

Reducing the toxicity of zinc nanoparticles and zinc sulfate in *Hypericum perforatum* L. with salicylic acid and sodium nitroprusside pretreatment

Elham Ghasemifar^{1*} , Ghader Habibi² 

¹ Department of Biology, Payam Noor University (PNU), Tehran, Iran, Email: e_ghasemifar@pnu.ac.ir

² Department of Biology, Payam Noor University (PNU), Tehran, Iran, Email: ghabibi@pnu.ac.ir

Article type:

Research article

Abstract

This study was aimed at designing of new methods to reduce the negative effect of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate on plant products. In the current study, the toxicity of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) and zinc sulfate (ZnSO₄) in *Hypericum perforatum* L. pretreated with salicylic acid and nitric oxide (sodium nitroprusside) at a concentration of 0.1 mM was investigated in a completely randomized design with three replicates as pot culture in perlite. After 21 days of treatment, the plants were harvested. The results of the variance analysis of the data in the laboratory showed that the application of 1000 mgL⁻¹ of zinc oxide or zinc sulfate nanoparticles caused more toxicity. However, the greatest effect is related to the pretreatment of salicylic acid and nitric oxide (sodium nitroprusside), which successfully reduced the value of the oxidative stress index (malondialdehyde) and as a result, the adverse effect of zinc on the seed germination of gerbera. The combination of salicylic acid and nitric oxide increased the amount of proline in the treatment of zinc oxide nanoparticles and phenol antioxidants had a significant increase under the effect of zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate, which was associated with an increase in the activity of the phenylalanine ammoni alyase enzyme. The amount of zinc in the roots also increased with the combination of salicylic acid and nitric oxide under the stress of zinc oxide nanoparticles.

Article history

Received: 30.01.2023

Revised: 21.04.2023

Accepted: 27.04.2023

Published: 21.06.2024

Keywords

Antioxidants
Salicylic acid
Toxicity
Hypericum
Zinc oxide
nanoparticles
Nitric oxide

Cite this article as: Ghasemifar, E., Habibi, Gh. (2023). Reducing the toxicity of zinc nanoparticles and zinc sulfate in *Hypericum perforatum* L. with salicylic acid and sodium nitroprusside pretreatment. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 19(2):1-18.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

تخفیف سمیت نانو اکسید روی و سولفات روی در گیاه دارویی گل راعی
Hypericum perforatum L. با استفاده از پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم

الهام قاسمی^{۱*}، قادر حبیبی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: e_ghasemifar@pnu.ac.ir

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، رایانامه: ghabibi@pnu.ac.ir

نوع مقاله:	چکیده
مقاله پژوهشی	این تحقیق با هدف طراحی روش‌های جدید برای کاهش اثر منفی نانوذرات اکسید روی و سولفات بر روی بر محصولات گیاهی انجام شد. در مطالعه حاضر میزان سمیت نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) و سولفات روی (ZnSO ₄) در گل راعی <i>Hypericum perforatum L.</i> پیش تیمار شده با اسید سالیسیلیک و نیتروپروساید سدیم در غلظت ۰/۱ میلی مولار، در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار به صورت کشت گلدانی در بستر پرلیت بررسی شد. پس از ۲۱ روز تیمار، گیاهان برداشت شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در آزمایشگاه نشان داد که اعمال ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اکسید روی یا سولفات روی سمیت بیشتری ایجاد کرد. بیشترین تاثیر در کاهش اثرات سمی نانوذرات اکسید روی مربوط به پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم بود که مقدار شاخص تنش اکسیداتیو (مالون دی آلدئید) را کاهش داد و در نتیجه تأثیر نامطلوب روی بر دانه‌رست‌های گل راعی را بهبود بخشید. ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتریک اسید، مقدار پرولین در تیمار نانوذرات اکسید روی را افزایش داد و آنتی‌اکسیدان‌های فنل تحت تأثیر اعمال این نانو ذرات و سولفات روی، افزایش معنی‌دار داشت که با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز همراه بود. مقدار روی در ریشه نیز با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتریک اسید، تحت تنش نانوذرات اکسید روی افزایش یافت.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۲/۰۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۷	
تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱	
واژه‌های کلیدی:	
آنتی اکسیدان‌ها	
سالیسیلیک اسید	
سمیت	
گل راعی	
نانوذرات اکسید روی	
نیتریک اسید	

استناد: قاسمی فر، الهام؛ حبیبی، قادر. (۱۴۰۳). تخفیف سمیت نانو اکسید روی و سولفات روی در گیاه دارویی گل راعی *Hypericum perforatum L.* با استفاده از پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم. فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۹(۲)، ۱۸-۱.

مقدمه

(Prakash et al., 2021). در تحقیقات نشان داده است نیتروپروساییدسیدیم سمیت نانوذرات اکسیدروی را در گیاهان *Oryza sativa* و *Triticum aestivum* با ایجاد تغییراتی در آسیب اکسیداتیو و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی محدود کرد (Chen et al., 2015; Tripathi et al., 2017). مطالعات پیشین نشان داد که استفاده از نیتروپروساییدسیدیم خارجی باعث بهبود سمیت سلولی ناشی از نانوذرات اکسیدروی در گیاهان خردل *Brassica juncea* گشت (Bhat et al., 2021). در گیاهان تیمار شده با نانوذرات روی بدون اعمال سالیسیلیک‌اسید، مقدار مالون دی‌آلدئید و پراکسیدهایروژن به صورت قابل توجهی افزایش یافت که نشان می‌دهد نانوذرات اکسیدروی باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Ghosh et al., 2016; Molnár et al., 2020; Zoufan et al., 2020).

گزارشات نشان داده است سالیسیلیک‌اسید ممکن است نقش مهمی در افزایش یکپارچگی غشاها با کنترل عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی داشته باشد که می‌تواند جذب مواد غذایی و رشد را در گیاهان تحت تیمار نانوذرات اکسیدروی بهبود بخشد. افزایش مقدار پرولین، ترکیبات فنولی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان پیش‌تیمار شده با سالیسیلیک‌اسید این تفسیر را تأیید می‌کند. تنش اکسیداتیو توسط نانوذرات اکسیدروی کاهش می‌یابد (Bhat et al., 2021) اما در هیچ مطالعه‌ای نقش ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتریک‌اکسید در این کاهش مشاهده نشده است.

این نتایج نشان داد که پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید یا نیتروپروساییدسیدیم برای گیاه *Hypericum perforatum* L تحت تنش نانوذرات اکسیدروی موثر است، با این حال، تداخل بین نیتروپروساییدسیدیم و سالیسیلیک‌اسید نیاز به بررسی بیشتر دارد. علاوه بر این، برای درک بهتر اثرات نانوذرات اکسیدروی

نانوتکنولوژی کشاورزی با استفاده از نانوذرات فلزی در تغذیه گیاهی، سیستم‌های تولید محصول را بهبود بخشیده است (Faizan et al., 2017). در میان نانوذرات اکسید فلز، نانوذرات اکسیدروی (ZnO NPs) به دلیل ظرفیت فوتوکاتالیستی و فتواکسیدانی خود در برابر سایر ترکیبات شیمیایی و زیستی، توجه محققان را به خود جلب کرده است (Chikkanna et al., 2019). با این حال، چندین مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسیدروی اثرات مثبت و منفی بر تنظیم رشد محصول دارد (Pullagurala et al., 2018; Li et al., 2020). استفاده روزافزون از نانوذرات اکسیدروی در کشاورزی نیاز به بررسی تاثیر آنها بر محصولات را ایجاد می‌کند. به عنوان مثال، کاربرد نانوذرات اکسیدروی در دانه‌های گندم در غلظت کم (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) جذب آب را بهبود بخشید که منجر به بهبود فعالیت آلفا آمیلاز و محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل a و کلروفیل b و محتوای کلروفیل کل گشت (Kalal et al., 2021). در *Arabidopsis thaliana*، نانوذرات اکسیدروی بیوسنتز کلروفیل و کارایی فتوسنتز را با مهار بیان ژن‌های مرتبط با سنتز کلروفیل تحت تاثیر قرار داد (Wang et al., 2016).

