




<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>  
Journal of Plant Biological Sciences  
E-ISSN: 2322-2204  
Vol. 15, Issue, No. 2, Summer 2023  
Document Type: Research Paper  
Received: 07/10/2023 Accepted: 05/05/2024

## Study of the effects of synthesized iron nanoparticle and salicylic acid on change of morphological and physiological characteristics of *Calotropis procera* seedlings

Fatemeh Adabavazeh<sup>1\*</sup>, Roya Razavizadeh<sup>2</sup>, Shahram Pourseyedi<sup>3\*</sup>   
Nazi Nadernejad<sup>1</sup>, Hossein Mozafari<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

<sup>4</sup> Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

### Abstract

*Calotropis procera* is a perennial shrub with high levels of terpenoids that is known as a medicinal plant with antimicrobial, anti-inflammatory, anti-cancer, and antioxidant activity. The present study aimed to improve the growth, physiological parameters, and essential oils of *C. procera* under synthesized magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) treatments. For this purpose, 21-day-old seedlings grown under hydroponic conditions were treated with five levels of MNPs (0, 50, 100, 150, and 200 mg L<sup>-1</sup>) and three SA concentrations (0.0, 0.05, 0.1 mM). Two weeks after treatment, the results showed that MNPs combined with SA have more ability than all other treatments to improve growth, physiological parameters, and essential oil in *C. procera* seedlings. 200 mg L<sup>-1</sup> MNPs combined with 0.1 mM SA had a more pronounced impact increasing chlorophyll a and total, carotenoids, soluble sugars, protein, and the activity of ascorbate peroxidase and catalase. At this concentration, electrolyte leakage, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and malondialdehyde content showed a significant reduction as compared to the control. In an evaluation of the contents of essential oils using GC-MS, it was also found that citronellal,  $\alpha$ -terpineol, alpha-pinene, camphor, linalool, geranial,  $\alpha$ -phellandrene, 1,8-cineol, and  $\beta$ -ocymene were the main components of the essential oils, and the applied treatments resulted in significant changes in the amount of them. These results suggest that 200 mg L<sup>-1</sup> MNPs combined with the highest concentration of SA is a powerful elicitor for improving plant growth and yield.

\* Corresponding Author: f.adabavazeh@sci.uk.ac.ir, spseyedi@uk.ac.ir



## Introduction

*Calotropis procera*, widely known as stabragh, is a multipurpose plant belonging to the Apocynaceae family that is used for medicine, fodder, fiber, phytoremediation, and fuel purposes. Stabragh is a great source of terpenoids, flavonoids, and alkaloids, which are related to its medicinal and industrial properties. Despite the socio-economic importance of stabragh, no previous study has been performed regarding improving bioactive compound production and antioxidant activities of stabragh. Hence, this study aimed to set up a reproducible alternative protocol for the improvement and fast production of these valuable compounds in high quantities. Recently, the successful use of abiotic factors as elicitors has been reported for the increase of secondary metabolites in plant cultures. Iron oxide nanoparticles with a special surface cover of magnetic particles (MNPs) are also known to play the same role. Moreover, the exogenous application of salicylic acid (SA) is another practicable approach to promote secondary metabolism due to its signaling role in regulating the expression of critical genes of the stress defense pathway and maintaining ROS at an optimal level. Thus, in this study, SA was used as an abiotic elicitor along with MNPs to boost the physiological and biochemical characteristics of stabragh, as well as minimize possible adverse effects of MNPs.

## Material and Method

Seeds of stabragh were collected from wild-growing plant populations in Shahdad (Kerman province, Iran). Here, hydroponic culture was considered for seedlings growth as a feasible alternative to traditional soil cultivation not only for having a large scale of uniform seedlings with high percentage of bioactive substances but also for faster growth. Furthermore, to avoid any possible toxicity of synthetic NPs, synthesized MNPs using leaf extract of stabragh with an average size of about 11 nm were used (Adabavazeh et al. 2022). The experiment was a 3\*5 factorial in a completely random design involving three levels of SA treatment and five levels of MNPs with three replications per treatment, each repetition consisting of one explant. For this purpose, the sterilized seeds germinated on moist filter paper in petri dishes at 25°C. After 10 days, uniform seedlings were transferred to the hydroponic system with ½ Hoagland solution and were grown in the growth chamber. After the emergence of 4 to 6 leaves of the plant, different concentrations (0, 50, 100, 150, and 200 mg L<sup>-1</sup>) of MNPs were sprayed on the leaves (seven times for two weeks to avoid leaf damage). Different concentrations of SA (0, 0.05, and 0.1 mM) were added to the Hoagland solution. After two weeks, the morphological, physiological parameters, and the main essential oils were measured.

## Result and Discussion

This study confirmed that the additions of MNPs at 200 mg L<sup>-1</sup> could increase the growth parameters, chlorophyll, soluble sugar, and protein contents as well as absorption of essential nutrients, except for the root length. The enhanced seedlings' growth with MNPs could be related to increase in chlorophyll, soluble sugar, and protein contents. It is speculated that MNPs may have potentially increased these parameters by supplying sufficient Fe<sup>2+</sup>. Iron is an intermediary for the electron transmission chain, biosynthesis of cytochromes, synthesizing NADP<sup>+</sup> in photosynthesis, contributing to the synthesis of 5-aminolevulinic acid - the precursor of chlorophyll, which has a positive influence on plant growth and productivity. Moreover, iron as an enzyme cofactor, which plays an important role in electron transfer and

catalysis can affect the metabolism of sugars and nitrogen and increase the production of sugars and protein. However, MNPs were substantially more effective when applied with SA. Also, a reduction in electrolyte leakage, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and MDA contents was achieved under 200 mg L<sup>-1</sup> MNPs with 0.1 SA treatments. It is assumed that MNPs may have potentially lowered the oxidative damage either by intrinsic enzyme peroxidase-like activity or activation of the cellular enzymes, especially APX via the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling pathway. SA may also increase antioxidant activity and polyamines, which help to inhibit membrane injury by retarding lipid peroxidation and preserving membrane integrity. Another important finding of this research was greater production of geranial, 1, 8-cineol,  $\alpha$ -phellandrene, citronellal, camphor, and terpinen-4-ol contents as the main essential oils in stabragh under 200 mg L<sup>-1</sup> MNPs with 0.1 SA. The rise in essential oil contents may be attributed to an increase in soluble sugar contents and the activation of genes related to the biosynthetic pathway of the specific secondary metabolite.

### **Conclusion**

The results of this study confirm that the synthesized MNPs can serve as a favorable excipient for the improvement of both growth and valuable secondary metabolites, especially when combined with SA.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, *Calotropis procera*, Essential oils, Iron oxide nanoparticles, Physiological responses, Salicylic acid

## بررسی تأثیر نانوذره اکسید آهن مغناطیسی سنتز شده و سالیسیلیک اسید بر تغییر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های استبرق (*Calotropis procera*)

فاطمه ادب‌آوازه<sup>۱\*</sup>، رویا رضوی زاده<sup>۲</sup>، شهرام پورسیدی<sup>۳\*</sup> ID، نازی نادرزاد<sup>۱</sup>، حسین مظفری<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

<sup>۴</sup> گروه اکولوژی، پژوهشکده علوم و فناوری عالی و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

### چکیده:

استبرق (*Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton) درختچه‌ای چندساله با سطوح بالایی از ترپنوئیدها می‌باشد که به عنوان یک گیاه دارویی موثر در پزشکی و صنعت شناخته شده است. پژوهش حاضر با هدف بهبود رشد، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مواد مؤثره استبرق تحت تیمار نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن سنتز شده و سالیسیلیک اسید انجام شد. برای این منظور، گیاهچه‌های ۲۱ روزه رشد یافته در شرایط هیدروپونیک با پنج سطح نانوذرات مغناطیسی (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سه غلظت سالیسیلیک اسید (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) تیمار شدند. دو هفته پس از تیماردهی، نتایج نشان داد نانوذرات مغناطیسی سنتز شده همراه با سالیسیلیک اسید توانایی بیشتری نسبت به سایر تیمارها در بهبود رشد، پارامترهای فیزیولوژیکی و تولید اسانس‌ها در گیاهچه‌های استبرق داشتند. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات همراه با ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر را در افزایش رشد، میزان عناصر، میزان کلروفیل a و کل، کاروتنوئیدها، قندهای محلول، پروتئین، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز داشت. همچنین در این سطح از تیمار، میزان نشت یونی،  $H_2O_2$  و محتوای مالون‌دی‌آلدئید نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در بررسی محتویات اسانس با دستگاه گاز کروماتوگراف جرم‌سنجی (GC/MS) نیز مشخص شد که سیترونال،  $\alpha$ -ترپینول، آلفا-پینن، کافور، لینالول، ژرانیال، A-فلاندین، ۱،۸-سیننول و بتاوسیمین اجزای اصلی اسانس‌ها را تشکیل می‌دهند و تیمارهای اعمال شده سبب تغییرات قابل توجهی در میزان اسانس‌ها شدند. این نتایج نشان می‌دهد که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات همراه با ۰/۱ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید محرک قدرتمندی برای بهبود رشد و عملکرد گیاه است.

**واژه‌های کلیدی:** استبرق، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پاسخ‌های فیزیولوژیکی، سالیسیلیک اسید، ترپنوئیدها، نانوذرات اکسید آهن

\* نگارنده مسؤل: نشانی پست الکترونیک: spseyedi@uk.ac.ir, f.adabavazeh@sci.uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۹۱۳۳۴۳۰۳۸۹



## مقدمه

استبرق با نام علمی *Calotropis procera* Aiton. درختچه‌ای چندساله و همیشه‌سبز از خانواده‌ی خرزهره‌ایان (Apocynaceae) است که عمدتاً در مناطق خشک و نیمه‌خشک رشد می‌کند. استبرق، یک گیاه چندمنظوره است که به علت داشتن سطوح بالایی از متابولیت‌های ثانویه خاص در پزشکی، تولید سوخت‌های زیستی، تهیه الیاف، علوفه و الوار و همچنین در گیاه‌پالایی و برای سنتز انواع نانوذرات مورد توجه بسیار قرار گرفته است (Kaur et al., 2021). این گیاه در طب سنتی نیز به‌عنوان داروی ضداسهال، ضدالتهاب، ضد میکروب، ضد آسم و ضد درد استفاده می‌شود (Choedon et al., 2006). بنابراین با توجه به اهمیت دارویی و صنعتی استبرق، حفاظت از گیاه و ایجاد دستورالعمل‌های قابل تکرار و دائمی برای تولید هر چه بیشتر متابولیت‌های ثانویه آن ضروری به نظر می‌رسد.

