‌های گیاه *فلومیس* در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات‌روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجودنداشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 5- Effect of SA and NO addition on the soluble sugars (mg g^{-1} FW), starch (mg g^{-1} FW) and proline ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) content in *Phlomis tuberosa* leaves under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Bars indicated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD ($n=3$)

مطابقت دارد و می توان نتیجه گرفت این ترکیبات، فلزات سنگین را کلات می کنند و آثار مخرب آنها در سلول را کاهش می دهند. در مطالعه حاضر، افزایش مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها سبب کاهش تنش اکسیداتیو شد (Kaur et al., 2017; Kohli et al., 2018) افزایش فنولها (سیناپیل الکل، کلروژنیک اسید، آسکوربیک اسید و سینامیک اسید) (جدول ۲) و فلاونوئیدها و افزایش همزمان ظرفیت آنتی اکسیدانی در گیاه *فلومیس* پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی بر نقش ترکیبات فنولی به عنوان متابولیت های آنتی اکسیدانی تأکید می کند (Osama et al., 2019; Abbasi et al., 2020). افزودن نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی، تولید گونه های فعال اکسیژن در گیاه *فلومیس* را افزایش داد و فعالیت های آنزیمی تحت تأثیر روی قرار گرفتند؛ هرچند آثار بسته به آنزیم متفاوت بودند. فعالیت آنزیم کاتالاز برگ های تحت تأثیر سولفات روی کاهش معناداری نشان داد (شکل ۷). نتایج یادشده با نتایج Panda et al. (2017) مطابقت دارند؛ آنها نشان دادند نانوذرات اکسیدروی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را کاهش می دهند و آنزیم کاتالاز را غیرفعال می کنند. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ ها تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی افزایش معناداری نشان داد (شکل ۷). مطابق با یافته های یادشده، Mostofa et al. (2015) نشان دادند در برنج (*Oryza sativa* L.) تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

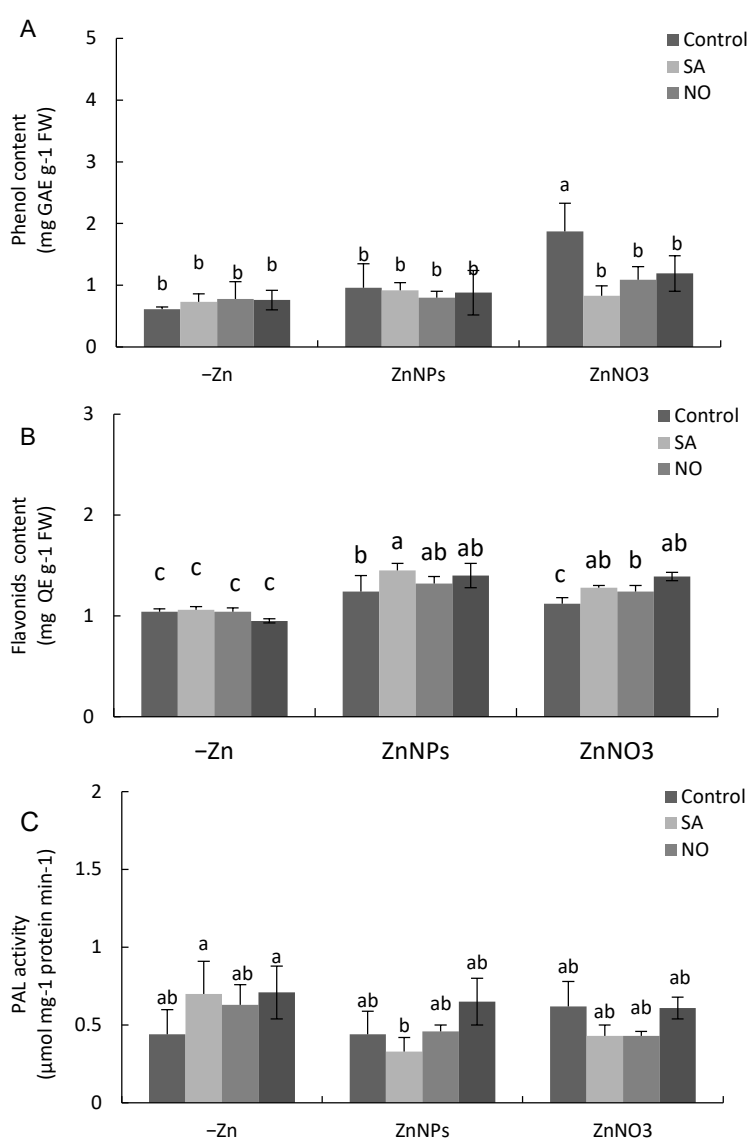
بسیاری از گیاهان، زمانی که در معرض تنش شوری قرار می گیرند، پرولین را به عنوان جاروکننده گونه های فعال اکسیژن (ROS) و تنظیم کننده اسمزی تجمع می دهند (Chun et al., 2018). در مطالعه حاضر مشاهده شد پیش تیمار سالیسیلیک اسید سبب افزایش مقدار پرولین در تیمار سولفات روی می شود. Faraz et al. (2020) نتایج مشابه با نتایج یادشده را گزارش کردند؛ آنها نشان دادند سالیسیلیک اسید در افزایش سطح پرولین طی تنش فلزات سنگین نقش دارد. قندها، کربوهیدرات های محلول در آبی هستند که در تحمل گیاهان نسبت به تنش نقش دارند (Keunen et al., 2013). در یافته های حاضر، تیمار سولفات روی سبب افزایش معنادار قندهای محلول در برگ های *فلومیس* شد (شکل ۵). قندهای محلول به عنوان ترکیبات سازگار، تحمل گیاه در شرایط نامساعد محیطی را افزایش می دهند (Estaji & Niknam, 2020). در مطالعه حاضر، احتمالاً افزایش معنادار مقدار پرولین تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی می تواند به تحمل تنش در گیاه *فلومیس* کمک کند.