غلظت بالای روی در بافت‌های گیاهی می‌تواند بر تولید رادیکال‌های آزاد و سطوح مالون دی‌آلدئید تأثیر بگذارد (Gaschler et al., 2017). گونه‌های فعال اکسیژن بسیار واکنش‌پذیر هستند و می‌توانند باعث تنش اکسیداتیو در موجودات زنده شوند (García-Gómez et al., 2017). در این راستا، پیش‌تیمار گیاه با رادیکال آزاد نیتروپروساییدسیدیم (NO) و فیتوهورمون فنولیک سالیسیلیک‌اسید (SA) می‌تواند اثرات منفی تنش غیرزیستی در گیاهان را کاهش دهد (Habibi, 2019; Sharma et al., 2020).

واکنش‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه، در مواجهه با سولفات روی نیز بررسی شد. هدف این مطالعه برجسته کردن جنبه‌های کاهش‌دهنده تاثیر سمیت نانوذرات توسط سالیسیلیک‌اسید، نیتروپروپوساید سدیم و ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوساید سدیم است و به طور انتقادی به بحث در مورد سمیت اکسیدروی (ZnO) و سولفات روی (ZnSO₄) در گیاه *Hypericum perforatum* L. می‌پردازد و راندمان حذف این مواد سمی را از خاک بهبود می‌بخشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار: بذر *Hypericum perforatum* L. (معمولاً به نام هوفاریقون، گل راعی، علف هزار چشم و علف چای) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی استوانه‌ای شکل حاوی پرلیت کاشته شد و سپس با ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند (هر سه روز یکبار) به صورت متناوب با آب مقطر آبیاری شد. قطر گلدان‌ها ۱۴ سانتی‌متر و عمق ۴۵ سانتی‌متر بود. برای پیش‌تیمار، بذر گل راعی در محلول‌های نیتروپروپوساید سدیم (SNP)، به عنوان اهداکننده (NO) و سالیسیلیک‌اسید (SA) به مدت ۱۲ ساعت خیسانده شد. در یک مطالعه مقدماتی، غلظت‌های موثر نیتروپروپوساید سدیم و سالیسیلیک‌اسید، با توجه به تاثیر غلظت‌های مختلف نیتروپروپوساید سدیم (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار نیتروپروپوساید سدیم) و سالیسیلیک‌اسید (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید) در جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه گل راعی انتخاب شدند. شانزده هفته پس از کاشت، زمانی که بوته‌ها حدود ۱۰ سانتی‌متر ارتفاع داشتند، گلدان‌ها با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات اکسیدروی یا محلول سولفات روی محلول در آب، به مدت ۲۱ روز (تیمار روی) آبیاری شد. نانوذرات اکسیدروی از شرکت

معتبر «پیشگامان نانومواد ایران، مشهد، ایران» تهیه شده‌است. خصوصیات فیزیکوشیمیایی این نانو محصول به شرح زیر است: خلوص: ۹۹ درصد؛ APS ۳۰-۱۰ نانومتر. SSA ۲۰-۶۰. رنگ سفید؛ مورفولوژی: کروی؛ چگالی واقعی: ۵/۶۰۶ گرم بر سانتی‌متر مکعب و نمک سولفات روی (ZnSO₄) از شرکت سیگما خریداری شد و به منظور کنترل حجم مورد استفاده قرار گرفت. در یک مطالعه مقدماتی غلظت نانوذرات اکسیدروی و نمک سولفات روی موثر (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با توجه به تاثیر غلظت‌های مختلف آنها (۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه انتخاب شد. گیاهان شاهد با محلول غذایی بدون روی، نیتروپروپوساید سدیم و سالیسیلیک‌اسید آبیاری شدند. گیاهان در گلخانه با شرایط دمای روز و شب به ترتیب ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۹ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد و تراکم جریان نوری روزانه حدود ۳۵۰-۴۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه در طول دوره آزمایش نگهداری شدند.

برداشت گیاه جهت سنجش: پس از ۲۱ روز از تیمار روی، گیاهان برای تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی برداشت شدند. پس از تعیین وزن تر (FW)، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای تعیین وزن خشک (DW) خشک شدند. برای آزمایشات بعدی، نمونه‌ها بلافاصله در N₂ مایع تا زمان سنجش ذخیره شدند.

سنجش کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها: جهت سنجش مقدار رنگیزه‌های برگ، نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر شستشو و روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۶۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها در داخل ورقه آلومینیومی قرار گرفته و در ازت مایع تا زمان سنجش نگهداری شدند. استخراج رنگیزه با

روش اصلاح شده Zucker (۱۹۶۵) تعیین شد. یک واحد (U) از فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز به عنوان مقدار آنزیمی که یک نانومول سینامیک اسید در ساعت تولید می کند، تعریف شده است. ترکیبات فنلی کل با روش Velioglu و همکاران (۱۹۹۸) اندازه گیری شد. برای ساخت منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد. نتایج به عنوان میلی گرم گالیک اسید (GA) به ازای هر گرم وزن تازه تعریف شد. محتوای فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کورستین اندازه گیری شد و به صورت میلی گرم معادل کورستین ۱۰۰/(QE) گرم عصاره بیان شد. غلظت آنتوسیانین با استفاده از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۳) اندازه گیری شد. مقدار آنتوسیانین بر اساس cyaniding-3-gluco-side mg. g⁻¹ FW گزارش شد.

سنجش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و متابولیت های سیستم آنتی اکسیدانی: فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD, EC 1.15.1.1) بر اساس روش (Giannopolitis & Ries, 1977) اندازه گیری شد و جذب عصاره آنزیمی در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. یک واحد سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیمی که ۵۰ درصد مهار کاهش نیتروکلرید تترازولیوم را در شرایط سنجش ایجاد می کند، 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 و Doran (۲۰۰۲) تعیین شد. سنجش مالون دی آلدئید به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیبیدها بر اساس روش (Habibi and Hajiboland., 2012) صورت گرفت.

تعیین غلظت نیتروپرو ساید سدیم (NO): غلظت نیتریک اکسید با استفاده از روش Wu و همکاران (۲۰۱۶) اندازه گیری شد. پس از استخراج عصاره

استفاده از حلال استن روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها به وسیله اسپکتروفتومتر (Shimadzu AA-6500, Kyoto, Japan)، بعد از ۲۴ ساعت استخراج در استن ۱۰۰ درصد اندازه گیری شد. جذب نمونه ها در ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری و غلظت کلروفیلها a و b و کاروتنوئیدها طبق فرمول های زیر محاسبه گردید (Lichtenthaler & Wellburn, 1985).

$$C_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$C_b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 A_{470} - 2.27 C_a - 81.4 C_b / 22$$

$$C_a = \text{کلروفیل } a, C_b = \text{کلروفیل } b, C_{x+c} = \text{کارتنوئید}$$

کل، $A =$ جذب در طول موج

تعیین قندهای محلول، نشاسته و پرولین: غلظت قندهای محلول بر اساس روش Quentin و همکاران (۲۰۱۵) تعیین شد. پس از استخراج عصاره، مواد رویی تحت آنالیز قندهای محلول توسط معرف آنترون سولفوریک در ۶۳۰ نانومتر قرار گرفتند. برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز (سیگما) استفاده شد. رسوب حاصل برای آنالیز نشاسته با پیروی از روش Magne و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد و جذب در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. برای ترسیم منحنی استاندارد از نشاسته (Merck) استفاده شد. برای استخراج سنجش پرولین آزاد در نمونه ها از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده گردید. پس از استخراج عصاره های گیاهی، جذب آن ها در ۵۲۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. در نهایت مقدار پرولین نمونه ها بر حسب میکرومول بر گرم ماده تر محاسبه شد.

سنجش فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل: فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز، با اندازه گیری میزان جذب سینامیک اسید با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس

استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون در محدوده ppm ۰/۲۵ تا ۰/۷۸ انجام و معادلات آن‌ها اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

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

نتایج

تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که پیش‌تیمار نیتروپروپوساید سدیم و سالیسیلیک‌اسید در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به طور قابل توجهی جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه را افزایش داد (شکل ۱).