امروزه، استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی در محیط‌های کشت به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راهکارهای افزایش تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه اتخاذ شده‌است. آهن، به‌عنوان یکی از ریزمغذی‌های ضروری برای سلامت گیاهان و عنصری غیرقابل جایگزین تقریباً در همه‌ی موجودات زنده می‌باشد که در بررسی‌های اخیر مشخص شده است اعمال آن به‌صورت برون‌زا در محیط‌های کشت می‌تواند از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و با ایجاد تنش اکسیداتیو، به‌عنوان یک محرک قوی در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه عمل کند (Sharma et al., 2012). با این حال، پژوهش‌های پیشین به‌خوبی نشان داده است که نانوذرات اکسید آهن نسبت به

فرم اولیه فلز، به علت اندازه کوچک، سطح ویژه بزرگ، واکنش‌پذیری بالا، حمل و نقل درون سلولی زیاد و قابلیت جذب می‌توانند به‌سرعت و به‌طور کامل توسط گیاهان جذب شوند و ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی متفاوتی را نشان دهند که در شکل معمول آن‌ها وجود ندارد (Sun et al., 2015). پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد نانوذرات اکسید آهن در فعال کردن متابولیسم ثانویه و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش مقاومت در برابر تنش‌ها تاثیر دارد (Khan et al., 2021; Moharrami et al., 2017). همچنین، نانوذرات سبب افزایش رشد و محتوای کلروفیل در گیاهان می‌شود (Tawfik et al., 2021). با پتانسیل امیدوارکننده نانوذرات اکسید آهن، به نظر می‌رسد می‌تواند جایگزین آهن معمولی در محیط‌های کشت گیاهی شوند. با وجود این، در استفاده از این نانوذرات چندین چالش مهم وجود دارد. خاصیت مغناطیسی بالا، غلظت و اندازه نانوذرات، چگونگی افزودن نانوذرات، زمان افزودن آن به محیط کشت و مدت زمان مواجهه نمونه با آن از جمله این چالش‌ها و از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده‌ی اثرات الیستور بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه است که باید مورد توجه قرار گیرند (Ma et al., 2010; Kornarzyński et al., 2020). سالیسیلیک اسید نیز یک ترکیب فنول طبیعی و از تنظیم‌کننده‌های رشد درون‌زا است که بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند اعمال برون‌زای آن، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی را افزایش می‌دهد و با حفظ گونه‌های فعال اکسیژن در سطح بهینه می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد (Koo et al., 2020). از این رو، تصور می‌شود

رطوبت ۹۸-۹۵٪ نگهداری شد. ۱۰ روز پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، گیاهچه‌های یک‌شکل به فالكون‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی ۱/۲ هو گلند منتقل و در اتاق کشت با شرایط گفته شده نگهداری شدند. گیاهچه‌های ۲۱ روزه که به مرحله شش برگی رسیدند به فالكون‌های حاوی محلول غذایی ۱/۲ هو گلند همراه با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌مولار) منتقل شدند. همزمان غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید آهن (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر روی برگ‌ها اسپری شد؛ برای جلوگیری از آسیب برگ‌ها، اسپری در طول دو هفته به صورت یک روز در میان انجام شد (Bastani et al., 2018). در پژوهش حاضر، از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن سنتز شده به روش هم‌رسوبی با عصاره برگ گیاه استبرق، کلرید آهن (III) و آهن (II) به‌عنوان پیش‌ساز در اندازه ذرات ۱۱ نانومتر استفاده شد (Adabavazeh et al., 2022). پس از دو هفته تیماردهی، پارامترهای ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت.

### سنجش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم بافت برگ با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ سائیده و با کاغذ صافی، صاف شد. حجم محلول با استون ۸۰٪ به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده و شدت جذب در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل JENWAY 6305 انگلیس) خوانده شد. برای اندازه‌گیری پیش‌سازهای کلروفیل،

که غلظت مناسب سالیسیلیک اسید می‌تواند به‌عنوان نمونه‌ای از محرک‌های طبیعی بی‌خطر در جهت تقویت بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه خاص و همچنین به حداقل رساندن اثرات نامطلوب احتمالی نانوذرات اکسید آهن عمل کند.

بنابراین، با توجه به اهمیت گیاه دارویی استبرق از نظر دارویی و صنعتی، در پژوهش حاضر، اثرات نانوذرات اکسید آهن به‌همراه سالیسیلیک اسید برای بهبود رشد و فیزیولوژی گیاهچه‌های استبرق در شرایط هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، برای جلوگیری از هرگونه سمیت احتمالی نانوذرات مصنوعی، از نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با عصاره برگ استبرق استفاده شد.

### موادها و روش‌ها

برای بررسی واکنش گیاه استبرق به نانوذره اکسید آهن و سالیسیلیک اسید، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. بذره‌های گیاه استبرق در مهرماه از گیاه وحشی در منطقه شهداد، یکی از رویشگاه‌های طبیعی استبرق در استان کرمان جمع‌آوری شد. منطقه شهداد در ۸۷ کیلومتری شمال‌شرق شهر کرمان (طول و عرض جغرافیایی: ۵۷/۷۰۶۱۳۴۶۷° و ۳۰/۴۱۷۰۹۳۶۷°) با ارتفاع ۴۰۰ متر از سطح دریا واقع می‌باشد. تعدادی بذر پس شست‌وشو و استریل کردن با الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و آب ژاول ۲۰٪ (v/v) به مدت ۱۲ دقیقه، برای جوانه‌زنی در ظروف پتری‌دیش قرار داده و در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ، دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  و

### درصد نشت الکترولیتی غشاء

شاخص پایداری غشاء با اندازه گیری میزان نشت الکترولیتی برگ ارزیابی شد (Ben Hamed et al., 2007). برای این منظور ۰/۲ گرم از بافت سالم و تازه برگ گیاه را بعد از شست و شو با آب مقطر برای شست و شوی یون‌های احتمالی از سطح گیاه درون لوله‌ی آزمایش در پیچدار قرار داده و ۱۰ میلی لیتر آب به آن اضافه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۲°C قرار داده و میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها (EC<sub>1</sub>) با Ec متر (مدل HI9811، شرکت HANNA، آمریکا) اندازه گیری شد. سپس لوله‌های آزمایش در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شده و بعد از خنک شدن لوله‌ها تا ۲۵°C، میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها (EC<sub>2</sub>) مجدداً اندازه گیری و طبق رابطه ۲ درصد نشت یونی (EL) محاسبه شد.

رابطه ۲:

$$(EC_1 / EC_2) \times 100 = EL\%$$

### سنجش مقدار پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

مقدار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در بافت‌های برگ بر اساس روش Oktay و همکاران (۲۰۰۳) اندازه گیری شد. ابتدا ۰/۲ گرم از بافت تر بر روی یخ با ۳ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱٪ همورنه و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ xg در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، ۰/۵ میلی لیتر مایع رویی با ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و یک میلی لیتر محلول یدید پتاسیم یک مولار مخلوط شد. پس از انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۲۵°C به مدت ۱۵ دقیقه، شدت جذب آن‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد، محتوای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> محاسبه شد.

شدت جذب در طول موج‌های ۵۹۰، ۶۲۸، ۶۶۷ و ۶۵۰ که بالاترین جذب پروتوپورفیرین، منیزیم-پروتوپورفیرین، پروتوکلروفیلید می‌باشد، خوانده شد (Yang et al., 1998). نتایج حاصل از اندازه گیری بر اساس رابطه ۱ محاسبه و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر ارائه شد.  
رابطه ۱:

$$\text{Chl a (mg g}^{-1} \text{ FW)} = (12.25 A_{663.2}) - (2.79 A_{646.8})$$

$$\text{Chl b (mg g}^{-1} \text{ FW)} = (21.51 A_{646.8}) - (5.1 A_{663.2})$$

$$\text{Chl. T (mg g}^{-1} \text{ FW)} = \text{Chl. a} + \text{Chl. b}$$

$$\text{Car (mg g}^{-1} \text{ FW)} = [(1000 A_{470}) - (1.8 \text{Chl. a} - (85.02 \text{Chl. b}))] \div 198$$

$$\text{PPIX (mg g}^{-1} \text{ FW)} = 196.25 A_{575} - 46.6 A_{590} - 58.68 A_{628}$$

$$\text{MGPP (mg g}^{-1} \text{ FW)} = 61.81 A_{590} - 23.77 A_{575} - 3.55 A_{628}$$

$$\text{Pchl. a (mg g}^{-1} \text{ FW)} = 42.59 A_{628} - 34.22 A_{575} - 7.25 A_{590}$$

$$\text{Chl. a (mg g}^{-1} \text{ FW)} = A_{667} / 74.9$$

$$\text{Chl. b (mg g}^{-1} \text{ FW)} = A_{650} / 47.2$$

در روابط فوق Chl a، Chl b، Chl T، Car،

Chlide و Pchl. a، MGPP، PPIX به ترتیب کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پروتوپورفیرین، منیزیم-پروتوپورفیرین، پروتوکلروفیلید و کلروفیلید هستند.

### سنجش عناصر

در پژوهش حاضر، میزان عناصر آهن، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در برگ در سطح ۰ و ۲۰۰ میلی-گرم بر لیتر تیمار نانوذره آهن و سطح ۰ و ۱۰ میلی مولار سالیسیلیک اسید مورد بررسی قرار گرفت و برای سنجش آن‌ها از دستگاه طیف سنج نشر اتمی پلاسما جفت شده القایی (ICP-OES) با حد تشخیص ۰/۰۲ ppm (مدل Spectro ARCOS System 760095555، آلمان) استفاده شد (Sagner et al., 1998).

### سنجش مقدار مالون‌دی‌آلدهید (MDA)

محتوای MDA، به‌عنوان شاخصی از میزان آسیب ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن به گیاه، براساس روش Heath & Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۲ گرم از بافت‌های مورد نظر بر روی یخ با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱٪ هم‌وزنه و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت xg ۱۰۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر مایع رویی ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتریک اسید اضافه شد. نمونه‌ها ابتدا در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس به سرعت در حمام یخ خنک شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان MDA از رابطه ۳ محاسبه و به صورت نانومول بر گرم وزن تر بیان شد؛ در این رابطه ضریب خاموشی  $\epsilon = 155000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  می‌باشد.

رابطه ۳:

$$\text{MDA (nmol g}^{-1} \text{FW)} = [(A_{532} - A_{600}) / \epsilon] \times 10^6$$

### سنجش قند محلول

محتوای قند محلول در برگ توسط معرف آنترون براساس روش اصلاح شده Fales (۱۹۵۱) مورد سنجش قرار گرفت. بر این اساس، ۰/۱ گرم نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ سائیده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده شد. عصاره حاصل با سرعت xg ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری شد. سپس برای حذف حلال استخراج‌کننده، فالكون‌های حاوی عصاره درون آون در دمای ۵۰°C قرار داده شدند. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر آب به رسوب حاصل اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده با ۵

میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به مدت ۱۷ دقیقه در دمای ۹۰°C گرم شد. شدت جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت قند با منحنی استاندارد به دست آمد و نتایج براساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

### سنجش پروتئین محلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای تهیه عصاره‌ی پروتئینی و آنزیمی، ابتدا ۰/۱ گرم بافت برگ روی یخ و توسط ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH=۷/۸) هم‌وزن شد. سپس عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت xg ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. پس از انجام این مرحله، محلول رویی به آرامی به میکروتیوب‌های جدید انتقال داده شد و برای بررسی پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد. اندازه‌گیری پروتئین طبق روش برادفورد (Bradford 1976) با اندکی تغییر انجام شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) با سنجش مهار احیای نوری نیترو بلو تترازولیم (NBT) طبق روش Giannopolitis & Ries (۱۹۹۷) انجام شد. در این روش، بعد از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی به بافر واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸) حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار، ال-متیونین ۱۲ میلی‌مولار، ریوفلاوین یک میکرومولار و NBT ۷۵ میکرومولار، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور فلورسنت ( $\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، نمونه‌های شاهد و بلانک تهیه شد که حاوی مخلوط واکنش به جز عصاره‌ی آنزیمی



فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) توسط گایاکول و اندازه گیری میزان جذب تترایاکول براساس روش Lin & Kao (۱۹۹۹) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷)، ۱۰ میکرولیتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۱۹ میلی مولار، ۱۵۰ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان جذب تترایاکول در ۴۷۰ نانومتر در لحظه آغاز واکنش پس از افزودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل  $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و بر حسب واحد آنزیم به ازای هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

### ارزیابی مواد مؤثره اسانس

در این پژوهش، جهت استخراج اسانس از متانول ۸۰٪ به عنوان حلال و دستگاه اسانس گیری سوکسله استفاده شد (et al., Mokhtassi Bidgoli 2013). برای شناسایی مواد مؤثره اسانس از دستگاه گاز کروماتوگراف جرم سنجی (GC/MS) مدل Hewlett-Packard-589 (شرکت Agilent، آمریکا) دارای سیستم تله یونی استفاده شد که در آن انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت  $250^{\circ} \text{C}$ ، برای تولید منبع یون تنظیم شد (Davies 1990). شناسایی هر ترکیب براساس زمان بازداری و جرم ثبت شده آن‌ها انجام شد.