تأثیر نانوذرات اکسیدروی و یون های روی در

فعالیت آنتی اکسیدانی، مقدار فنول و فلاونوئید: در مطالعه حاضر، مقدار فلاونوئید برگ ها تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی و مقدار فنول برگ ها تحت تأثیر سولفات روی بیشترین افزایش معنادار را نشان دادند (شکل ۶). در پژوهش حاضر، تیمار سولفات روی به تنهایی مقدار فنول را در گیاه *فلومیس* افزایش داد که با پژوهش Michalak (2010)

آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ فلومیس می‌شوند. در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برگ‌ها تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی افزایش معناداری نشان داد (شکل ۷)؛ به‌طور مشابه، پراکسیداسیون لیپیدی پنبه همراه با افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی (فعالیت سوپراکسیددیسموتاز) کاهش یافت (Venkatachalam et al., 2017).

افزایش می‌یابد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دلیل واکنش مثبت گیاهان برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد؛ هرچند هنگامی که رادیکال‌های آزاد ناشی از این سمیت مهارپذیر نباشند، سازوکارهای دفاع آنتی‌اکسیدانی مختل می‌شوند (Bhaduri and Fulekar, 2012). حقایق یادشده توضیح می‌دهند چرا نانوذرات اکسیدروی سبب مهار فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش فعالیت



شکل ۶- تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر مقدار (A فنول، B فلاونوئیدها، C) فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز برگ‌های فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 6- Effect of SA and NO addition on the total phenol and flavonoids content, and the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in *Phlomis tuberosa* leaves under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Bars indicated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD (n=3)

جدول ۲- تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر مقدار فنول (میلی گرم بر میلی لیتر) برگ‌های فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجودداشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Table 2- Effect of SA and NO addition on the content of phenolics (mg ml⁻¹) in leaves of *Phlomis tuberosa* under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Data of each row within each parameter indicated by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD (n=3)