تجمع نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی و تاثیر

آن بر پارامترهای رشد: با توجه به نتایج کاهش معنی‌دار مقدار وزن خشک اندام‌های هوایی در سطح ۰/۵٪، در نمونه‌های تحت تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی پیش‌تیمار شده به ترتیب با میانگین ۰/۳۳، ۰/۳۵ گرم و پیش‌تیمار نشده به ترتیب با میانگین ۰/۳۸، ۰/۳۴ گرم نسبت به میانگین شاهد ۰/۶ گرم بدست آمد. اعمال نانوذرات اکسیدروی وزن خشک ریشه را در پیش‌تیمارهای نیتروپروپوساید سدیم و ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوساید سدیم با میانگین ۰/۰۹، ۰/۰۸ گرم در مقایسه با میانگین شاهد ۰/۱۵ گرم کاهش داد. در این مطالعه، وزن خشک ریشه در تنش نانوذرات اکسیدروی و پیش‌تیمار سالیسیلیک‌اسید به میزان ۰/۱۴ گرم نسبت به شاهد بهبود نشان داد (شکل ۲). مقدار روی در اندام‌های هوایی و ریشه‌ها تحت تاثیر تیمار نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی افزایش معنی‌داری در سطح ۰/۵٪ داشت و این افزایش در تیمار نانوذرات اکسیدروی بیشتر بود (جدول ۱). بیشترین افزایش روی در برگ‌های پیش

جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت نیتروپروپوساید سدیم با استفاده از یک منحنی استاندارد رسم شده با غلظت‌های شناخته شده نیترات سدیم محاسبه شد.

تعیین محتوای روی: محلول هضم شده گیاهی در آب مقطر رقیق شد، و محتوای روی با طیف‌سنجی انتشار پلاسما-امی القایی جفت شده (ICP-AES, INTEGRA XL2, GBC; Australia) برآورد شد.

تجزیه و تحلیل HPLC: عصاره برگ (۲ گرم) با استفاده از متانول (۵ میلی‌لیتر) به عنوان حلال تهیه و فیلتر گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون، محلول‌های ذخیره حاوی ترکیبات فنلی شناسایی با متانول تهیه شد تا غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آید و منحنی‌های کالیبراسیون برای نمونه‌های استاندارد با رسم مساحت پیک ترکیبات فنلی شناسایی و غلظت آن‌ها از طریق رقیق‌سازی ساخته شد. از هر محلول موجود در متانول به شش غلظت (0.78ppm, 1.58 ppm, 3.12 ppm, 6.25 ppm و 25ppm). آنالیز HPLC با استفاده از یک سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1290 با آشکارساز آرایه دیود (DAD) مطابق با Sinrod و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد. جداسازی بر روی یک ستون جداسازی Eurospher 100-5 C18 به ابعاد ۲۵ سانتی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر با پیش‌ستون ارائه شده توسط Knauer (برلین، آلمان) به دست آمد. جمع‌آوری و ادغام داده‌ها با نرم‌افزار EZchrom Elite انجام شد. نمونه ۲۰ میکرولیتری از عصاره متانولی در برگ‌ها از طریق یک آنالیزاتور Smartline Autosampler ۳۹۰۰ مجهز به حلقه ۱۰۰ میکرولیتری به ستون HPLC تزریق گردید. جداسازی با استفاده از اسید تری‌فلوئورواستیک ۰/۰۲ درصد در آب (شستشوی A) و متانول (شستشوی D) انجام شد. کمی‌سازی هر پیک اسیدهای فنلی با

تیمار شده با ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم تحت تاثیر نانوذرات اکسیدروی مشاهده شد. مقدار روی ریشه‌های گل راعی پیش‌تیمار شده با ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم در تنش نانوذرات اکسیدروی افزایش داشت، در حالی که پیش‌تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم موجب کاهش مقدار روی در برگ‌ها در مقایسه با ریشه‌ها شد (جدول ۱).

تاثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی بر کلروفیل کل، کاروتنوئیدها: مقدار کلروفیل a برگ‌های پیش‌تیمار شده با ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم در شرایط تنش نانوذرات اکسیدروی با میانگین $13/1$ میلی‌گرم نسبت به میانگین شاهد $19/3$ میلی‌گرم کاهش داشت. مقدار کلروفیل a گیاه در تنش سولفات روی با میانگین $14/4$ میلی‌گرم کاهش داشت، درحالی‌که در تنش سولفات روی و پیش‌تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم با میانگین $19/2$ میلی‌گرم بهبود مشاهده شد (شکل ۳). کمترین مقدار کلروفیل کل برگ‌ها در تنش نانوذرات اکسیدروی و پیش‌تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم با میانگین $19/1$ میلی‌گرم در مقایسه با شاهد (میانگین 25 میلی‌گرم) مشاهده شد، در حالی‌که تحت تنش سولفات روی و پیش‌تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم با میانگین $24/5$ میلی‌گرم بهبود مشاهده شد (شکل ۳). مقدار کاروتنوئید برگ‌ها تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی قرار نگرفت، درحالی‌که بیشترین مقدار کاروتنوئید در پیش‌تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم در تنش نانوذرات اکسیدروی با میانگین $10/2$ میلی‌گرم نسبت به شاهد ($5/4$ میلی‌گرم) حاصل شد (شکل ۴).

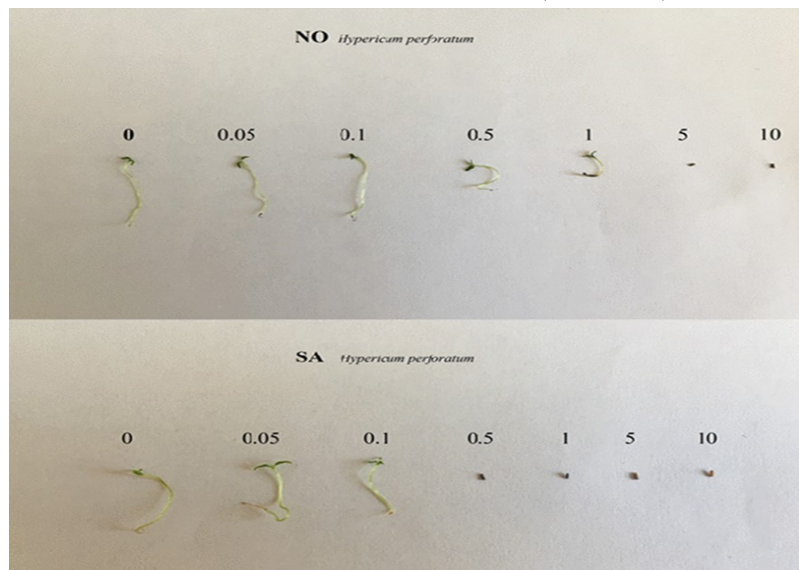
تاثیر نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی بر مقدار قندهای محلول، نشاسته و پرولین: بیشترین افزایش مقدار قندهای محلول و نشاسته برگ در تنش نانوذرات اکسیدروی با میانگین $8/5$ قند نسبت به میانگین شاهد $6/4$ و میانگین $1/9$ نشاسته نسبت به میانگین شاهد $1/3$ میلی‌گرم بر گرم بدست آمد. تیمار سولفات روی موجب افزایش مقدار نشاسته با میانگین $1/7$ میلی‌گرم بر گرم شد (شکل ۵). افزایش مقدار پرولین برگ‌ها تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی با میانگین $44/2$ میکروگرم بر گرم نسبت به میانگین شاهد $25/3$ میکروگرم بر گرم مشاهده شد. بیشترین افزایش مقدار پرولین برگ‌ها در پیش‌تیمار ترکیب سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم تحت تنش نانوذرات اکسیدروی با میانگین $48/3$ میکروگرم بر گرم حاصل شد (شکل ۵).