### محاسبات آماری

تمام آزمایش‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم افزار SPSS به روش آنالیز واریانس

بودند. سپس نمونه‌ی شاهد مانند سایر نمونه‌ها در معرض نور قرار گرفت. میزان جذب در نمونه‌های آنزیمی و شاهد به واسطه تشکیل فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد، مهار احیای نوری NBT را در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه‌ها نشان می‌دهد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم به ازای هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با بررسی کاهش جذب H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در طول موج ۲۴۰ نانومتر در دو دقیقه طبق روش Aebi (۱۹۷۴) اندازه گیری شد. در این روش، مخلوط واکنش شامل ۸۰۰ میکرولیتر فسفات سدیم بافر ۵۰ میلی مولار (pH=۷) و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۷٪ و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان فعالیت آنزیم توسط ضریب خاموشی معادل  $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و بر حسب واحد آنزیم به ازای هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با آسکوربیک اسید و میزان کاهش جذب آن طبق روش Nakano & Asada (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۶۷۵ میکرولیتر محلول EDTA ۰/۲ مولار، ۱۷۵ میکرولیتر محلول اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی مولار، ۵۰ میکرولیتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۲۵۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی بود. به دنبال اکسید شدن آسکوربیک اسید با آغاز واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، ۲ دقیقه پس از آغاز واکنش نسبت به زمان آغاز واکنش محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل  $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه و بر حسب واحد آنزیم به ازای هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

یک طرفه (Two-Way ANOVA) مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن و سطوح معنی‌دار بودن تیمارها در سطح  $P \leq 0/05$  انجام شد.

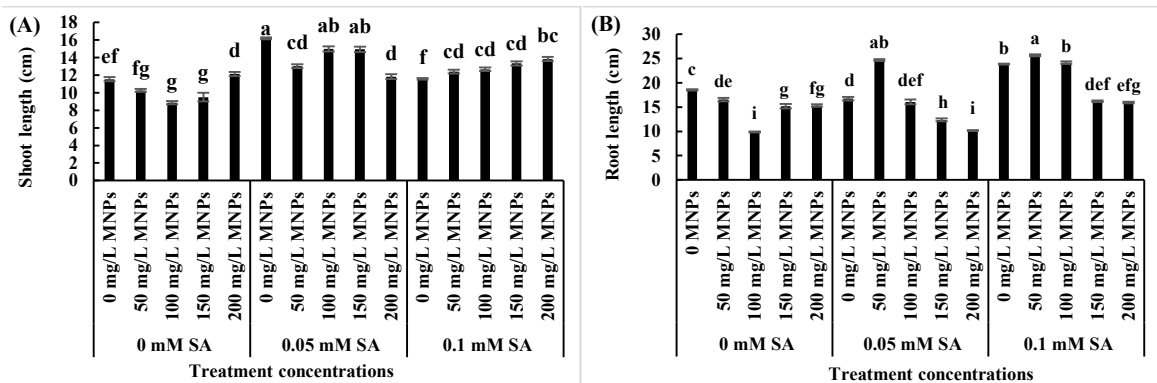
**نتایج**

**اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر پارامترهای رشد**

نتایج محاسبات آماری نشان دادند بین سطوح مختلف تیمارهای اعمال شده از لحاظ صفات، طول و وزن تر و خشک اندام‌هوایی و ریشه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همان‌طور که در شکل 1A نشان داده شده است، تمام غلظت‌های نانوذرات مغناطیسی (MNPs) به‌استثنای بالاترین غلظت آن (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، به‌طور معنی‌داری سبب کاهش طول اندام‌هوایی نسبت به شاهد شد (et al., 2022 Adabavazeh). کاربرد سالیسیلیک اسید (SA) به‌تنهایی در سطح ۰/۰۵ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را در افزایش طول اندام‌هوایی داشت

(۴۰/۵٪)، با وجود اینکه در سطح ۰/۱ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. علاوه‌بر این، MNPs در ترکیب با SA در تمامی سطوح در مقایسه با شاهد طول اندام‌هوایی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. طول ریشه نیز با قرار گرفتن در معرض تمام غلظت‌های MNPs به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش نشان داد، به‌طوری‌که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آن بیشترین کاهش ارتفاع ریشه (حدوداً ۴۷٪ کاهش)، مشاهده شد (شکل 1B)

(et al., 2022 Adabavazeh). تیمار SA در سطح ۰/۰۵ میلی‌مولار به‌تنهایی و در ترکیب با MNPs سبب بهبود رشد ریشه نشد، به‌جز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر که منجر به افزایش ۳۳ درصدی طول ریشه در مقایسه با سطح بدون تیمار شد. سطح ۰/۱ میلی‌مولار SA نیز به‌تنهایی و در ترکیب با دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs به‌ترتیب ۲۸/۶، ۳۸/۵ و ۳۰/۴٪ طول ریشه را نسبت به شاهد افزایش داد.

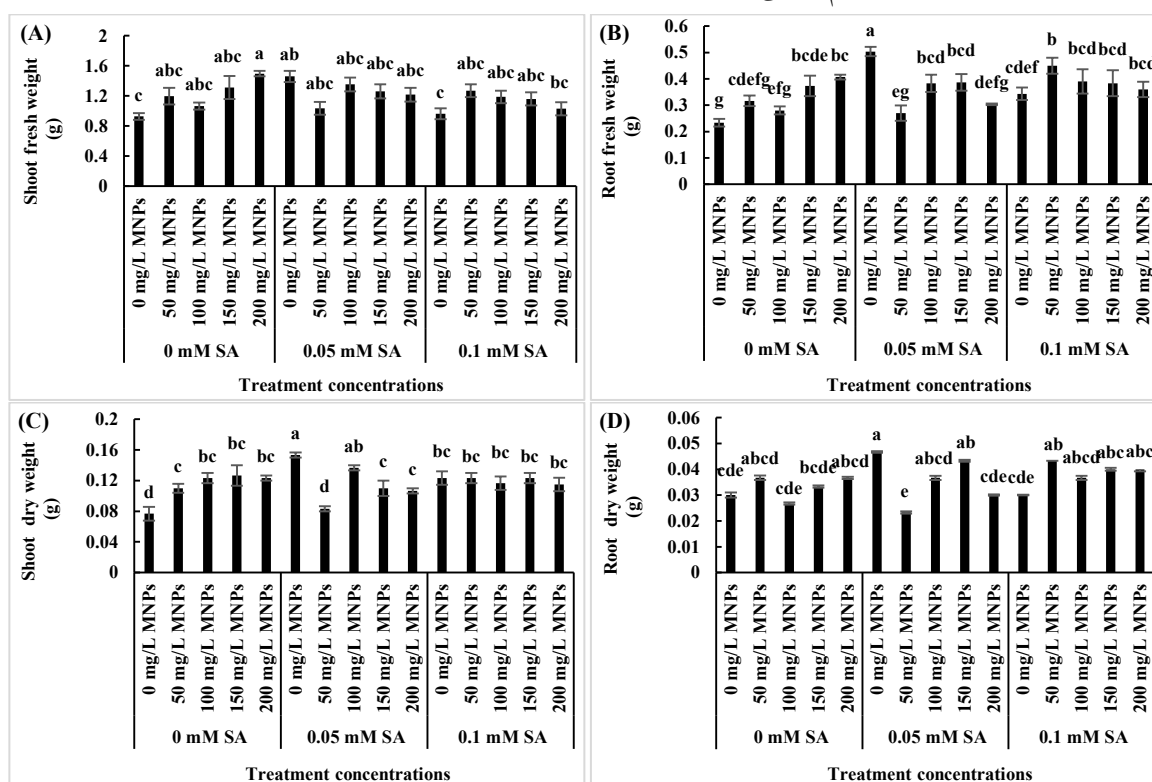


شکل 1- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر طول اندام‌هوایی (A) و طول ریشه (B) در گیاهچه‌های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Figure 1- Effect of magnetic nanoparticles and salicylic acid on shoot length (A) and root length in *C. procera* seedlings. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

لحاظ آماری تقریباً یکسان بود. کمترین میزان وزن خشک ریشه در سطح ۰/۰۵ میلی مولار SA همراه با ۵۰ میلی گرم بر لیتر MNPs (۲۲٪ کاهش) و بیشترین میزان تحت تیمار ۰/۰۵ میلی مولار SA به تنهایی (۵۵/۵٪ در ریشه و ۹۹/۸٪ در اندام هوایی) نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۲C-D).

نتایج نشان دادند نسبت به شاهد، تمامی سطوح تیمار موجب افزایش معنی داری در وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه شد. بیشترین میزان وزن تر اندام هوایی تحت تیمار ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر MNPs تا حدود ۶۲٪ و ریشه تحت تیمار ۰/۰۵ میلی مولار SA تا ۱۱۶٪ مشاهده شد (شکل ۲A-B). تأثیر تیمارهای اعمال شده بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه از



شکل ۲- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر وزن تر اندام هوایی (A)، وزن تر ریشه (B)، وزن خشک اندام هوایی (C) و وزن خشک ریشه (D) در گیاهچه‌های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بر اساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