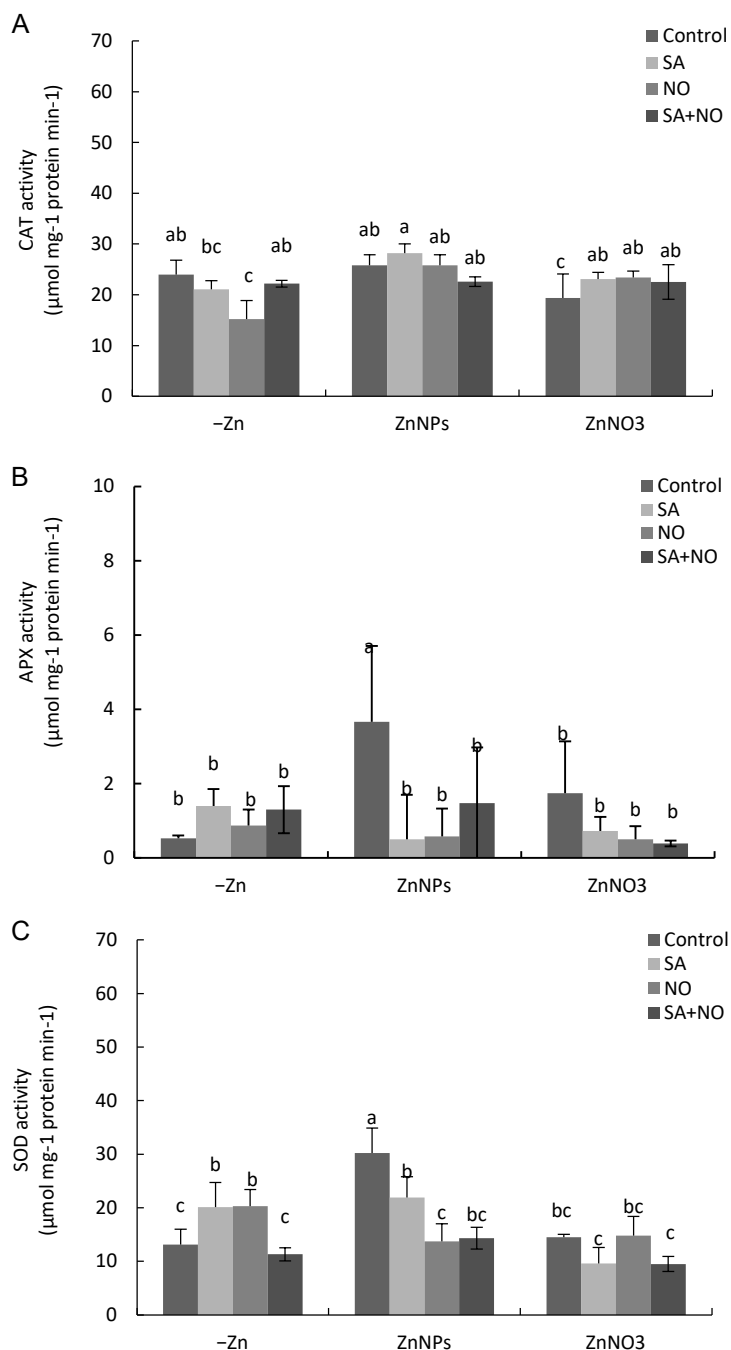
Treatment	Sinapyl alcohol	Chlorogenic acid	Ascorbic acid	Cinnamic acid
Control	0.17 \pm 0.02 ^c	0.001 \pm 0.00 ^c	1.64 \pm 0.06 ^d	0.024 \pm 0.00 ^c
SA	0.38 \pm 0.06 ^a	0.022 \pm 0.003 ^b	2.62 \pm 0.16 ^{ab}	0.033 \pm 0.002 ^{dc}
NO	0.16 \pm 0.01 ^c	0.023 \pm 0.004 ^b	1.75 \pm 0.09 ^d	0.023 \pm 0.003 ^c
SA+NO	0.17 \pm 0.04 ^c	0.014 \pm 0.003 ^{bc}	2.26 \pm 0.04 ^{bc}	0.042 \pm 0.005 ^{bcd}
ZnONPs	0.11 \pm 0.01 ^{cd}	0.023 \pm 0.007 ^b	2.07 \pm 0.17 ^{cd}	0.039 \pm 0.005 ^{cd}
ZnONPs+SA	0.29 \pm 0.03 ^b	0.082 \pm 0.01 ^a	3.05 \pm 0.24 ^a	0.072 \pm 0.005 ^a
ZnONPs+NO	0.04 \pm 0.008 ^d	0	2.92 \pm 0.25 ^a	0.052 \pm 0.005 ^b
ZnONPs+SA+NO	0.18 \pm 0.02 ^c	0	1.67 \pm 0.15 ^d	0.048 \pm 0.005 ^{bc}