تاثیر نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای کلی ترکیبات فنلی، فلاونوئید، آنتوسیانین و نیتریک‌اکسید: بیشترین افزایش فنل برگ‌ها در تنش سولفات روی با میانگین $2/4$ میلی‌گرم نسبت به شاهد با میانگین $1/5$ میلی‌گرم بدست آمد (شکل ۷). بیشترین افزایش فلاونوئید برگ‌ها در تنش نانوذرات اکسیدروی با میانگین $1/16$ و سولفات روی $1/19$ میلی‌گرم بر گرم و در پیش‌تیمار نیتروپروپوسایدسدم تحت تاثیر تنش سولفات روی $1/34$ نسبت به میانگین شاهد $0/76$ میلی‌گرم بر گرم بدست آمد. بیشترین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیل‌آز در پیش‌تیمار ترکیبی سالیسیلیک‌اسید و نیتروپروپوسایدسدم تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی $1/23$ و سولفات روی $1/53$ نسبت به میانگین شاهد $0/89$ میکرومول بر میلی‌گرم حاصل شد. آنتوسیانین تحت تاثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی در گیاهان پیش‌تیمار شده و نشده قرار نگرفت (شکل ۶).

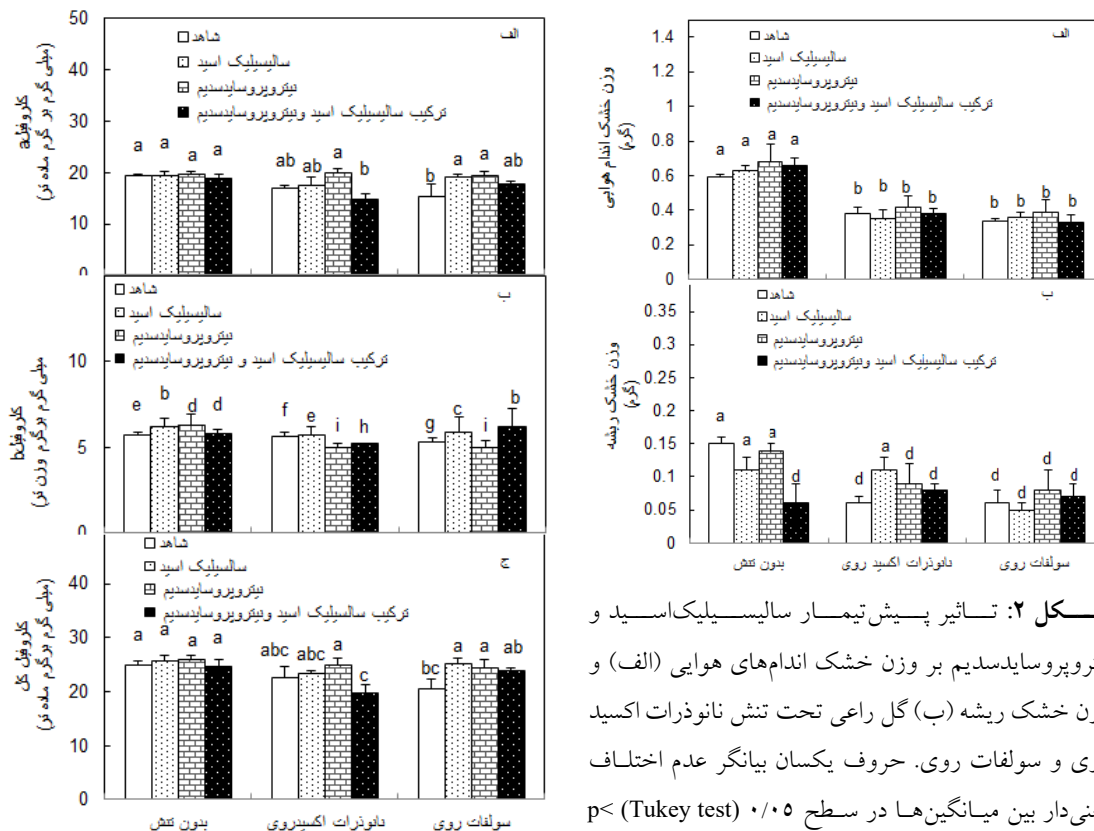
شد. بیشترین افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تنش نانوذرات اکسیدروی با میانگین ۵ میکروگرم بر میلی گرم نسبت به میانگین شاهد ۳/۰۵ میکروگرم بر میلی گرم مشاهده شد (شکل ۷). تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی موجب افزایش مقدار نیتریک اکسید برگها با میانگین ۹۶/۸ و ۹۷/۸ نانومول بر گرم نسبت به شاهد (۴۸/۱ نانومول بر گرم) شد و بیشترین افزایش نیتریک اکسید در تنش سولفات روی با پیش تیمار نیتروپروساید سدیم و میانگین ۱۰۳/۵ نانومول بر گرم بدست آمد (شکل ۹). در تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی، بیشترین مقدار پراکسید هیدروژن به ترتیب با میانگین ۰/۹، ۰/۹۸ میکرومول بر میلی گرم در مقایسه با شاهد ۰/۴۳ میکرومول بر میلی گرم و بیشترین مقدار مالون دی آلدئید با میانگین ۲۳/۶، ۲۱/۳ در مقایسه با شاهد ۱۳/۵ نانومول بر گرم مشاهده شد، در حالی که پیش تیمار نیتروپروساید سدیم در تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی، مقدار مالون دی آلدئید با میانگین ۱۳ نانومول بر گرم را کاهش داد (شکل ۸).

اسیدهای فنلی اصلی و فلاونوئیدها در عصاره متانولی برگ گل را با استفاده از آنالیز HPLC ارزیابی شد (جدول ۲). پیش تیمار سالیسیلیک اسید یا نیتروپروساید سدیم و ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم موجب افزایش معنی دار مقدار کورسیتین، اسید کلروژنیک و روتین در مقایسه با شاهد شد. مقدار اسید کلروژنیک تحت تاثیر نانوذرات اکسیدروی افزایش معنی داری در سطح ۰.۵٪ نشان داد (جدول ۲). از سوی دیگر، پیش تیمار بذرها با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم باعث افزایش معنی دار مقدار روتین و اسید کلروژنیک تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی شد.

پیش تیمار بذرها با نیتروپروساید سدیم و ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروساید سدیم با میانگین ۱/۲۱ و ۱/۱۶ میکروگرم بر میلی گرم نسبت به میانگین شاهد ۰/۵۳ میکروگرم بر میلی گرم موجب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگها شد. بیشترین افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی با میانگین ۱/۶۳ و ۱/۲۱ میکروگرم بر میلی گرم حاصل

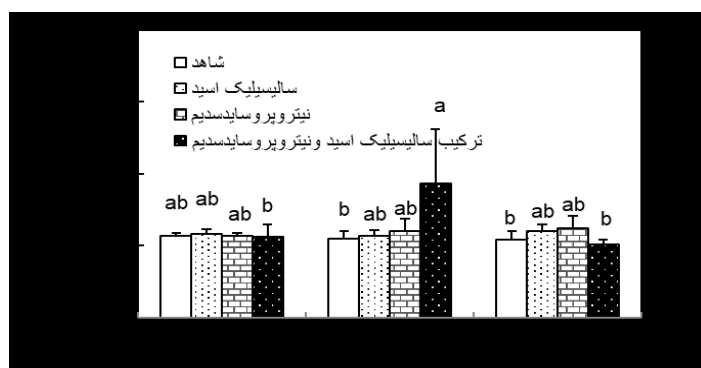


شکل ۸: تاثیر نیتروپروساید سدیم و سالیسیلیک اسید در جوانه زنی بذر گل راعی. بذرها در غلظت های مختلف نیتروپروساید سدیم (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار نیتروپروساید سدیم) و سالیسیلیک اسید (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار سالیسیلیک اسید) به مدت ۱۲ ساعت خیسانده شد.