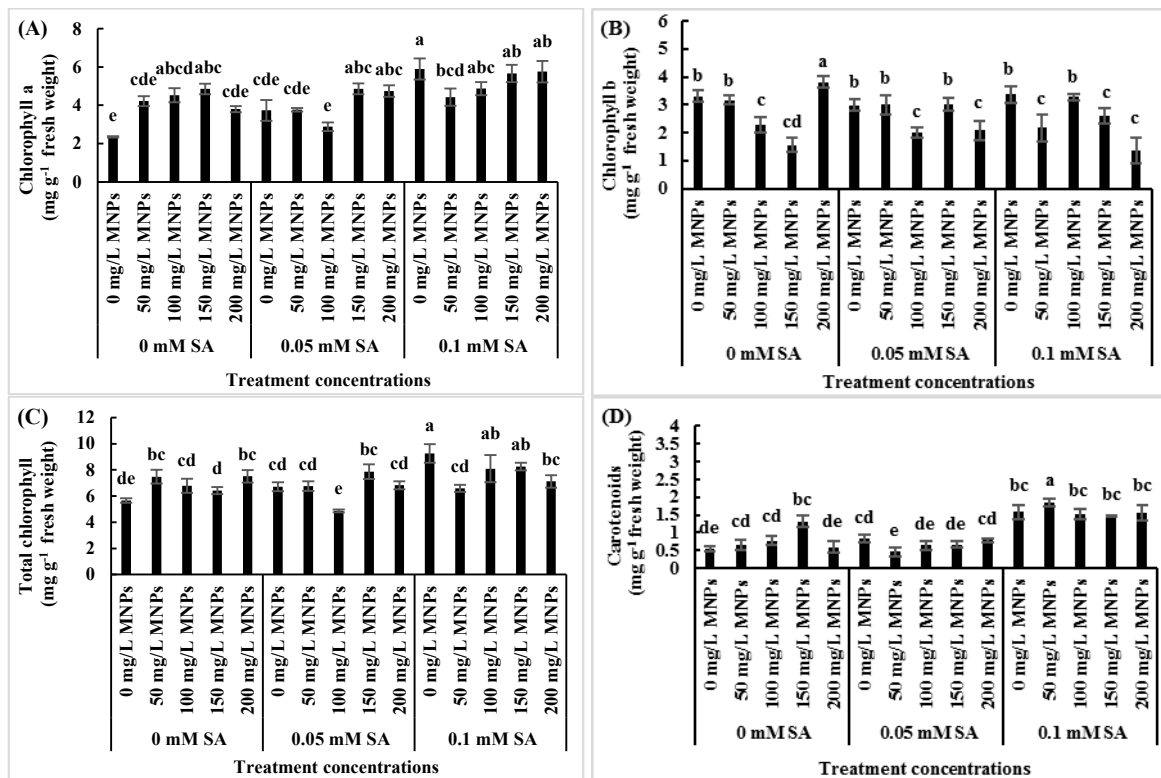
Figure 2- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on shoot fresh weight (A), root fresh weight (B), shoot dry weight (C), and root dry weight (D) in *C. procera* seedlings. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

گرفت. همان طور که در شکل ۳A مشخص است تمامی سطوح تیمار سبب افزایش معنی داری در میزان کلروفیل a شد. بیشترین میزان کلروفیل a (۱۵۱٪ نسبت به شاهد) تحت تیمار ۰/۱ میلی مولار SA حاصل شد. میزان کلروفیل b تحت تأثیر

اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی بر اساس نتایج به دست آمده، میزان کلروفیل و کاروتنوئید در گیاهچه‌های استبرق به طور قابل توجهی تحت تأثیر تیمارهای MNPs و SA قرار

همچنین، میزان کلروفیل b در ترکیب ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs همراه با ۰/۱ میلی‌مولار SA نسبت به شاهد کاهش یافت. غلظت ۰/۱ میلی‌مولار SA به‌تنهایی و همچنین در ترکیب با MNPs بیشترین تأثیر را در افزایش کلروفیل کل و کاروتنوئید داشت (شکل ۳C-D).

MNPs به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، به‌استثنای غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، که در آن میزان کلروفیل b ۱/۲ برابر شاهد بود (شکل ۳B) (et al., 2022 Adabavazeh). در بررسی اثر تیمار SA نیز مشخص شد که هیچ‌کدام از غلظت‌های SA تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل b نداشتند.



شکل ۳- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) در گیاهچه‌های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Figure 3- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on the amount of chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), total chlorophyll (C), and carotenoids (D) in *C. procera* seedlings. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

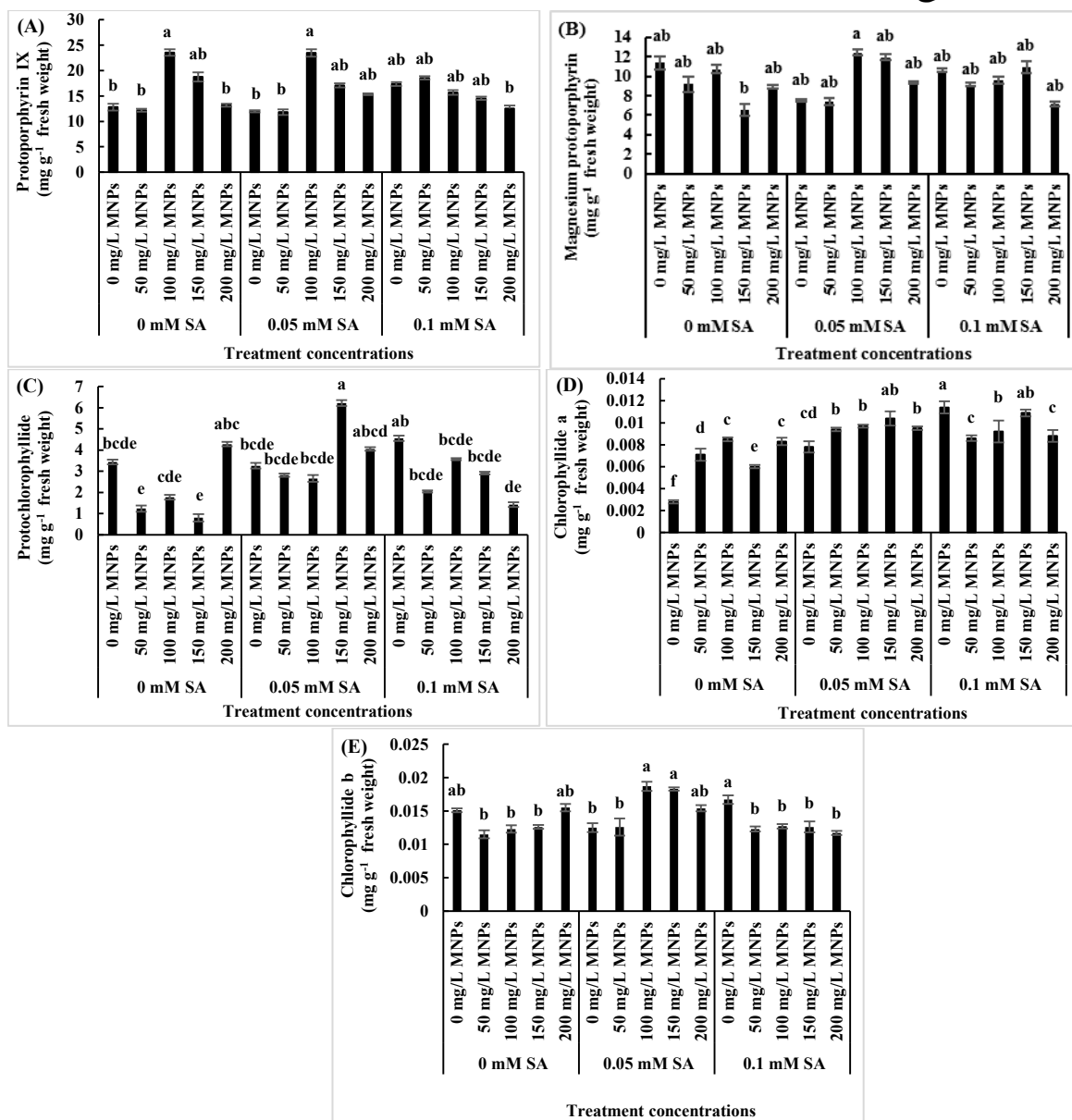
بیوسنتزی کلروفیل از جمله پروتوپورفیرین (۰/۸۳٪)، منیزیم پروتوپورفیرین (۰/۹٪) و کلروفیلید b (۰/۲۳٪) در مقایسه با شاهد شد (شکل ۴A-B-E). علاوه بر این، پروتوکلروفیلید نیز تحت تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs همراه با ۰/۰۵ میلی‌مولار SA تا ۰/۸۰٪ نسبت

### اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر پیش‌سازهای کلروفیل

یافته‌ها نشان دادند تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs همراه با ۰/۰۵ میلی‌مولار SA منجر به افزایش قابل توجهی در میزان پیش‌سازهای مسیر

که مقدار آن تقریباً ۴ برابر شاهد بود (شکل ۴D). در مقدار کلروفیلید b نسبت به شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ۴E).

به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۴C). همچنین در تمامی سطوح تیمار افزایش معنی داری در مقدار کلروفیلید a نسبت به شاهد مشاهده شد و بیشترین میزان آن در سطح ۰/۱ میلی مولار SA حاصل شد،



شکل ۴- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر میزان پروتوپورفیرین (A)، منیزیم پروتوپورفیرین (B)، پروتوکلروفیلید (C)، کلروفیلید a (D) و کلروفیلید b (E) در گیاهچه‌های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Figure 4- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on the amount of protoporphyrin IX (A), magnesium protoporphyrin (B), protochlorophyllide (C), chlorophyllide a (D), and chlorophyllide b (E) in *C. procer* seedlings. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

## اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر میزان عناصر آهن، پتاسیم، کلسیم و منیزیم

تغییرات میزان آهن، منیزیم، پتاسیم و کلسیم گیاهچه‌ها در پاسخ به بالاترین سطح MNPs و SA در جدول ۱ ارائه شده است. در مقایسه با شاهد، محتوای آهن به‌طور قابل توجهی در پاسخ به تیمارهای اعمال شده افزایش یافت. همچنین روند مشابهی در محتوای منیزیم و کلسیم مشاهده شد. در

حالی که میزان پتاسیم در ۰/۱ میلی‌مولار SA با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت و در ترکیب با MNPs افزایش یافته و به حداکثر میزان رسید. با توجه به داده‌های ارائه شده در جدول ۱، تیمار ۰/۱ میلی‌مولار SA در ترکیب با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs نسبت به SA و MNPs به‌صورت مجزا بهترین اثر را بر میزان عناصر داشت.

جدول ۱- اثر نانوذرات آهن مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر عناصر غذایی گیاهچه‌های استبرق

Table 1- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on nutritional elements of *C. procera* seedlings

SA concentration (mM)	MNPs concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Fe (DW%)	Mg (DW%)	Ca (DW%)	K (DW%)
0	0	0.25 <sup>c</sup>	6.9 <sup>d</sup>	6.47 <sup>d</sup>	4.43 <sup>c</sup>
0	200	0.38 <sup>a</sup>	8.24 <sup>b</sup>	7.28 <sup>b</sup>	4.66 <sup>b</sup>
0.1	0	0.33 <sup>b</sup>	7.48 <sup>c</sup>	6.85 <sup>c</sup>	4.32 <sup>c</sup>
0.1	200	0.39 <sup>a</sup>	8.78 <sup>a</sup>	9.3 <sup>a</sup>	5.51 <sup>a</sup>

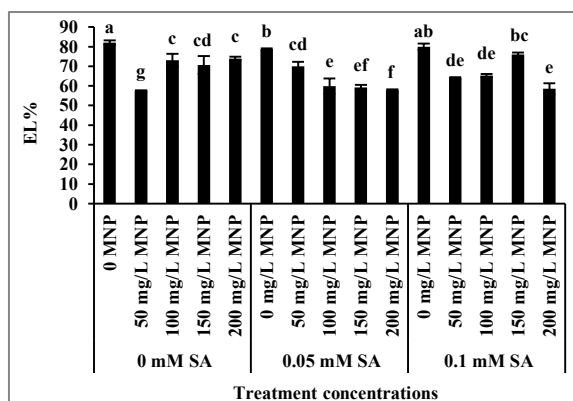
مقادیر، میانگین سه تکرار و حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Values represent the mean of three replicates and similar letters denote significant differences according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

## اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر درصد نشت الکترولیتی غشاء

همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، میزان درصد نشت الکترولیتی غشاء در گیاهچه‌های استبرق به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده نسبت به شاهد کاهش یافت. در مقایسه با شاهد،

در گیاهچه‌های تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs و گیاهچه‌های رشد یافته در ۰/۰۵ میلی‌مولار SA همراه با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs کمترین نشت یونی (حدوداً ۳۰٪) مشاهده شد.