داد (شکل ۸). مطالعه‌های پیشین نشان دادند غلظت پراکسید هیدروژن در بافت‌های گیاهی به دلیل جذب فلزات سنگین افزایش می‌یابد (Perveen et al., 2020). Ruiz-Torres et al. (2021) نشان دادند جذب بیشتر روی از طریق ریشه و انتقال آن به اندام‌های هوایی در تیمار سولفات روی با غلظت زیاد سبب ایجاد تنش در گیاهان و تجمع بیشتر پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. مقدار پراکسید هیدروژن برگ‌های پیش تیمار شده با نیتریک اکسید در شرایط تنش سولفات روی کاهش یافت؛ مطابق با این نتایج، Wang et al. (2013) نشان دادند سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید پراکسیداسیون لیپیدی و تجمع پراکسید هیدروژن در تنش فلزات سنگین را کاهش می‌دهند. در گیاهانی که در معرض نانوذرات

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ‌ها تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی در گیاهان پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید، افزایش معناداری نشان داد. Lu et al. (2018) نتایج مشابه با نتایج یاد شده گزارش کردند؛ آنها نشان دادند سالیسیلیک اسید فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش و فعالیت آسکوربات پراکسیداز را کاهش می‌دهد. سالیسیلیک اسید به عنوان مولکول سیگنال به طور مستقیم یا غیرمستقیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ghassemi-Golezani et al., 2020). به منظور درک بهتر سمیت سلولی نانوذرات، مقدار پراکسید هیدروژن در برگ‌های فلومیس اندازه‌گیری شد و مقدار پراکسید هیدروژن تحت تأثیر سولفات روی، افزایش معناداری نشان

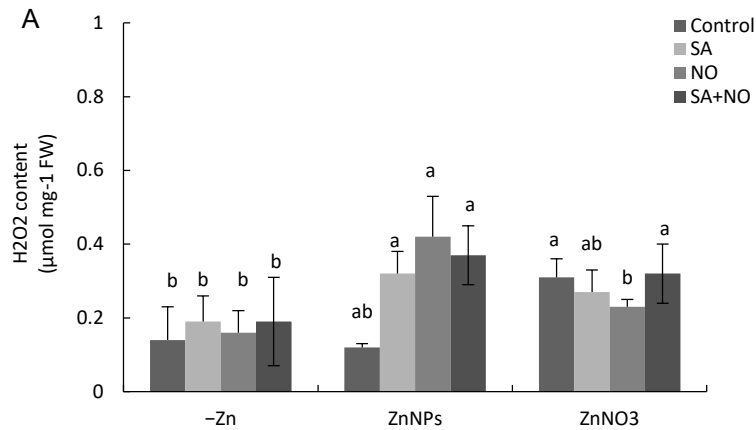
سالیسیلیک‌اسید در کاهش تنش اکسیداتیو تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی یا سولفات روی نقش دارد.

اکسیدروی یا سولفات روی قرار گرفتند، سالیسیلیک‌اسید سبب افزایش مقدار پرولین و به موازات آن، کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در گیاه فلومیس شد. نتایج نشان دادند



شکل ۷- تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اسید بر (A) کاتالاز (CAT)، (B) آسکوربات پراکسیداز (APX)، (C) فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) برگ‌های گیاه فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجود داشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 7- Effect of SA and NO addition on the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in *Phlomis tuberosa* leaves under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Bars indicated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD (n=3)



شکل ۸- تأثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید بر مقدار پراکسید هیدروژن (H₂O₂) برگ‌های گیاه فلومیس در معرض تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی. مقادیر، میانگین ۳ تکرار \pm SD (انحراف معیار) هستند. حروف یکسان، وجود داشتن اختلاف معنادار بین میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون توکی را نشان می‌دهند.