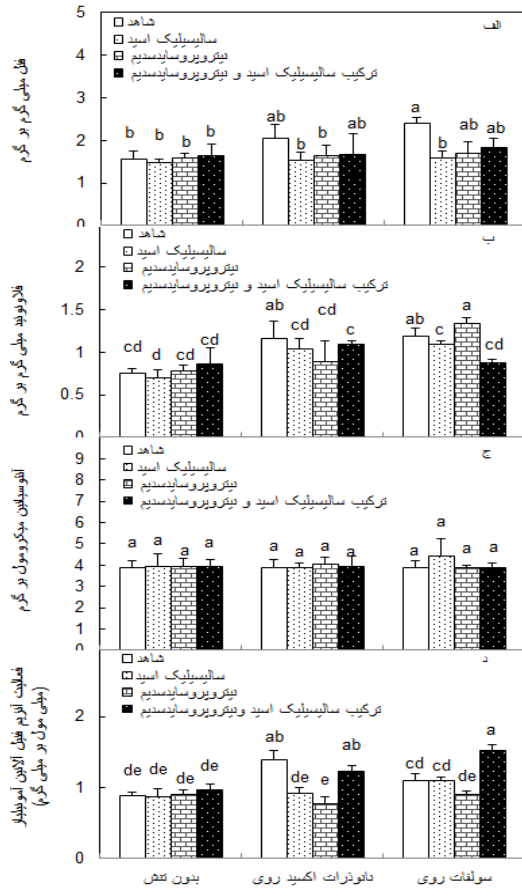


شکل ۲: تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروکسایدسیدیم بر وزن خشک اندام های هوایی (الف) و وزن خشک ریشه (ب) گل راعی تحت تنش نانوذرات اکسید روی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p < 0.05$ (Tukey test) است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.

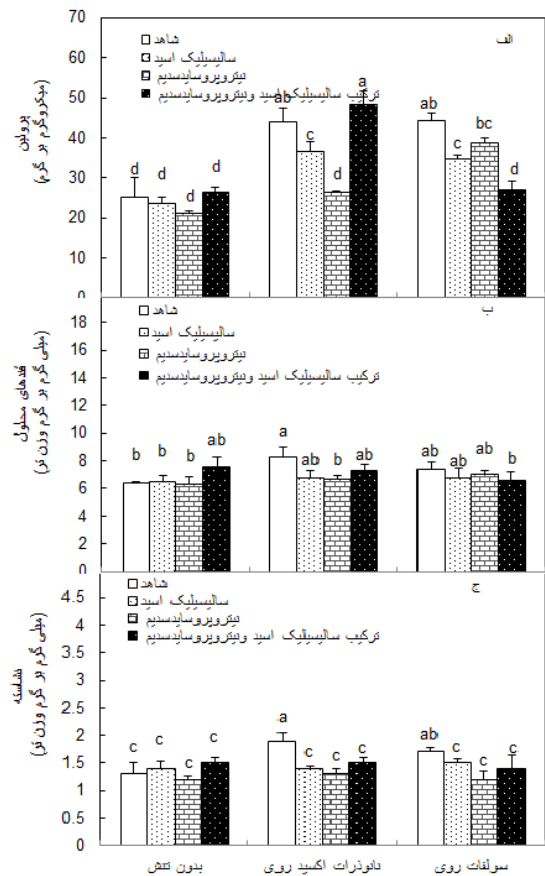
شکل ۳: تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروکسایدسیدیم بر مقدار کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب)، کلروفیل کل (ج) و نسبت کلروفیل b به a (د) برگ های گل راعی تحت تنش نانوذرات اکسید روی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p < 0.05$ (Tukey test) است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.



شکل ۴: تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروکسایدسیدیم بر مقدار کارتنوئیدها برگ های گل راعی تحت تنش اکسید روی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p < 0.05$ (Tukey test) است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.



شکل ۶: تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروکسایدسیدیم بر مقدار فنل کل (الف)، فلاونوئیدها (ب)، آنتوسیانین (ج) و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (د) برگ های گل راعی تحت تنش نانو ذرات اکسیدروی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p < 0.05$ (Tukey test) است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.



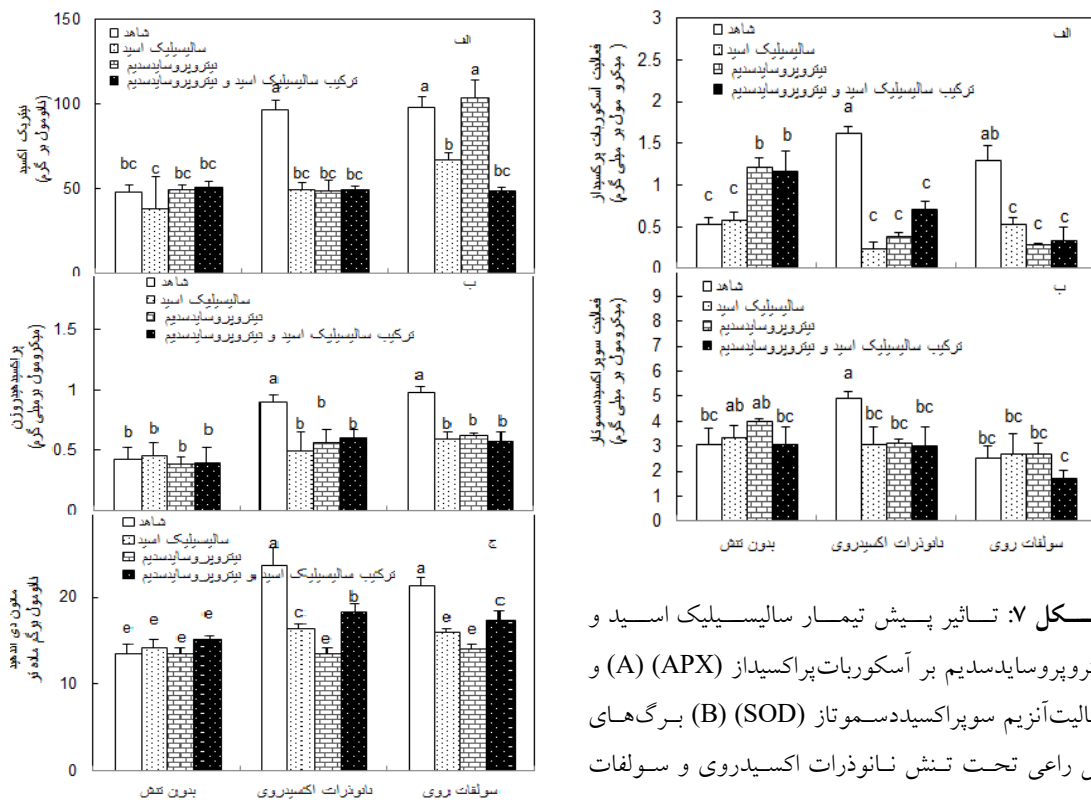
شکل ۵: تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروکسایدسیدیم بر مقدار پروتئین (الف)، قندهای محلول (ب) و نشاسته (ج) برگ های گل راعی تحت تنش نانو ذرات اکسیدروی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p < 0.05$ (Tukey test) است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.

جدول ۱: تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروکسایدسیدیم بر مقدار روی ($\mu\text{g g}^{-1}$) در گل راعی تحت تنش نانو ذرات اکسید روی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح $p < 0.05$ (Tukey test) است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.

تیمار	غلظت یون روی اندام هوایی	غلظت یون روی در دریشه
کنترل	0.13 ± 0.03^c	1.16 ± 0.2^d
نانوذرات روی	0.76 ± 0.23^a	11.07 ± 0.65^a
نانوذرات روی و پیش تیمار ترکیبی	3.76 ± 0.1^c	1.05 ± 0.06^b
سولفات روی	4.06 ± 0.23^b	6.02 ± 0.45^c
سولفات روی و پیش تیمار ترکیبی	2.92 ± 0.13^d	6.05 ± 0.7^c

جدول ۲: تاثیر پيش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم بر مقدار فنل و فلاونوئید (mg ml⁻¹) عصاره متانولی (۲ گرم برگ در ۵ میلی لیتر متانول) برگ های گل راعی تحت تنش نانوذرات اکسید روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ۰/۰۵ (Tukey test) p < است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.