شکل ۵- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر میزان نشت الکترولیتی در گیاهچه‌های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Figure 5- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on the amount of electrolyte leakage in *C. procera* seedlings. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

شاهد افزایش داد (۶۱٪) و در سایر سطوح نسبت به شاهد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (et al., 2022 Adabavazeh). در بررسی اثر متقابل MNPs و SA نیز تنها سطح ۰/۱ میلی‌مولار SA با تمام غلظت‌های MNPs به‌استثنای کمترین غلظت آن به کاهش MDA منجر می‌شود. به‌طوری‌که در مقایسه با شاهد، میزان MDA در سطح ۰/۱ میلی‌مولار SA با دو غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs به ترتیب ۶۴ و ۴۰٪ کاهش نشان داد.

محتوای قندهای محلول به تدریج با افزایش غلظت MNPs افزایش یافت، در حالی که بین دو غلظت SA تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و هر دو منجر به افزایش مقدار قند محلول شدند (حدوداً ۱/۴ برابر شاهد) (شکل ۶C). تأثیر متقابل MNPs و SA بر مقدار قند محلول برگ‌ها نیز معنی‌دار بود و اعمال دو نوع تیمار با هم منجر به افزایش معنی‌داری در مقدار قند محلول شد. کمترین و بیشترین مقدار قند محلول در برگ به ترتیب در شاهد و نمونه تیمار شده با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs مشاهده شد.

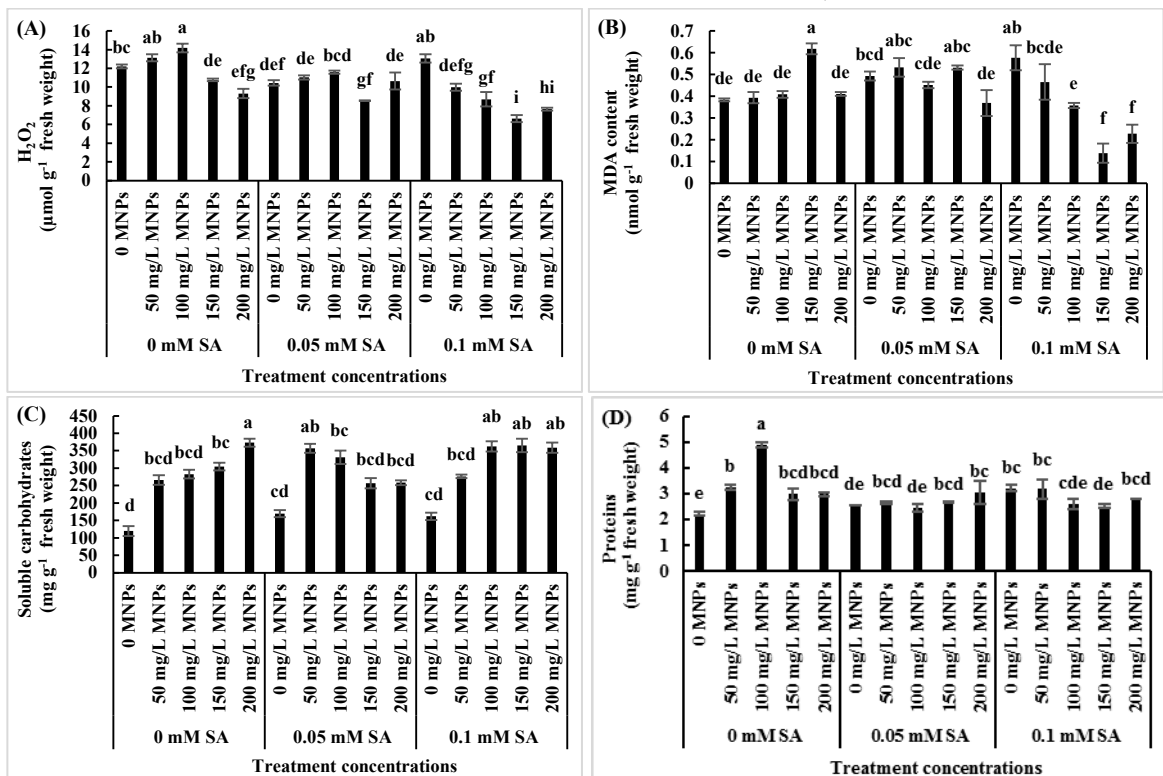
### اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر مقدار $H_2O_2$ ، MDA، قند محلول و پروتئین محلول

مقایسه نتایج داده‌ها نشان دادند محتوای  $H_2O_2$  در برگ تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs افزایش یافته و به حداکثر مقدار (۱۴/۱۸ میکرومول در گرم وزن تر) رسیده است. در مقابل، سطح  $H_2O_2$  زمانی که گیاه در معرض ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs در مقایسه با شاهد قرار داشت، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۶A) (Adabavazeh et al., 2022). علاوه بر این، در میزان  $H_2O_2$  در تمامی سطوح حاوی ۰/۰۵ میلی‌مولار SA نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری مشاهده شد، در حالی که SA به‌تنهایی در سطح ۰/۱ میلی‌مولار سبب ۷٪ افزایش و در ترکیب با تمام غلظت‌های MNPs موجب کاهش معنی‌دار میزان  $H_2O_2$  شد.

داده‌های ارائه شده در شکل ۶B نشان می‌دهند در بین غلظت‌های MNPs زمانی که به‌تنهایی اعمال شد، فقط غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آن به‌طور معنی‌داری مقدار MDA را در برگ‌ها نسبت به

محسوسی نسبت به شاهد افزایش یافته است (تقریباً ۱/۲ برابر). در مقایسه دو غلظت SA بر مقدار پروتئین، ۰/۱ میلی‌مولار سبب ۴۵/۶٪ افزایش و ۰/۰۵ میلی‌مولار منجر به ۱۵/۲٪ افزایش نسبت به شاهد شد. در سایر غلظت‌ها نیز در مقایسه با شاهد افزایش مشاهده شد.

محتوای پروتئین به‌طور قابل‌توجهی با تیمار MNPs در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد. بالاترین مقدار در ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs در حدود دو برابر بیشتر از شاهد مشاهده شد (شکل ۶D). با این حال، کاهش مشاهده شده در محتوای پروتئین در ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور



شکل ۶- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر میزان H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A)، MDA (B)، قند محلول (C) و پروتئین محلول (D) در گیاهچه‌های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن (P ≤ 0.05) است.

Figure 6- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), MDA (B), total protein (C), and soluble sugar (D) contents in *C. procera* seedlings. Values represent the mean of three replicates ± standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test (P ≤ 0.05).

در گیاهان تیمار شده مشاهده شد. با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل ۷A، فعالیت آنزیم SOD با غلظت‌های مختلف MNPs در مقایسه با شاهد به‌طور قابل‌توجهی کاهش داشت، در حالی که تحت تیمار توأم در سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر

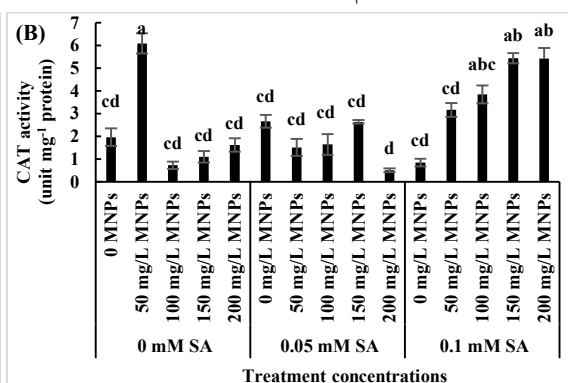
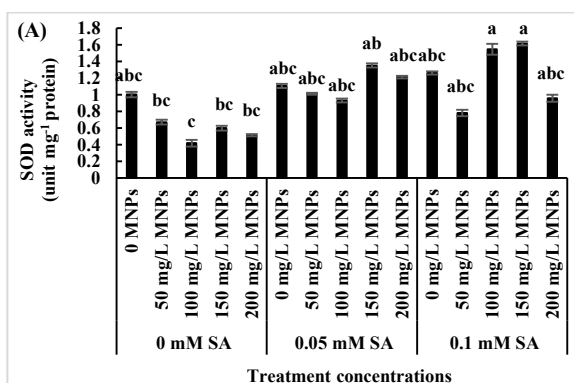
**اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان**  
در بررسی تأثیر MNPs و SA بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (SOD، CAT، APX و GPX)، تفاوت‌های معنی‌داری در فعالیت آنزیمی

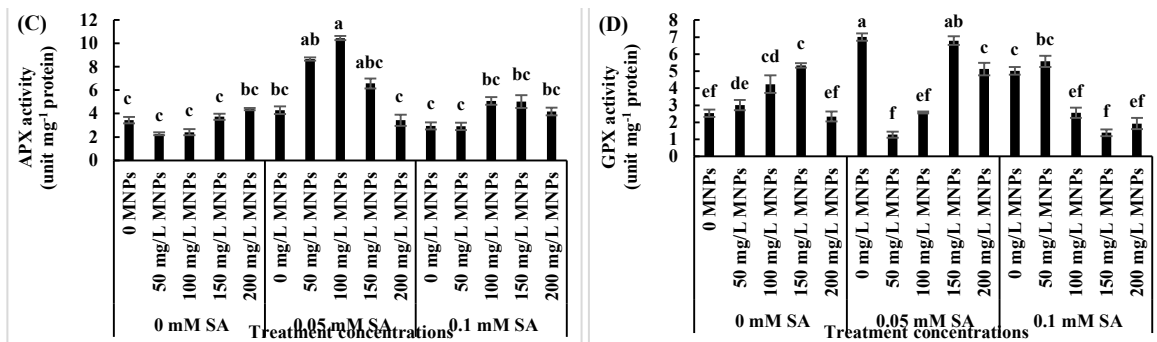


شد و در سایر غلظت‌های آن تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد (et al., 2022 Adabavazeh). در بین نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف MNPs و SA نیز برگ‌های تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs همراه با ۰/۰۵ میلی‌مولار SA بیشترین فعالیت آنزیم APX را نشان دادند و مقدار آن ۲۰۳٪ افزایش نسبت به شاهد بود.

با توجه به شکل ۷D، با افزایش غلظت MNPs تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت آنزیم GPX به تدریج افزایش یافت و سپس در بالاترین غلظت MNPs (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) فعالیت آنزیم به‌طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد. بیشترین فعالیت آنزیم GPX نیز در گیاهان رشد یافته تحت تیمار ۰/۰۵ میلی‌مولار SA مشاهده شد که فعالیت آنزیم را تا ۱۷۶٪ نسبت به شاهد افزایش داد.