Figure 8- Effect of SA and NO addition on the concentration of nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂) in *Phlomis tuberosa* leaves under ZnONPs or ZnSO₄-stressed conditions. Bars indicated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). Values are the mean \pm SD (n=3)

نانوذرات اکسیدروی افزایش معناداری نشان دادند. بیشترین اثر پیش تیمار بذرها با سالیسیلیک اسید تحت تأثیر تنش روی با تجمع ترکیبات فنولی (سیناپیل الکل، کلروژنیک اسید، آسکوربیک اسید، سینامیک اسید) و فلاونوئید، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز) و افزایش پرولین به دست آمد. سالیسیلیک اسید ممکن است عملکرد مهمی در افزایش یکپارچگی غشاها با کنترل عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی داشته باشد.

جمع بندی

در پژوهش حاضر، تأثیر پیش تیمار بذرها با سالیسیلیک اسید، نیتریک اکسید و ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتریک اکسید در غلظت ۰/۱ میلی مولار بر شاخص‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی فلومیس تحت تأثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مطالعه شد و نتایج کلی زیر به دست آمدند: نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به دلیل افزایش مقدار روی، پراکسیداسیون لیپیدی، پراکسید هیدروژن و تنش اکسیداتیو سبب کاهش معنادار رشد گیاه شدند. مقدار ترکیبات سیناپیل الکل، کلروژنیک اسید، آسکوربیک اسید و سینامیک اسید برگ‌های پیش تیمار شده با سالیسیلیک اسید تحت تأثیر

References

Abbasi, B. H., Ullah, M. A., Nadeem, M., Tungmunnithum, D., & Hano, C. (2020). Exogenous application of salicylic acid and gibberellic acid on biomass accumulation, antioxidant and anti-inflammatory secondary

- and *Products*, 145, 112098. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112098>.
- Arif, Y., Sami, F., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment. *Journal of Environmental and Experimental Botany*, 175, 104040. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104040>.
- Arshad, T., Maqbool, N., Javed, F., Wahid, A., & Arshad, M. U. (2017). Enhancing the defensive mechanism of lead affected barley (*Hordeum vulgare L.*) genotypes by exogenously applied salicylic acid. *Journal Agricultura Science*, 9(2), 139-146.
- Bahaduri, A. M., & Fulekar, M. H. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11(1), 55-69.
- 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.
- Bhat, U. H., Sami, F., Siddiqui, H., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2021). Nitric Oxide Alleviates Zinc Oxide Nanoparticles-Induced Phytotoxicity in *Brassica juncea*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(3), 559-568.
- Boominathan, R., & Doran, P. M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytologist*, 156(2), 205-215.
- Chen, J., Liu, X., Wang, C., Yin, S. S., Li, X. L., Hu, W. J., ... & Zheng, H. L. (2015). Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles-induced phytotoxicity in rice seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.077>
- metabolites production in multiple shoot culture of *Ajuga integrifolia* Buch. Ham. ex D. Don. *Journal of Industrial Crops*
- Chun, S. C., Paramasivan, M., & Chandrasekaran, M. (2018). Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Journal of Frontiers in Microbiology*, 9, 2525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02525>.
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C., & Feijo, J. A. (2015). Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular Plant*, 8(4), 506-520. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.010>.
- Du, W., Tan, W., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Ji, R., Yin, Y., & Guo, H. (2017). Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: physiological and biochemical aspects. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 210-225. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.024>.
- Estaji, A., & Niknam, F. (2020). Foliar salicylic acid spraying effect on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum L.* plant. *Journal of Agricultural Water Management*, 234, 106116. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106116>.
- Faraz, A., Faizan, M., Sami, F., Siddiqui, H., & Hayat, S. (2020). Supplementation of salicylic acid and citric acid for alleviation of cadmium toxicity to *Brassica juncea*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 641-655. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10007-0>.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 59(2), 309-314.