تیمار	کلروژنیک اسید	کوئرین	روتین
کنترل	۰/۵۵±۰/۰۱ ^e	۳±۰/۴۱ ^b	۱۶/۵±۰/۹۶ ^d
سالیسیلیک اسید	۲/۷۲±۰/۱۲ ^b	۴/۶۴±۰/۴۹ ^a	۱۳/۱۳±۰/۱۹ ^c
نیتریک اسید	۱/۴۶±۰/۲۲ ^{cd}	۳/۳۶±۰/۲۲ ^b	۲۷/۱±۱/۷۹ ^b
پیش تیمار ترکیبی نانوذرات روی	۱/۲۵±۰/۰۵ ^d	۲/۱۹±۰/۰۱ ^c	۱۳/۲۳±۰/۰۲ ^c
نانوذرات روی و سالیسیلیک اسید	.	.	۲۰/۷۸±۱/۰۲ ^c
نانوذرات روی و نیتریک اسید	.	.	۷±۰/۱۵ ^f
نانوذرات روی و پیش تیمار ترکیبی	۳/۵±۰/۱۶ ^a	۱/۸۵±۰/۱۴ ^c	۵۱/۵۶±۱/۹۵ ^a



شکل ۷: تاثیر پيش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم بر آسکوربات پراکسیداز (APX) (A) و فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز (SOD) (B) برگ های گل راعی تحت تنش نانوذرات اکسید روی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ۰/۰۵ (Tukey test) p < است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.

شکل ۸: تاثیر پيش تیمار سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم بر مقدار نیتریک اکسید (NO) (A)، پراکسیددهیدروژن (H₂O₂) (B) و مالون دی آلدئید (MDA) (C) برگ های گل راعی تحت تنش نانوذرات اکسید روی و سولفات روی. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح ۰/۰۵ (Tukey test) p < است. مقادیر، میانگین \pm SD (n=3) (انحراف معیار) است.

بحث

تجمع نانو ذرات اکسیدروی و یون های روی و تاثیر آن بر پارامترهای رشد: در این مطالعه، مقدار وزن خشک ریشه تحت تاثیر اعمال نانو ذرات اکسیدروی و سولفات روی کاهش معنی داری در سطح ۵ درصد داشت. مطالعات پیشین نشان دادند که اثر سمیت نانو ذرات اکسیدروی در رشد و نمو گیاه بیشتر به دلیل ایجاد تنش اکسیداتیو است (Bandyopadhyay et al., 2015). روی عنصر ضروری برای متابولیسم گیاه است، اما مقادیر اضافی روی در گیاه می تواند باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و کاهش رشد شود (Zoufan et al., 2020). مقدار وزن خشک اندام های هوایی تحت تاثیر اعمال نانو ذرات اکسیدروی در گیاهان پیش تیمار شده و نشده کاهش معنی داری نشان داد، همسو با این نتایج Wang و همکاران (۲۰۱۶) برای بررسی بیشتر مکانیسم های سمیت نانو ذرات روی، اثرات نانو ذرات اکسیدروی را در تجمع زیست توده و فتوسنتز در آراییدوپسیس مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که نانو ذرات اکسیدروی موجب کاهش تجمع زیست توده در شاخه ها و ریشه ها می شود. کاهش وزن خشک ریشه تحت تاثیر اعمال پرایمینگ سالیسیلیک اسید در تنش نانو ذرات اکسیدروی، بهبود یافت. همسو با این یافته ها Arif و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که سالیسیلیک اسید می تواند اثرات نامطلوب تنش های غیرزیستی را بر رشد و عملکرد گیاه کاهش دهد (Arif et al., 2020). مقدار روی در اندام هوایی و ریشه ها تحت تاثیر تیمار نانو ذرات اکسیدروی و سولفات روی افزایش معنی داری داشت و این افزایش در تیمار نانو ذرات اکسیدروی بیشتر بود. مقدار روی در ریشه های پیش تیمار شده با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروپوساید سدیم تحت تاثیر نانو ذرات اکسیدروی

افزایش معنی داری داشت. Chen و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که گیاهان می توانند روند تخریب نانو ذرات اکسیدروی را در ریشه تسریع کنند و در نتیجه غلظت یون روی در ریشه افزایش یابد. این مطالعه نشان داد که تجمع و احتباس یون روی در ریشه پیش تیمار شده با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروپوساید سدیم تحت تاثیر تنش نانو ذرات اکسیدروی و کاهش انتقال آن به اندام هوایی، مکانیسم موثری برای کاهش تنش اکسیداتیو در اندام هوایی، حفظ یکپارچگی غشاهای زیستی و افزایش رشد در گیاهان است.

تاثیر نانو ذرات اکسیدروی و سولفات روی بر کلروفیل کل، کاروتنوئیدها: گیاهان به مکانیسم های متعددی مجهز هستند تا دستگاه فتوسنتزی را از آسیب های ناشی از تنش فلزات سنگین حفظ کنند و در کلروپلاست ها، کاروتنوئیدها به عنوان جاروب کننده گونه های فعال اکسیژن عمل می کنند (Gomes et al., 2013). در این پژوهش، مقدار کلروفیل a و کل، تحت تاثیر اعمال سولفات روی کاهش معنی داری نشان داد. همسو با این نتایج گزارش شد که اعمال فلز کادمیوم در گیاهچه های چچم (*Lolium Spp*) موجب نگرز و کلروز برگ ها شد (Wang et al., 2016). برخی از مطالعات پیشین نشان می دهد که افزودن نانو ذرات اکسیدروی و سولفات روی در غلظت های بالا (۴۰۰-۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به خاک موجب کاهش تجمع کلروفیل ها و کاروتنوئیدها در برنج (*Oryza sativa*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicon*) شد (García-Gómez et al., 2017; Samart et al., 2017). فلزات سنگین در اندام های مختلف گیاهی انباشته شده و بر سنتز رنگدانه های فتوسنتزی از جمله کاروتنوئیدها و

نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی در گیاهان پیش تیمار شده با نیتروپروسایدسدیم و ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم افزایش معنی دار داشت. این یافته‌ها با نتایج تحقیق Filippou و همکاران (۲۰۱۳) مشابه بود. نتایج آن‌ها نشان داد که سدیم نیتروپروساید مقدار پرولین را در گیاهان تیمار شده با نانوذرات روی افزایش می‌دهد. می‌توان گفت، نیتروپروسایدسدیم فعالیت آنزیم دلتا ۱- پیرولین-۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) را افزایش می‌دهد، این آنزیم با بیوستنز پرولین از گلو تامات ارتباط دارد (Filippou et al., 2013). در این مطالعه، افزایش معنی دار مقدار فندهای محلول، نشاسته و پرولین تحت تاثیر نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی با تنظیم پتانسیل اسمزی و حذف گونه‌های فعال اکسیژن، در تحمل تنش گل راعی کمک می‌کنند.

تاثیر نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی در فعالیت آنتی اکسیدانی، محتوای کلی ترکیبات فنلی، فلاونوئید، آنتوسیانین و نیتریک اکسید: در این مطالعه، مقدار فلاونوئیدهای برگ‌ها تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی افزایش معنی دار نشان داد که با افزایش معنی دار در فعالیت فنیل آلانین آمونیا لایز همراه بود. مطالعات بسیاری نشان داد که افزایش تولید ترکیبات فنلی تحت تنش فلزات سنگین می‌تواند از آسیب اکسیداتیو محافظت کند (Kaur et al., 2017; Kohli et al., 2018). این یافته‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز برگ‌های پیش تیمار شده با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی افزایش معنی دار داشت. در این گیاهان تحت تاثیر تیمار نانوذرات اکسیدروی، پیش تیمار سالیسیلیک اسید فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز را در مقایسه با تیمار

کلروفیل‌ها تأثیر می‌گذارد (Sidhu et al., 2017). مقدار کاروتنوئید در برگ‌های گیاهان تیمار شده با نانوذرات اکسیدروی با کاربرد ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم افزایش معنی داری نشان داد. از این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که جذب بالای یون-های روی موجب کاهش مقدار کلروفیل a، کاروتنوئید و در نهایت سمیت در گل راعی می‌شود (Wang et al., 2018). کاروتنوئیدها اولین خط دفاعی در برابر تجمع پراکسید هیدروژن تحت تاثیر تنش فلزات سنگین هستند، پراکسید هیدروژن بخشی جدایی ناپذیر از گونه‌های فعال اکسیژن است که خود باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (Yang et al., 2020). در این ارتباط، می‌توان گفت پیش تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسدیم در گل راعی عملکرد رشد و کارایی فتوسنتزی را بهبود می‌بخشد و در عین حال تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.