لیتر MNPs با ۰/۱ میلی‌مولار SA، فعالیت آنزیم به ترتیب ۵۴ و ۶۱٪ افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنزیم CAT در سطح ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs مشاهده شد که ۳ برابر فعالیت آنزیم در نمونه شاهد بود (شکل ۷B). همچنین در بررسی تأثیر متقابل SA و MNPs بر میزان فعالیت آنزیم CAT مشخص شد غلظت ۰/۱ میلی‌مولار SA همراه با غلظت‌های مختلف MNPs سبب افزایش فعالیت آنزیم شد، در حالی که ۰/۰۵ میلی‌مولار SA در ترکیب با غلظت‌های مختلف MNPs به استثنای ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم با شاهد ایجاد نکرد. در بررسی اثر تیمار MNPs به تنهایی بر فعالیت آنزیم APX، همان‌طور که شکل ۷C نشان می‌دهد، غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs منجر به افزایش فعالیت آنزیم (۱/۳ برابر بیشتر از شاهد)





شکل ۷- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر فعالیت آنزیم (A) SOD، (B) CAT، (C) APX و (D) GPX در گیاهچه های استبرق. مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Figure 7- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on SOD (A), CAT (B), APX (C), and GPX (D) activities in *C. procera* seedlings. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  standard errors, and similar letters are significantly different according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

۰/۱ میلی مولار SA همراه با ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر MNPs به ترتیب ۴۳۵/۷۱٪ و ۳۹۱/۶٪ افزایش یافت. به همین ترتیب، ۱/۸- سینول، ژرانیال، A-فلاندردن و آلفا-پینن ترکیبات مهم دیگری هستند که به ترتیب ۵/۸، ۵/۵، ۵ و ۳/۸ برابر بیشتر از شاهد تحت تیمار ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر MNPs و ۰/۱ میلی مولار SA افزایش نشان دادند.

### اثرات نانوذرات مغناطیسی و سالیسیلیک اسید بر ترکیبات اصلی اسانس

در بررسی تأثیر MNPs و SA بر ترکیبات اسانس برگ گیاهچه های رشد یافته تحت شرایط هیدروپونیک مشخص شد تیمار توأم MNPs با SA بیشترین اثر را بر روی ترکیبات اصلی اسانس داشت (جدول ۲). برای مثال، میزان سیترونلال و کافور که از ترکیبات اصلی اسانس برگ هستند، تحت تیمار

جدول ۲- اثر نانوذرات مغناطیسی (MNPs) و سالیسیلیک اسید (SA) بر ترکیبات اصلی اسانس گیاهچه های استبرق با GC/MS

Table 2- Effect of magnetic nanoparticles (MNPs) and salicylic acid (SA) on the main essential oil constituents of *C. procera* seedlings using GC/MS

Essential oil components	Retention Time (min)	Control	MNPs				0.05mM SA	MNPs + SA				0.1mM SA	MNPs + SA			
			50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>		50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>		50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	150 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>
Alpha-pinene	1036	1.5 <sup>a</sup>	1.9 <sup>m</sup>	2.2 <sup>k</sup>	2.5 <sup>j</sup>	3.0 <sup>h</sup>	2.0 <sup>i</sup>	2.7 <sup>f</sup>	3.3 <sup>d</sup>	4.2 <sup>b</sup>	5.1 <sup>n</sup>	1.8 <sup>i</sup>	3.1 <sup>g</sup>	3.8 <sup>e</sup>	4.6 <sup>c</sup>	5.8 <sup>a</sup>
A-phellandrene	1176	1.3 <sup>i</sup>	2.4 <sup>j</sup>	2.9 <sup>i</sup>	3.3 <sup>h</sup>	3.6 <sup>f</sup>	1.6 <sup>k</sup>	2.9 <sup>g</sup>	3.5 <sup>d</sup>	4.4 <sup>b</sup>	5.3 <sup>j</sup>	2.4 <sup>i</sup>	3.3 <sup>h</sup>	4.1 <sup>e</sup>	5.0 <sup>c</sup>	6.6 <sup>a</sup>
1,8-Cineol	1214	1.2 <sup>n</sup>	2.7 <sup>k</sup>	3.4 <sup>i</sup>	4.2 <sup>g</sup>	5.1 <sup>d</sup>	1.7 <sup>m</sup>	3.0 <sup>h</sup>	3.6 <sup>e</sup>	4.7 <sup>b</sup>	6.0 <sup>l</sup>	2.6 <sup>j</sup>	3.4 <sup>i</sup>	4.4 <sup>f</sup>	5.5 <sup>c</sup>	7.0 <sup>a</sup>
β-Ocymene	1251	2.8 <sup>b</sup>	2.7 <sup>c</sup>	1.8 <sup>i</sup>	2.4 <sup>e</sup>	2.0 <sup>h</sup>	2.7 <sup>c</sup>	2.2 <sup>d</sup>	2.5 <sup>g</sup>	2.1 <sup>i</sup>	1.8 <sup>a</sup>	2.9 <sup>f</sup>	2.4 <sup>e</sup>	2.0 <sup>h</sup>	2.1 <sup>g</sup>	1.7 <sup>j</sup>
Citronellal	1487	1.4 <sup>m</sup>	5.1 <sup>g</sup>	4.0 <sup>i</sup>	3.2 <sup>j</sup>	2.1 <sup>k</sup>	1.3 <sup>n</sup>	7.0 <sup>d</sup>	6.2 <sup>e</sup>	5.6 <sup>h</sup>	4.6 <sup>o</sup>	1.2 <sup>b</sup>	7.5 <sup>a</sup>	6.6 <sup>c</sup>	5.3 <sup>f</sup>	4.6 <sup>h</sup>
Camphor	1536	1.2 <sup>n</sup>	5.5 <sup>d</sup>	4.3 <sup>f</sup>	3.1 <sup>i</sup>	2.0 <sup>m</sup>	1.1 <sup>o</sup>	6.0 <sup>e</sup>	4.7 <sup>h</sup>	3.5 <sup>k</sup>	2.2 <sup>n</sup>	1.2 <sup>b</sup>	6.2 <sup>a</sup>	5.9 <sup>c</sup>	3.7 <sup>g</sup>	2.6 <sup>j</sup>
Linalool	1582	2.6 <sup>d</sup>	2.1 <sup>h</sup>	2.4 <sup>f</sup>	2.5 <sup>e</sup>	3.1 <sup>c</sup>	3.2 <sup>b</sup>	2.1 <sup>f</sup>	2.4 <sup>g</sup>	2.2 <sup>e</sup>	2.5 <sup>a</sup>	3.7 <sup>h</sup>	2.1 <sup>h</sup>	2.0 <sup>i</sup>	2.2 <sup>g</sup>	2.5 <sup>e</sup>
Geranial	1741	1.4 <sup>p</sup>	2.3 <sup>m</sup>	3.0 <sup>k</sup>	4.1 <sup>g</sup>	5.2 <sup>d</sup>	1.6 <sup>n</sup>	3.2 <sup>h</sup>	3.8 <sup>e</sup>	5.1 <sup>b</sup>	6.6 <sup>o</sup>	1.5 <sup>j</sup>	3.5 <sup>i</sup>	4.6 <sup>f</sup>	5.9 <sup>c</sup>	7.7 <sup>a</sup>
α-Terpineol	1790	2.5 <sup>e</sup>	1.9 <sup>c</sup>	3.1 <sup>a</sup>	1.7 <sup>g</sup>	2.0 <sup>d</sup>	2.7 <sup>b</sup>	1.8 <sup>h</sup>	1.6 <sup>e</sup>	1.9 <sup>h</sup>	1.6 <sup>b</sup>	2.7 <sup>f</sup>	1.6 <sup>h</sup>	2.0 <sup>d</sup>	1.8 <sup>f</sup>	1.5 <sup>i</sup>

مقادیر، میانگین سه تکرار و حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) است.

Values represent the mean of three replicates and similar letters denote significant differences according to Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

## بحث

در بررسی تأثیر MNPs سنتز شده در گیاهچه‌های استبرق رشد یافته در شرایط هیدروپونیک، نتایج نشان دادند افزودن MNPs در غلظت معین (۲۰۰ میلی گرم بر لیتر) منجر به افزایش فاکتورهای ریخت شناسی از جمله طول اندام هوایی، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه شدند (et al., 2022 Adabavazeh). این نتایج با پژوهش‌های قبلی انجام شده توسط Ngan و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی داشت؛ آن‌ها گزارش کردند آهن در بهبود رشد و بازده ریشه‌زایی در گیاهان نقش دارد. در گیاه سویا، محلول پاشی برگ‌ی و خاکی نانوذرات مغناطیسی تأثیر مثبت بر فاکتورهای رشد گیاه داشت و در پژوهش حاضر مشخص شد محلول پاشی برگ‌ی مؤثرتر از روش خاکی بود (Alidoust & Isoda, 2013). یکی از دلایل احتمالی افزایش رشد تحت تأثیر تیمار MNPs افزایش غلظت کلروفیل و سرعت فتوسنتز است. پژوهش‌های قبلی نشان دادند تیمار نانوذرات آهن به‌طور قابل توجهی پتانسیل افزایش کلروفیل و فاکتورهای رشد را دارند و ارتباط مثبت بین محتوای کلروفیل و محتوای آهن را تأیید می‌کنند (et al., Iannone et al., 2018 Sheykhbaglou; 2016) و با نتایج ما همخوانی دارد. آهن یک واسطه‌ی مهم برای زنجیره انتقال الکترون، سنتز  $NADP^+$  در طی فتوسنتز، بیوسنتز سیتوکروم‌ها، کمک به سنتز ۵-آمینو لوولینیک اسید (پیش‌ساز کلروفیل) است که ممکن است از این روش، تأثیر مثبتی بر رشد و بهره‌وری گیاه داشته باشد (Ngan et al., 2020). همچنین در پژوهش حاضر، افزایش مقدار پروتوپورفیرین با افزایش کلروفیل a نیز

نشانه‌ی اثر احتمالی MNPs و SA بر مسیر بیوسنتزی کلروفیل a است و شامل سلسله واکنش‌های آنزیمی از تبدیل شدن آمینواسید گلو تامیک به پروتوپورفیرینون، پروتوپورفیرین و سپس کلاته شدن با منیزیم و تولید مولکول منیزیم پروتوپورفیرین است که در نهایت پس از تبدیل شدن به پروتوکلروفیلید، کلروفیلید a بوجود می‌آید که می‌تواند به کلروفیل a تبدیل شود (et al., 2015 Taiz).

یکی دیگر از دلایل احتمالی افزایش رشد تحت تأثیر تیمار MNPs ممکن است به دلیل افزایش جذب عناصر معدنی به‌ویژه آهن باشد. طی بررسی انجام شده تأثیر نانواکسید و اکسید آهن معمولی بر غلظت آهن در گیاه گندم، مشخص شد که نانواکسید آهن نسبت به اکسید آهن معمولی در افزایش غلظت آهن در گیاه مؤثرتر بود (et al., 2010 Mazaherinia). پژوهش Abdi و همکاران (۲۰۰۸) نیز پتانسیل نانوذرات آهن در جذب و انتقال مواد مغذی محلول، به‌ویژه منیزیم، یکی دیگر از مواد معدنی مهم دخیل در سنتز کلروفیل و نیز کلسیم و پتاسیم، به‌عنوان مواد معدنی ضروری با بیشترین تقاضا در رشد و نمو گیاه را تأیید نمود. Ngan و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند نانوذرات آهن در غلظت معین سبب بهبود جذب کلسیم، پتاسیم و منیزیم و در نتیجه رشد گیاهچه‌های میخک (*Dianthus caryophyllus*) شده که با نتایج ما همخوانی دارد. Wei & Wang (۲۰۱۳) نیز گزارش نمودند نانوذرات مغناطیسی با فعالیت شبه پراکسیدازی ذاتی و کاهش  $H_2O_2$  و نیز به‌واسطه آزادسازی آهن آزاد در اثر تجزیه لیزوزومی نانوذرات آهن در سلول و در نتیجه تشدید پیشرفت چرخه‌های سلولی می‌تواند سبب افزایش رشد سلول شوند.