- Ghassemi-Golezani, K., Hassanzadeh, N., Shakiba, M. R., & Esmailpour, B. (2020). Exogenous salicylic acid and 24-epi-brassinolide improve antioxidant capacity and secondary metabolites of *Brassica nigra*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *26*, 101636. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2020.101636>.
- Ghasemifar, E. L. H. A. M., Habibi, G. H. A. D. E. R., & Bakhshi-Khaniki, G. (2022). Pretreatment with salicylic acid and nitric oxide mitigated silver nanoparticles toxicity and enhanced their removal in medicinal *Phlomis tuberosa* plants. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, *64*(2). <https://doi.org/10.24425/abcsb.2022.143380>.
- Habibi, G., & Rostampoor, F. (2020). Copper-stress tolerance induced in *Phlomis tuberosa* depends on nitric oxide accumulation. *Journal of Plant Process and Function*, *9*(38), 61-76 [In Persian].
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., ... & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, *9*(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>.
- Ignatenko, A., Talanova, V., Repkina, N., & Titov, A. (2019). Exogenous salicylic acid treatment induces cold tolerance in wheat through promotion of antioxidant enzyme activity and Proline accumulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, *41*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2872-3>.
- Javzan, S., & Selenge, D. (2013). Phytochemical study of aerial parts from *Phlomis tuberosa* L. *Mongolian Journal of Chemistry*, *14*, 20 -24.
- Kotapati, K. V., Palaka, B. K., & Ampasala, D. R. (2017). Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. *The Crop Journal*, *5*(3), 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.09.002>.
- Kaur, R., Yadav, P., Sharma, A., Thukral, A. K., Kumar, V., Kohli, S. K., & Bhardwaj, R. (2017). Castasterone and citric acid treatment restores photosynthetic attributes in *Brassica juncea* L. under Cd (II) toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *145*, 466-475. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.067>.
- Keunen, E. L. S., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W. I. M., & Cuypers, A. N. N. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment*, *36*(7), 1242-1255.
- Kohli, S. K., Handa, N., Bali, S., Arora, S., Sharma, A., Kaur, R., & Bhardwaj, R. (2018). Modulation of antioxidative defense expression and osmolyte content by co-application of 24-epibrassinolide and salicylic acid in Pb exposed Indian mustard plants. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.051>.
- Landa, P., Prerostova, S., Petrova, S., Knirsch, V., Vankova, R., & Vanek, T. (2015). The transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* to zinc oxide: a comparison of the impact of nanoparticle, bulk, and ionic zinc. *Journal of Environmental Science & Technology*, *49*(24), 14537-14545.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of

- leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans*, *11*, 591-592.
- Lu, Q., Zhang, T., Zhang, W., Su, C., Yang, Y., Hu, D., & Xu, Q. (2018). Alleviation of cadmium toxicity in *Lemna minor* by exogenous salicylic acid. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 500-508. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.015>.
- Mahajan, P., Dhoke, S. K., Khanna, A. S., & Tarafdar, J. C. (2011). Effect of nano-ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. *Applied Biological Research*, *13*(2), 54-61.
- Magne, C., Saladin, G., & Clement, C. (2006). Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera*. *Chemosphere*, *62*(4), 650-657.
- Mazaheri Tirani, M., Madadkar-Haghjou, M., Sulieman, S., & Ismaili, A. (2018). Comparative evaluation of zinc oxide effects on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown in different media. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *20*(4), 787-802.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, *15*(4).
- Molnár, Á., Papp, M., Kovács, D. Z., Béteky, P., Oláh, D., Feigl, G., ..., & Kolbert, Z. (2020). Nitro-oxidative signaling induced by chemically synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) in *Brassica* species. *Chemosphere*, *251*, 126419. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126419>.
- Mosquera-Sánchez, L. P., Arciniegas-Grijalba, P. A., Patiño-Portela, M. C., Guerra-Sierra, B. E., Muñoz-Florez, J. E., & Rodríguez-Páez, J. E. (2020). Antifungal effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on *Colletotrichum sp.*, causal agent of anthracnose in coffee crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *25*, 101579. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101579>.
- Mostofa, M. G., Fujita, M., & Tran, L. S. P. (2015). Nitric oxide mediates hydrogen peroxide-and salicylic acid-induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, *77*(3), 265-277. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0061-y>.
- Osama, S., El Sherei, M., Al-Mahdy, D. A., Bishr, M., & Salama, O. (2019). Effect of salicylic acid foliar spraying on growth parameters, γ -pyrones, phenolic content and radical scavenging activity of drought stressed *Ammi visnaga* L. plant. *Journal of Industrial Crops and Products*, *134*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.035>.
- Panda, K. K., Golari, D., Venugopal, A., Achary, V. M. M., Phaomei, G., Parinandi, N. L., ... & Panda, B. B. (2017). Green synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage in *Lathyrus sativus* L. root bioassay system. *Antioxidants*, *6*(2), 35. <https://doi.org/10.3390/antiox6020035>.
- Perveen, S., Saeed, M., Parveen, A., Javed, M. T., Zafar, S., & Iqbal, N. (2020). Modulation of growth and key physiobiochemical attributes after foliar application of zinc Sulphate (ZnSO₄) on wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium (Cd) stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *26*(9), 1787-1797. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00861-8>.
- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I. O., Rawat, S., Kim, B., Barrios, A. C., Medina-Velo, I. A., ... & Gardea-Torresdey, J. L. (2018). Finding the conditions for the

- beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review. *Journal of Environmental Pollution*, 241, 1175-1181.
- Quentin, A. G., Pinkard, E. A., Ryan, M. G., Tissue, D. T., Baggett, L. S., Adams, H. D., ... & Woodruff, D. R. (2015). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology*, 35(11), 1146-1165. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.036>.
- Ruiz-Torres, N., Flores-Naveda, A., Barriga-Castro, E. D., Camposeco-Montejo, N., Ramírez-Barrón, S., Borrego-Escalante, F., ... & García-López, J. I. (2021). Zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate impact physiological parameters and boosts lipid peroxidation in soil grown coriander plants (*Coriandrum sativum*). *Molecules*, 26(7), 1998. <https://doi.org/10.3390/molecules26071998>.
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015). Role of nanoparticles in plants. *Nanotechnology and plant sciences: nanoparticles and their impact on plants*, 19-35.
- Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E., & Matkovics, B. (1974). Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 166(5-6), 387-392.
- Sinrod, A. J., Avena-Bustillos, R. J., Olson, D. A., Crawford, L. M., Wang, S. C., & McHugh, T. H. (2019). Phenolics and antioxidant capacity of pitted olive pomace affected by three drying technologies. *Journal of Food Science*, 84(3), 412-420. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14447>.
- Tripathi, D. K., Mishra, R. K., Singh, S., Singh, S., Vishwakarma, K., Sharma, S., ... & Chauhan, D. K. (2017). Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles Phytotoxicity in wheat seedlings: implication of the ascorbate-glutathione cycle. *Journal of Frontiers in Plant Science*, 8, 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00001>.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P., Geetha, N., ... & Sahi, S. V. (2017). Enhanced plant growth promoting role of Phycocomolecules coated zinc oxide nanoparticles with P supplementation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.004>.
- Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S., ... & Li, S. H. (2010). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biology*, 10, 1-10.
- Wang, W. N., Tarafdar, J. C., & Biswas, P. (2013). Nanoparticle synthesis and delivery by an aerosol route for watermelon plant foliar uptake. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(1), 1-13.
- Zengin, F. (2014). Exogenous treatment with salicylic acid alleviating copper toxicity in bean seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84, 749-755.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H., & Luo, J. P. (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of*

- Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518-1529.
- Zoufan, P., Baroonian, M., & Zargar, B. (2020). ZnO nanoparticles-induced oxidative stress in *Chenopodium murale L.*, Zn uptake, and accumulation under hydroponic culture. *Journal of Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 11066-11078. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07735-2>.
- Zucker, M. (1965). Induction of phenylalanine Deaminase by light and its relation to Chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 40(5), 779-784.