تاثیر نانوذرات اکسیدروی و یون‌های روی بر مقدار قندهای محلول، نشاسته و پرولین: در این مطالعه، مقدار قندهای محلول و نشاسته برگ‌ها تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی افزایش معنی داری نشان داد. برخی از مطالعات پیشین نشان می‌دهد که قندهای محلول در گیاهان در شرایط تنش افزایش می‌یابد و به عنوان اسموپرکتانت در حفظ تعادل سلولی گیاهان عمل می‌کنند (Cheng et al., 2009; Ende and Peshev, 2013). در این پژوهش، مقدار پرولین برگ‌ها تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی افزایش معنی دار نشان داد. در مطالعات مشابه با این نتایج نشان داده شد که مقدار پرولین در *Olea europaea* و *Phoenix dactylifera* تحت تاثیر تنش فلزات سنگین افزایش یافت (Zouari et al., 2016). مقدار پرولین تحت تاثیر

مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن برگها تحت تاثیر اعمال نانو ذرات اکسید روی و سولفات روی افزایش معنی دار نشان داد. در گیاه گشنیز، افزایش مقدار مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن در غلظت های مختلف روی، نشان دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و گونه های فعال اکسیژن است که منجر به تنش اکسیداتیو می شود (García-Gómez et al., 2017; Pullagurala et al., 2018). غلظت بالای روی در بافت های گیاه گل راعی می تواند بر تولید رادیکال های آزاد و مقدار مالون دی آلدئید تاثیر بگذارد (Ruiz-Torres et al., 2021). با این حال، مقدار مالون دی آلدئید برگ های پیش تیمار شده با نیتروپرو ساید سدیم تحت تنش روی کاهش نشان داد و ساختارهای غشایی را ترمیم و به القای بهتر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در پاسخ به تنش نانو ذرات اکسید روی و سولفات روی کمک کرد. کاربرد نیتروپرو ساید سدیم با کاهش مقدار مالون دی آلدئید ناشی از گونه های فعال اکسیژن و تنش آرسنیک، سمیت آرسنیک را در برنج بهبود بخشید (Ismail, 2012). مقدار نیتریک اکسید برگها تحت تاثیر سولفات روی در گیاهان پیش تیمار شده با نیتروپرو ساید سدیم افزایش معنی دار نشان داد. یافته های مشابه با این نتایج توسط Kolbert و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که افزایش نیتریک اکسید درونی در پاسخ به فلزات سنگین اتفاق می افتد، اگرچه با شرایط، ویژگی و نوع فلز متفاوت است، در آرابیدوپسیس، تنش سرب منجر به تولید بیش از حد نیتریک اکسید می شود که بر واکنش های کاتالیزوری مختلف در پراکسی زومها و رشد ریشه های اولیه و جانبی تاثیر می گذارد. می توان گفت نیتریک اکسید به عنوان یک مولکول سیگنالی، نقش حیاتی در کاهش

نانوذرات به تنهایی افزایش داد (Ruiz-Torres et al., 2021). افزایش مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها (روتین و اسید کلروژنیک) در گل راعی تحت تاثیر پیش تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید و نیتروپرو ساید سدیم در تنش نانو ذرات اکسید روی ممکن است ناشی از افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز باشد که به عنوان آنزیم آغاز کننده مسیر بیوسنتزی فنل های آزاد شناخته می شود (Tajik et al., 2019).

در این پژوهش، پیش تیمار بذرها با نیتروپرو ساید سدیم و ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپرو ساید سدیم باعث افزایش معنی دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگها شد. Chen و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که نیتروپرو ساید سدیم با کاهش تنش اکسیداتیو و تقویت سیستم دفاعی آنزیمی - آنتی اکسیدانی، سمیت سلولی را در نشاء برنج بهبود بخشید. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر نانو ذرات اکسید روی و سولفات روی افزایش معنی داری نشان داد. Hasan و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که افزودن روی باعث افزایش سطح پروتئین و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز می شود. در این مطالعه تجمع ترکیبات فنلی موجب فعال شدن آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز در گل راعی شد. نانو ذرات اکسید روی موجب فعال شدن آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز در گوجه فرنگی شد (Wang et al., 2018). Rizwan و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز گندم تیمار شده با نانو ذرات اکسید روی نسبت به شاهد افزایش یافت.

مالون دی آلدئید محصول جانبی آسیب اکسیداتیو غشاهای لیپیدی است. در این مطالعه مقدار

سمیت نانوذرات و فلزات سنگین در هر دو سطح درونی و کاربرد خارجی دارد. در گیاهانی که در معرض نانوذرات اکسیدروی یا سولفات روی قرار گرفتند، سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسیدیم باعث افزایش مقدار پرولین به موازات آن کاهش مقدار مالون دی آلدید در گیاه گل راعی شد.

نتیجه گیری نهایی

در این پژوهش، تاثیر پیش تیمار سالیسیلیک اسید، نیتروپروسایدسیدیم و ترکیب سالیسیلیک اسید با نیتروپروسایدسیدیم (غلظت ۰/۱ میلی مولار) در شرایط تنش نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی (غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) بر پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گل راعی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج زیر به دست آمد: نانوذرات اکسیدروی و سولفات روی به دلیل افزایش مقدار روی، پراکسیداسیون

لیپیدی، پراکسیدهای پروژن و تنش اکسیداتیو موجب کاهش رشد گیاه شد. بیشترین اثر پیش تیمار بذرها مربوط به سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسیدیم می باشد که با موفقیت مقدار شاخص تنش اکسیداتیو (مالون دی آلدید) را کاهش داد و در نتیجه تأثیر نامطلوب روی، بر دانه رست های گل راعی را بهبود بخشید. پیش تیمار بذرها با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسیدیم موجب افزایش معنی دار مقدار روتین و کلروژنیک اسید تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی شد. پیش تیمار بذرها با ترکیب سالیسیلیک اسید و نیتروپروسایدسیدیم تحت تاثیر تنش روی موجب تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، افزایش پرولین، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز شد. نیتروپروسایدسیدیم و سالیسیلیک اسید ممکن است عملکرد مهمی در افزایش یکپارچگی غشاها با کنترل عملکرد سیستم آنتی اکسیدانی داشته باشد.

References

- 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. *Environmental and Experimental Botany*. 175: 104040.
- Bandyopadhyay, S., Plascencia-Villa, G., Mukherjee, A., Rico, C.M., Jose-Yacaman, M., Peralta-Videa, J.R. and Gardea-Torresdey, J.L. (2015). Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Science Total Environent*. 515-516:60-69.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., and 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., and S. 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. and Doran, P.M. (2002). Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertoloni*. *New Phytologist*. 156(2): 202-205.
- Chen, J., Dou, R., Yang, Z., You, T., Gao, X., and Wang, L. (2018). Phytotoxicity and bioaccumulation of zinc oxide nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 130: 604-612.
- Cheng, Y. J., Yang, S. H., and Hsu, C. S. (2009). Synthesis of conjugated polymers for organic solar cell applications. *Chemical reviews*. 109(11):5868-5923.
- Chikkanna, M.M., Neelagund, S.E. and Rajashekarappa, K. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) and their biological activity. *Springer Nature Applied Sciences*. 1: 1-10.
- Ende, W. V. D., and Peshev, D. (2013). Sugars as antioxidants in plants. In *Crop improvement under adverse conditions*, pp. 285-307. Springer, New York, NY.