داشت. Rawat و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش نمودند محلول پاشی نانوذرات سولفید آهن در غلظت بهینه ۴ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش نشت یونی و پراکسیداسیون غشای سلولی در گیاه خردل شد. در این پژوهش، میزان  $H_2O_2$ ، علی‌رغم پژوهش‌های قبلی مبنی بر افزایش سطوح  $H_2O_2$  با کاربرد نانوذرات فلزی (et al., 2019 Hashemi)؛ (et al., 2015 Ma)، با بالاترین غلظت‌های MNPs (۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. پژوهش‌ها نشان دادند MNPs در غلظت مناسب فعالیت شبه پراکسیدازی در سلول داشته که می‌تواند سبب کاهش  $H_2O_2$  و کاهش تنش اکسیداتیو در سلول شود و از دلایل افزایش مقاومت سلول در برابر تنش‌های اکسیداتیو هستند (et al., 2016 Pariona). با این حال، کاربرد SA همراه با MNPs تأثیر مثبت و بهبوددهنده‌تری در کاهش میزان نشت مواد محلول از غشاء، همچنین میزان  $H_2O_2$  و MDA در گیاهچه‌های استبرق داشت و این یافته‌ها با نتایج Dedejani (۲۰۱۶) همخوانی دارد. تأثیر مثبت SA در افزایش پایداری غشاء می‌تواند به علت افزایش میزان پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین باشد که از این طریق به یک پارچگی و حفظ غشاء کمک می‌کند (et al., 2002 Nemeth). علاوه بر این، حضور کارتنوئیدها در فاز چربی غشاء نیز به حفظ غشاء در شرایط نامناسب محیطی کمک می‌کند. از این رو افزایش کارتنوئید با تیمار MNPs و SA در گیاه استبرق می‌تواند در کاهش نشت یونی نقش مؤثری داشته باشد. مشابه این نتایج، تیمار همزمان FeNPs و SA، میزان کارتنوئید را در توت‌فرنگی افزایش و

با وجود این در پژوهش حاضر، تأثیر متقابل MNPs و SA تأثیر بیشتری بر بهبود فاکتورهای رشد در گیاه استبرق نسبت به هر کدام از تیمارها به صورت جداگانه داشت که با نتایج گزارش شده توسط Mozafari و همکاران (۲۰۱۸) همخوانی داشت. همچنین پژوهش‌های متعدد نشان دادند SA با تأثیر بر ساختار کلروپلاست، میزان فتوسنتز، فعالیت آنزیم روبیسکو، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش نشت یونی گیاه منجر به بهبود فاکتورهای رشد در گیاهان می‌شود (et al., 2009 Popova)؛ (et al., 2007 Korkmaz).

در این پژوهش، برای ارزیابی سمیت MNPs سنتز شده در غلظت‌های بالا در گیاه علاوه بر رشد، نشت الکترولیتی غشاء، میزان پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها نیز بررسی شدند؛ به علت آن که، لیپیدهای غشای پلاسمایی یکی از اولین ساختارهای سلول گیاهی هستند که در شرایط تنشی به دنبال افزایش ترکیبات فعال اکسیژن (ROS) آسیب می‌بینند. افزایش ROS به بسیاری از ساختارها و اجزای سلول نظیر پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب زده و با تغییر ساختار غشاء در اثر پراکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها، سبب افزایش تراوایی غشای سلولی شده و منجر به نشت الکترولیت‌های داخل سلولی به سمت بیرون می‌شود و رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر، با کاربرد MNPs میزان نشت یونی گیاه استبرق نسبت به گروه شاهد کمتر شد و با نتایج Banijamali (۲۰۱۹) در گل داوودی تحت تأثیر نانوذرات سوپرپارامغناطیس اکسید آهن با پوشش اسید هیومیک همخوانی

در مقابل میزان نشت یونی،  $H_2O_2$  و MDA را کاهش داده است (Dedejani, 2016).

از یافته‌های دیگر پژوهش حاضر، افزایش محتوای قندهای محلول و پروتئین محلول تحت تأثیر MNPs و SA بود. پژوهش‌های قبلی نشان دادند آهن به‌عنوان کوفاکتور تنظیمی آنزیم‌های مختلف می‌تواند بر تمام متابولیسم‌های گیاه تأثیر بگذارد. اگرچه، نانوذرات آهن در مقایسه با فلز آهن می‌تواند سریعتر و کاملتر توسط گیاهان جذب شود، که سبب می‌شود گیاهان بتوانند از مواد مغذی موجود در آن استفاده کنند و رشد پربارتری داشته باشند (Askary, 2017). بر این اساس، به نظر می‌رسد که نانوذرات اکسید آهن می‌توانند  $Fe^{2+}$  مورد نیاز را برای واکنش‌های آنزیمی درگیر در متابولیسم قندها و نیتروژن در دسترس گیاه قرار دهند و متابولیسم قند و پروتئین را افزایش دهند. به‌طور مشابه، افزایش قند و محتوای پروتئین در پاسخ به نانوذرات اکسید آهن نیز توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Sheykhbaglou, 2018; Vadivel, et al., 2012). با وجود این، در این پژوهش، نانوذرات زمانی که با SA استفاده شد به‌طور قابل توجهی مؤثرتر بود. تعدادی از پژوهش‌ها نشان دادند تیمار SA با فعالیت افزایش ساکارز فسفات سنتاز، آنزیم اصلی در سنتز ساکارز (Dong, 2011) و نترات ردوکتاز، آنزیم کلیدی برای جذب نیتروژن (Fariduddin, 2003) بر متابولیسم کربوهیدرات و پروتئین تأثیر می‌گذارد.

یکی دیگر از فاکتورهایی که جهت بررسی آسیب اکسیداتیو احتمالی ناشی از تیمار MNPs در

گیاه بررسی شد، سیستم آنتی‌اکسیدانت آنزیمی بود؛ در این پژوهش، فعالیت SOD در گیاهچه‌های استبرق کاهش قابل توجهی در تمام تیمارهای MNPs اعمال شده نشان داد، اما CAT در ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و APX در بالاترین غلظت MNPs (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور قابل توجهی افزایش داشت. فعالیت GPX نیز با افزایش غلظت MNPs تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش و در بالاترین غلظت MNPs کاهش یافت. با توجه به این نتایج، احتمالاً منابع دیگری برای تولید  $H_2O_2$  در گیاه، به غیر از تولید  $H_2O_2$  ناشی از فعالیت SOD وجود داشته است، از جمله برخی از واکنش‌های درگیر در فتوسنتز و تنفس، که ROS از محصولات جانبی اجتناب‌ناپذیر آن‌ها است. نتایج این پژوهش با یافته‌های Wang و همکاران (۲۰۱۱) که فعالیت‌های مختلف SOD و CAT را در مواجهه با نانوذرات  $Fe_3O_4$  نشان می‌داد همخوانی داشت. در مقایسه با پژوهش‌های قبلی که اثر نانوذرات آهن را بر آسیب اکسیداتیو، تولید ROS و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان‌ها گزارش کرده‌اند، تفاوت در فعالیت آنزیمی گیاهان می‌تواند به علت تفاوت در شرایط سنجش، نوع و اندازه نانوذرات، غلظت و مدت زمان قرار گرفتن در معرض نانوذرات و مرحله رشد و نمو گیاه، گونه گیاه و نیز بافت مورد سنجش گیاه باشد (Ma, 2015). در پژوهش حاضر برای تقویت سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی‌اکسیدان و جهت کاهش آسیب‌های اکسیداتیو احتمالی ناشی از MNPs در گیاه از SA استفاده شد. همان‌طور که پژوهش‌های قبلی نشان دادند، هنگامی که SA در غلظت و زمان مناسب به کار برده شود با تغییر

فتوستنز، در بیوسنتز اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد که منجر به افزایش تولید اسانس می‌شود و با یافته‌های ما همخوانی داشت. براساس پژوهش‌های قبلی در مورد پتانسیل Fe-NPs و SA در افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی (Mozafari et al., 2018)، پیشنهاد می‌شود هر دو تیمار با افزایش فرآیندهای فتوستنز و متعاقب آن افزایش محتوای کربوهیدرات ممکن است سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شوند. احتمالاً برای ایجاد تعادل کربوهیدرات بین منبع و مخزن، گیاه کربوهیدرات‌های اضافی را به سمت تولید این متابولیت‌ها سوق داده است. یافته‌های پژوهش ما نیز نشان دادند محتوای قند محلول در برگ‌ها به‌طور قابل توجهی با شدت MNPs و SA افزایش نشان داد و بیانگر این است که افزایش قند محلول ممکن است مسئول افزایش تولید اسانس باشد. این نتایج با یافته‌های Ghasemzadeh و همکاران (۲۰۱۰) و Guo و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد.

### جمع‌بندی

به‌طور کلی، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد نانوذره سوپراپارامغناطیس اکسید آهن سنتز شده تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نه تنها سبب تنش اکسیداتیو در گیاه استبرق نشد، بلکه به‌عنوان یک ایستور مؤثر ضمن تأمین آهن مورد نیاز گیاه و افزایش محتویات کلروفیل و کارتنوئید، جذب عناصر غذایی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با فعالیت شبه‌پراکسیدازی خود، موجب افزایش معنی‌دار صفات کمی و کیفی استبرق از جمله افزایش متابولیت‌های دارویی شد. با

فعالیت آنزیم‌هایی نظیر SOD، CAT، APX و POD یا NAD(P)H اکسیداز متصل به غشای سیتوپلاسمی (آنزیم‌های دخیل در تولید یا تجزیه  $H_2O_2$ ) موجب افزایش موقت و جزئی در مقدار  $H_2O_2$  (به‌عنوان پیامبر ثانویه) شده که منجر به القای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول می‌شود (Horváth et al., 2007؛ Hayat et al., 2007). در پژوهش حاضر مشاهده شد تیمار SA در بالاترین غلظت همراه با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر MNPs سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT و APX شد، در مقابل تأثیر معنی‌داری بر فعالیت SOD نداشت.