- Faizan, M., Faraz, A., Yusuf, M., Khan, S.T. and Hayat, S. (2017). Zinc oxide nanoparticle-mediated changes in photosynthetic efficiency and antioxidant system of tomato plants. *Photosynthetica*. 56: 678–686.
- Filippou, P., Antoniou, C., and Fotopoulos, V. (2013). The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine*. 56: 172-183.
- García-Gómez, C., Obrador, A., González, D., Babín, M., and Fernández, M. D. (2017). Comparative effect of ZnO NPs, ZnO bulk and ZnSO₄ in the antioxidant defences of two plant species growing in two agricultural soils under greenhouse conditions. *Science of the Total Environment*. 589: 11-24.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. 59(2): 309-314.
- Gaschler, M.M. and Stockwell, B.R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical Biophysical Research*. 482: 419–425.
- Gomes, M. P., Duarte, D. M., Carneiro, M. M. L. C., Barreto, L. C., Carvalho, M., Soares, A. M. ... and Garcia, Q. S. (2013). Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 67:1-6.
- Ghosh, M., Jana, A., Sinha, S., Jothiramajayam, M., Nag, A., Chakraborty, A., Mukherjee, A. and Mukherjee, A. (2016). Effects of ZnO nanoparticles in plants: cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 807:25–32.
- Habibi, G. (2019). Role of exogenous hydrogen peroxide and nitric oxide on improvement of abiotic stress tolerance in plants. In: Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Islam MT (eds) *Plant tolerance to environmental stress: role of phytoprotectants*, 1rd edn. CRC Press. pp. 159-174.
- Habibi, G. and Hajiboland, R. (2012). Comparison of photosynthesis and antioxidative protection in *Sedum album* and *Sedum stoloniferum* (Crassulaceae) under water stress. *Photosynthetica* 50(4): 508-518.
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X. Y., Ahammed, G. J., and Qi, Z. Y. (2017). Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in Plant Science*, 8:1492.
- Ismail, G. S. M. (2012). Protective role of nitric oxide against arsenic-induced damages in germinating mung bean seeds. *Acta Physiologiae Plantarum*. 34(4): 1303-1311.
- Kalal, P.R. and Jajoo, A. (2021). Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiology Biochemistry*. 160: 341–351.
- Kaur, R., Yadav, P., Sharma, A., Thukral, A.K., Kumar, V., Kohli, S.K. and 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.
- Kohli, S. K., Handa, N., Bali, S., Arora, S., Sharma, A., Kaur, R., and 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 147:382-393.
- Kolbert, Z., Barroso, J.B., Brouquisse, R., Corpas, F.J., Gupta, K.J., Lindermayr, C., Loake, G.J., Palma, J.M., Petrivalsky, M., Wendehenne, D. and Hancock J.T. (2019). A forty-year journey: the generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide*. 93:53–70.
- Li, S.; Liu, J.; Wang, Y.; Gao, Y.; Zhang, Z.; Xu, J. and Xing, G. (2020). Comparative physiological and metabolomic analyses revealed that foliar spraying with zinc oxide and silica nanoparticles modulates metabolite profiles in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Food and Energy Security*. 10: 269.
- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 11: 591-592.
- Magne, C., Saladin, G. and Clement, C. (2006). Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera*. *Chemosphere*. 62(4):650-657.
- Molnár, Á., Papp, M., Kovács, D.Z., Béltéky, P., Oláh, D., Feigl, G., Szöllősi, R., Rázga, Z., Ördög, A., Erdei, L., Rónavári, A., Kónya, Z. and Kolbert, Z. (2020). Nitro-oxidative signaling induced by chemically synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) in *Brassica* species. *Chemosphere*. 251:126419.

- Prakash, V., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Sharma, S. and Corpas, F.J. (2021). Nitric oxide (NO) and salicylic acid (SA): A framework for their relationship in plant development under abiotic stress. *Plant Biology* 23:39-49.
- Pullagurala, V. L. R., Adisa, I.O., Rawat, S., Kim, B., Barrios, A.C., Medina- Velo, I.A., Hernandez Viezcas, J.A., Peralta-Videa, J.R. and Gardea-Torresdey, J. (2018). Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants - A review. *Environmental Pollution*. 241: 1175-1181.
- Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A. and Waris, A. A. (2019). Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere*. 214:269-277.
- Ruiz-Torres, N., Flores-Naveda, A., Barriga-Castro E.D., Camposeco-Montejo, N., Sonia Ramírez-Barrón, S., Borrego-Escalante, F., Niño-Medina, G., Hernández-Juárez, A., Garza-Alonso, C., Rodríguez-Salinas, P. and 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*. 26:1998.
- Quentin, A.G., Pinkard, E.A., Ryan, M.G., Tissue, D.T., Baggett, L.S., Adams, H.D., Maillard, P., Marchand, J., Landhäusser, S.M., Lacomte, A. and Gibon, Y. (2015). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology*. 35(11):1146-65.
- Samart, S., Chutipajit, S., and Phakamas, N. (2017). Evaluating the effect of zinc oxide nanoparticles on the physiological responses of nine non-photoperiod sensitive rice cultivars. *Materials Today: Proceedings*. 4(5): 6430-6435.
- Sidhu, G. P. S., Singh, H. P., Batish, D. R., and Kohli, R. K. (2017). Tolerance and hyperaccumulation of cadmium by a wild, unpalatable herb *Coronopus didymus* (L.) Sm. (*Brassicaceae*). *Ecotoxicology and environmental safety*. 135:209-215.
- Sinrod, A.J.G., Avena-Bustillos, R.J., Olson, D.A., Crawford, L.M., Wang, S.C. and McHugh, T.H. (2019). Phenolics and Antioxidant Capacity of Pitted Olive Pomace Affected by Three Drying Technologies. *Journal Food Science* 84: 412-420.
- Sharma, A., Sidhu, G.P.S., Araniti, F., Bali, A.S., Shahzad, B., Tripathi, D.K., Brestic, M., Skalicky, M. and Landi, M. (2020). The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals. *Molecules*. 25(3): 540.
- Tajik, S., Zarinkamar, F., Soltani, B. M., & Nazari, M. (2019). Induction of phenolic and flavonoid compounds in leaves of saffron (*Crocus sativus* L.) by salicylic acid. *Scientia Horticulturae*. 257:108751.
- Tripathi, D.K., Mishra, R.K., Singh, S., Singh, S., Vishwakarma, K., Sharma, S., Singh, V.P., Singh, P.K., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Pandey, A.C., Shivendra, S., and Chauhan, D.K. (2017). Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles phytotoxicity in wheat seedlings: implication of the ascorbate-glutathione cycle, *Frontiers Plant Science*. 8:1.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and 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.
- Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W. and Hou, C. (2016). Zinc oxide nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Frontiers Plant Science*. 6:1243.
- Wang, X.P., Li, Q.Q., Pei, Z.M. and Wang, S.C. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia plantarum*. 62(4):801-808.
- Wu, Q., Su, N., Zhang, X., Liu, Y., Cui, J. and Liang, Y. (2016). Hydrogen peroxide, nitric oxide and UV Resistance Locus and interact to mediate UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in *radish sprouts*. *Scientific Reports* 6(1):29164.
- Wang, X.P., Li, Q.Q., Pei, Z.M. and Wang, S.C. (2018). Effects of zinc oxide nanoparticles on the growth, photosynthetic traits and antioxidative enzymes in tomato plants. *Biologia plantarum*. 62(4):801-808.
- Yang, Y., Zhang, L., Huang, X., Zhou, Y., Quan, Q., Li, Y., and Zhu, X. (2020). Response of photosynthesis to different concentrations of heavy metals in *Davidia involucreta*. *PLOS One*. 15(3): e0228563.

- Zouari, M., Ahmed, C. B., Elloumi, N., Bellassoued, K., Delmail, D., Labrousse, P., Abdallah, F.B. and Rouina, B. B. (2016). Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. Chemlali exposed to cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 128: 195-205.
- Zoufan, P., Baroonian, M .and Zargar, B. (2020). ZnO nanoparticles-induced oxidative stress in *Chenopodium murale* L, Zn uptake, and accumulation under hydroponic culture. *Environmental Science and Pollution Research* .27(10): 11066–11078.
- 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.