نتایج ما نشان دادند ترپن‌ها با طیف وسیعی از کاربردهای صنعتی و دارویی، ترکیبات اصلی اسانس گیاهچه‌ها استبرق را تشکیل داده و MNPs و SA به‌ویژه تأثیر متقابل آن‌ها محرک‌های قوی برای القا آن‌ها هستند. تغییر در متابولیت‌های ثانویه و محتویات اسانس می‌تواند به علت تولید ROS، فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم یا تحریک بیان ژن‌های خاص در مسیر بیوسنتزی آن‌ها باشد و نشان‌دهنده سازوکار تطبیقی دیگری برای از بین بردن ROS تولید شده تحت تیمار غیرزیستی هستند. گزارش‌های قبلی نشان داد که افزایش مشاهده شده در غلظت ترپن‌ها تحت تیمارهای غیرزیستی با تخصیص اسکلت کربن بین رشد و دفاع همبستگی دارد، در حقیقت در این شرایط، گیاه کربن کمتری را صرف رشد کرده و بخش بیشتر آن را به ساخت ترپن‌ها، هیدروکربن‌های موجود در اسانس، اختصاص می‌دهد (Turtola et al., 2003). پژوهش Dubey و همکاران (۲۰۰۳) نیز نشان داد افزایش قندهای محلول، مهمترین محصول مستقیم

- <https://doi:10.1007/s11738-013-1369-8>
- Askary, M., Talebi, S. M., Amini, F., Dousti, A. & Bangan, B. (2017). Effects of iron nanoparticles on *Mentha piperita* L. under salinity stress. *Biologija*, 63, 65-75.  
<https://doi:10.6001/biologija.v63i1.3476>
- Banijamali, S. M. (2019). The effect of superparamagnetic iron oxide of magnetite nanoparticles with humic acid coating on quantitative and qualitative of cut chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* L.) in hydroponic circumstance. PhD thesis, Lorestan University, Lorestan, Iran [in Persian].
- Bastani, S., Hajiboland, R., Khatamian, M., & Saket Oskoui, M. (2018). Nano iron (Fe) complex is an effective source of Fe for tobacco plants grown under low Fe supply. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(2), 524-541.  
<https://doi:10.4067/S0718-95162018005001602>
- Ben Hamed, K., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. & Abdelly, C. (2007). Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*, 53, 185-194.  
<https://doi:10.1007/s10725-007-9217-8>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 248-254.  
<https://doi:10.1006/abio.1976.9999>
- Choedon, T., Mathan, G., Arya, S., Kumar, V. L. & Kumar, V. (2006). Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 2517-2522.  
<https://doi:10.3748/wjg.v12.i16.2517>
- Davies, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methylsilicon and carbowax 20M Phases. *Journal of*
- وجود این، تأثیر متقابل نانوذرات اکسید آهن و سالیسیلیک اسید در افزایش زیست توده، محتویات کلروفیل، قندهای محلول، مواد مغذی، متابولیت-های ثانویه و اجزای اسانس و کاهش محتوای  $H_2O_2$  و MDA در گیاهچه‌های تیمار شده چشمگیرتر بود.
- ### سپاسگزاری
- نویسندگان مقاله از همکاری و مساعدت دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان و همه عزیزانی که در این پژوهش یاری نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.
- ### References
- Abdi, G., Salehi, H. & Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 709-714.  
<https://doi:10.1007/s11738-008-0169-z>
- Adabavazeh, F., Nadernejad, N., Pourseyedi, Sh. Razavizadeh, R. & Mozafari, H. (2022). Synthesis of magnetic nanoparticles and their effects on growth and physiological parameters of *Calotropis procera* seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 59027-59042.  
<https://doi:10.1007/s11356-022-19660-7>
- Aebi, H. (1974). Catalases. In: *Methods of enzymatic analysis* (Ed. Bergmeyer, H. U.) 673-684. Academic Press, New York. <https://doi:10.1016/b978-0-12-091302-2.50032-3>
- Alidoust, D. & Isoda, A. (2013). Effect of  $\gamma Fe_2O_3$  nanoparticles on photosynthetic characteristic of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): foliar spray versus soil amendment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 3365-3375.

- soluble protein in seedling. *Plant Physiology*, 59, 315-318. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.315>
- Guo, R., Yuan, G. & Wang, Q. (2011). Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae*, 128, 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.01.014>
- Hashemi, S., Asrar, Z., Pourseyedi, Sh. & Nadernejad, N. (2019). Investigation of ZnO nanoparticles on proline, anthocyanin contents and photosynthetic pigments and lipid peroxidation in the soybean. *IET Nanobiotechnology*, 13(1), 66-70. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5212>
- Hayat, S., Ali, B. & Ahmad, A. (2007). Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In: *Salicylic acid: A plant hormone*. (Eds. Hayat, S. & Ahmad, A.) 1-141. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-5184-0_1)
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Horváth, E., Szalai, G. & Janda, T. (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 290-300. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9017-4>
- Iannone, M. F., Groppa, M. D., Sousa, M. E., Raap, M. B. F. V. & Benavides, M. P. (2016). Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.07.004>
- Kaur, A., Batish, D. R., Kaur, Sh. & Chauhan, B. S. (2021). An overview of *Chromatography A*, 503, 1-24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)81487-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81487-4)
- Dedjani, S. (2016). The effect of nano iron and salicylic acid on some morphophysiological characteristics strawberry under salt stress in vitro condition. MSc thesis, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran [in Persian].
- Dong, C. J., Wang, X. L. & Shang, Q. M. (2011). Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. *Scientia Horticulturae* 129(4): 629-636. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.005>
- Dubey, V. S., Bhalla, R. & Luthra, R. (2003). Sucrose mobilization in relation to essential oil biogenesis during palmarosa (*Cymbopogon martinii* Roxb. Wats. Var. Motia) inflorescence development. *Journal of Biosciences*, 28(4), 479-487. <https://doi.org/10.1007/BF02705122>
- Fales, F. W. (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 113-124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52433-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52433-4)
- Fariduddin, Q., Hayat, S. & Ahmad, A. (2003). Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 41, 281-284. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000011962.05991.6c>
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E. & Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15, 4324-4333. <https://doi.org/10.3390/molecules15064324>
- Giannitolitis, C. N. & Ries, S. K. (1997). Superoxide dismutase: II. Purification and quantitative relationship with water-



- between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment*, 408(16), 3053–3061. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>
- Mazaherinia, M., Astaraei, A. R., Fotovat, A. & Monshi, A. (2010). Nano iron oxide particles on Fe, Mn, Zn and Cu concentrations in wheat plant. *World Applied Science Journal*, 7 (1), 36-40.
- Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A. & Farjaminehad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 53(2), 104-111. <https://doi:10.1007/s11627-017-9802-0>
- Mokhtassi Bidgoli, A., Aghaalikhani, M., Nassiri-Mahallati, M., Zand, E., Gonzalez-Andujar, J. L. & Azari, A. (2013). Agronomic performance, seed quality and nitrogen uptake of *Descurainia Sophia* in response to different nitrogen rates and water regimes. *Industrial Crops and Products*, 44, 583-592. <https://doi:10.1016/j.indcrop.2012.09.018>
- Mozafari, A., Havas, F. & Ghaderi, N. (2018). Application of iron nanoparticles and salicylic acid in in vitro culture of strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) to cope with drought stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132, 511-523. <https://doi:10.1007/s11240-017-1347-8>
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880. <https://doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A076232>
- Nemeth, M., Janda, T., Hovarth, E., Paldi, E. & Szali, G. (2002). Exogenous salicylic acid increases polyamine the characteristics and potential of *Calotropis procera* from botanical, ecological, and economic perspectives, Rview. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi:10.3389/fpls.2021.690806>
- Khan, A. U., Khan, T., Khan, M. A. Nadhman, A., Aasim, M., Zaman Khan, N., Ali, W., Nazir, N. & Zahoor, M. (2021). Iron-doped zinc oxide nanoparticles-triggered elicitation of important phenolic compounds in cell cultures of *Fagonia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147, 287–296. <https://doi:10.1007/s11240-021-02123-1>
- Koo, Y. M., Heo, A. Y. & Choi, H. W. (2020). Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *The Plant Pathology Journal*, 36(1), 1-10. <https://doi:10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295>
- Korkmaz, A., Uzunlu, M. & Demirkairan, A. R. (2007). Treatment with acetylsalicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 503-508. <https://doi:10.1007/s11738-007-0060-3>
- Kornarzyński, K., Sujak, A., Czernel, G. & Wiącek, D. (2020). Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles on germination of seeds and concentration of elements in *Helianthus annuus* L. under constant magnetic field. *Scientific Reports*, 10, 8068. <https://doi:10.1038/s41598-020-64849-w>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio membranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. [https://doi:10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi:10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lin, C. C. & Kao, C. H. (1999). NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*, 216(1-2), 147-153. <https://doi:10.1023/A:1004714506156>
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. & Kolmakov, A. (2010). Interactions

- Sagner, S., Kneer, R., Wanner, G., Cosson, J. P., Deus-Neumann, B. & Zenk, M. H. (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry*, 47, 339-347. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00593-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00593-1)
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sheykhbaglou, R., Sedghi, M. & Fathi-Achachlouie, B. (2018). The effect of ferrous nano-oxide particles on physiological traits and nutritional compounds of soybean (*Glycine max* L.) seed. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1), 485-494. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160251>
- Sun, C., Zhou, R., Jianan, E., Sun, J. & Ren, H. (2015). Magnetic CuO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> anocomposite as a highly active heterogeneous catalyst of persulfate for 2, 4-dichlorophenol degradation in aqueous solution. *RSC Advances*, 5 (70), 57058-57066. <https://doi.org/10.1039/C5RA09821A>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M. & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development*. 6th edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Tawfik, M. M., Mohamed, M. H., Sadak, M. S. & Thalooh, A. T. (2021). Iron oxide nanoparticles effect on growth, physiological traits and nutritional contents of *Moringa oleifera* grown in saline environment. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 177-186. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00624-9>
- Turtola, S., Manninen, A. M., Rikala, R. & Kainulainen, P. (2003). Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 1981-1985. content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science*, 162(4), 569-574. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00593-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00593-3)
- Ngan, H. T. M., Tung, H. T., Le, B. V. & Nhut, D. T. (2020). Evaluation of root growth, antioxidant enzyme activity and mineral absorbability of carnation (*Dianthus caryophyllus* "Express golem") plantlets cultured in two culture systems supplemented with iron nanoparticles. *Scientia Horticulturae*, 272, 109612. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109612>
- Oktay, M., Gülçin, İ. & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 36, 263-271. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8)
- Pariona, N., Martínez, A. I., Hernandez-Flores, H. & Clark-Tapia, R. (2016). Effect of magnetite nanoparticles on the germination and early growth of *Quercus macdougalii*. *Science of the Total Environment*, 575, 869-875. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.128>
- Popova, L. P., Maslenkova, L. T., Yordanova, R. Y., Ivanova, A. P., Krantev, A. P., Szalai, G. & Janda, T. (2009). Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.11.007>
- Rawat, M., Nayan, R., Negi, B., Zaidi, M. G. H. & Arora, S. (2017). Physio-biochemical basis of iron-sulfide nanoparticle induced growth and seed yield enhancement in *Brassica juncea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 274-284. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.021>

their derivatives. *Taiwania*, 43(2), 116-122.  
[https://doi:10.6165/tai.1998.43\(2\).116](https://doi.org/10.6165/tai.1998.43(2).116)

[https://doi:10.1023/a:1025674116183](https://doi.org/10.1023/a:1025674116183)

Vadivel, N., Yuvakkumar, R., Suriyaprabha, R. & Rajendran, V. (2012). Catalytic effect of iron nanoparticles on heterocyst, protein and chlorophyll content of *Anabaena* sp.. *International Journal of Green Nanotechnology*, 4(3), 326-338.  
[https://doi:10.1080/19430892.2012.706185](https://doi.org/10.1080/19430892.2012.706185)

Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J., Shan, X. & Xing, B. (2011). Physiological effects of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*, 5(1), 30-42. [https://doi:10.3109/17435390.2010.489206](https://doi.org/10.3109/17435390.2010.489206)

Wei, H. & Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42, 6060-6093.  
[https://doi:10.1039/C3CS35486E](https://doi.org/10.1039/C3CS35486E)

Yang, C. M., Chang, K. W., Yin, M. H. & Huang, H. M. (1998). Methods for the determination of the chlorophylls and