

تأثیر پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون بر صفات مورفوفیزیولوژیکی، میزان کوئرستین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) در شرایط تنش خشکی

سعیده رحیمی، مهرناز حاتمی*، منصور قربانپور

گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
*آدرس مکاتبه: اراک، دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهان دارویی
پست الکترونیک: m-hatami@araku.ac.ir

doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.186

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۱۶

چکیده

مقدمه: سیلیکون دومین عنصر ساختاری در زمین است که در گیاهان علاوه بر القا فرآیندهای فیزیولوژیکی باعث مقاومت به تنش های زیستی و غیرزیستی می‌شود.

هدف: بررسی پیش تیمار بذر با نانو ذرات سیلیکون بر تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، فنل و فلاونوئید، میزان کوئرستین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی همیشه بهار تحت سطوح مختلف تنش خشکی.

روش بررسی: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت سطوح مختلف تنش خشکی (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) اجرا و از نانو ذرات سیلیکون (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان ماده پیش تیمارکننده بذر استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که سطوح تنش خشکی و پیش تیمار با نانو سیلیکون در غلظت‌های مختلف باعث تغییرات معنی‌دار ($P < 0/05$) بر صفات مورد ارزیابی شد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در گیاهان تحت پیش تیمار نانو سیلیکون در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و تنش ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. اعمال تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و پیش تیمار نانو سیلیکون در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین اثر را بر میزان کوئرستین داشت. همچنین، بیشترین و کمترین میزان فلاونوئید کل به ترتیب در پیش تیمار بذر با نانو ذرات سیلیکون در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شاهد (بدون پیش تیمار) در تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: استفاده از نانو سیلیکون به صورت پیش تیمار در غلظت‌های کم (۲۰۰ - ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و تنش خشکی متوسط (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) شاخص‌های فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه همیشه بهار را بهبود بخشید.

کل‌واژگان: همیشه بهار، پیش تیمار، تنش کم آبی، رشد، کوئرستین، نانو سیلیکون



مقدمه

گیاه دارویی همیشه بهار با نام علمی (*Calendula officinalis* L.) از خانواده کاسنی، یکی از معروفترین و پرکاربردترین گیاهان دارویی است. این گیاه به طور وسیعی به منظور استفاده از عصاره آن در طب سنتی و گیاه درمانی پرورش می‌یابد [۱]. عمده‌ترین مواد مؤثره همیشه بهار شامل تریپنویئیدها، فلاونوئیدها، کومارین، کوئینون، اسانس، کارتنوئید و اسیدهای آمینه می‌باشند [۲]. از میان ترکیبات مؤثره این گیاه، فلاونوئیدها (بویژه کوئرستین) مهم‌ترین ماده مؤثره آن می‌باشند که در گل‌ها تولید و تجمع می‌یابند. عصاره همیشه بهار دارای اثرات دارویی از قبیل خواب آور، التیام زخم، ضدالتهاب پوستی، ضدقارچ و باکتری، ضدانگل، رقیق و تصفیه‌کننده خون است [۳]. یکی از مشکلات عمده تولید این گیاه جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌های آن می‌باشد. این مسأله بویژه در تولید گیاهان دارویی از اهمیت بیشتری برخوردار است، زیرا بذرهاى بیشتر گیاهان دارویی با درجات متفاوتی دارای خواب هستند و همچنین به دلیل مطالعات اهلی سازی کمتری که روی آنها انجام شده است، سبز شدن و استقرار گیاهچه در این گیاهان به کندی انجام می‌شود [۴]. بذرهاى همیشه بهار اغلب جوانه‌زنی یکنواختی ندارند. در این رابطه استفاده از پیش تیمار (پرایمینگ) بذر یک روش مؤثر برای بهبود جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه است [۵]. پیش تیمار بذر باعث افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی، گسترش دامنه دمایی جوانه‌زنی و همچنین افزایش یکنواختی استقرار بوته‌ها می‌شود [۶]. استفاده از روش پرایمینگ یکی از راهکارهای بهبود کارایی و افزایش کیفیت بذر در شرایط نامساعد محیطی می‌باشد، در واقع تیمار پرایمینگ باعث کوتاه شدن زمان کاشت تا سبز شدن و حفاظت بذرها از عوامل زیستی و غیرزیستی در مرحله بحرانی استقرار گیاهچه می‌شود. همچنین، پرایمینگ باعث یکنواختی سبز شدن و استقرار یکنواخت و بهبود عملکرد کمی و کیفی محصول می‌شود [۷].

علی‌رغم مطالعات گسترده‌ای که در مورد تأثیر تنش‌های محیطی بر رشد و عملکرد گیاهان زراعی انجام شده، اطلاعات در مورد واکنش گیاهان دارویی به این تنش‌ها بسیار اندک

تأثیر پیش تیمار بذر ...

است. خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محدودکننده تولید در گیاهان در سرتاسر جهان است [۸]. سیدیک و همکاران [۹]، گزارش کردند که خشکی به عنوان مهم‌ترین فاکتور کنترل کننده عملکرد محصولات، تقریباً روی کلیه فرآیندهای رشد گیاه تأثیرگذار است. از جمله اینکه تنش خشکی باعث کاهش میزان کلروفیل در مرحله رویشی و زایشی می‌شود. تنش خشکی از طریق تأثیر بر برخی از فرآیندهای متابولیسمی باعث تغییر در رفتار و در نهایت مقاوم سازی گیاه در مقابل برخی تنش‌ها می‌شود [۱۰]. کاهش فشار تورژسانس می‌تواند اولین اثر ناشی از تنش خشکی باشد که سرعت رشد سلول و اندازه نهایی آن را متأثر ساخته و احتمالاً حساس‌ترین فرآیند سلولی به تنش است [۱۱]. سازش گیاهان به تنش خشکی نتیجه تغییر بسیاری از مکانیزم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است که منجر به تغییراتی در سرعت رشد گیاه، هدایت روزنه‌ای، سرعت فرآیند فتوسنتز، فعالیت‌های آنزیمی و غیره می‌شود.

سیلیس پس از اکسیژن، دومین عنصر ساختاری در زمین است که در گیاهان غیر متحرک است. اگر چه سیلیس برای گیاهان جز عناصر ضروری نیست، اما گیاهان عالی برای رشد مطلوب به آن نیاز دارند. بیشترین تأثیر سیلیس بر روی گیاهان، مربوط به مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. به این صورت که دیواره سلولی گیاهان مانع از ورود عناصر به درون سلول‌ها می‌شود. فناوری نانو در محصولات کشاورزی در راستای ارتقاء متابولیسم زیستی در بسیاری از جنبه‌ها مانند تیمار بذر یا آبیاری با آب تحت تیمار نانو مواد، مورد استفاده قرار گرفته است و می‌تواند رشد محصول، عملکرد و کیفیت بسیاری از محصولات را افزایش دهد [۱۲]. قربانپور و همکاران [۱۳] گزارش کردند که نانوذرات بواسطه خصوصیات منحصر به فردی که دارند، می‌توانند سریع‌تر و راحت‌تر از فرم بالک آنها به غشای سلولی نفوذ کنند. از این رو کاربرد آنها در کشاورزی به عنوان کود دارای پتانسیل بالایی است. بانو و همکاران [۱۴] و سیدیک و همکاران [۱۵] نیز گزارش نمودند که نانو ذرات سیلیکون به طور قابل توجهی باعث افزایش جوانه‌زنی بذر و رشد دانهال گوجه‌فرنگی می‌شود. همچنین،



شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد) خریداری شد. به منظور ارزیابی اثرات پیش تیمار با نانو سیلیکون بر صفات فیزیولوژیکی و ترکیبات ثانویه گیاه دارویی همیشه‌بهار تحقیق حاضر در آزمایشگاه و گلخانه گروه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه اراک در سال ۱۳۹۶ صورت گرفت. بذره‌های همیشه بهار پس از ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، سه بار با آب مقطر شستشو شدند. قبل از انجام آزمایش تمامی ظروف (پتری‌دیش) و وسایل موردنیاز در اتوکلاو (۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت) استریل شدند. سپس، به منظور اعمال پیش تیمار، بذره‌های گیاه درون محلول با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) (۲۰-۳۰ نانومتر) به مدت ۲۴ ساعت پیش تیمار شدند. پس از آن بذره‌های پیش تیمار شده تا قبل از انتقال به گلدان به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد) تا رسیدن به محتوای آب اولیه خشک شدند.

تیمار تنش خشکی

گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۳۵ و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر انتخاب شدند. سپس کف هر گلدان به منظور زهکشی بهتر به طور یکنواخت سنگریزه قرار داده شد. بذره‌های خشک شده در گلدان‌های حاوی ۸ کیلوگرم خاک (خاک مزرعه، شن، کود دامی کاملاً پوسیده به نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند (۸ بذر) و آبیاری در سطح ظرفیت زراعی (درصد FC) انجام شد. گلدان‌ها به مدت ۱۰ روز تا سبز شدن (مرحله ۲ برگ) با آب معمولی آبیاری و سپس گیاهچه‌ها تنک شدند و در هر گلدان سه گیاهچه قوی سالم و یکنواخت باقی ماند و به آنها اجازه داده شد تا به اندازه کافی رشد کنند. با مشاهده اولین نشانه‌های ظهور ساقه گلدهنده، تیمار خشکی اعمال شد. میزان رطوبت تمام گلدان‌ها پس از کشت و قبل از اعمال تنش خشکی در حد ظرفیت زراعی حفظ شد. برای اطمینان بیشتر، قبل از اعمال تیمار خشکی دوباره گلدان‌ها وزن شدند. تنش خشکی به مدت چهار هفته به صورت وزنی و در چهار سطح ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی اعمال شد. به طور خلاصه، ابتدا در آزمایشگاه میزان رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای با استفاده از دستگاه

نشان داده شد که محلول پاشی با نانوذرات سیلیکون باعث بهبود محتوای پروتئین محلول، اسیدهای آمینه آزاد، نیتروژن کل، فسفر و پتاسیم و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز می‌شود [۱۵]. یئینگ و همکاران [۱۴] گزارش دادند که کاربرد نانو سیلیکون باعث افزایش ظرفیت فتوسنتزی گیاهان بواسطه تقویت تبادل گازها و پارامترهای فلورسانس کلروفیل می‌شود. همچنین، نشان داده شد که سیلیکون و نانو سیلیکون باعث افزایش ارتفاع بوته، تعداد برگ و سطح برگ در گیاهان تیمار شده باقلا در مقایسه با گیاهان شاهد بدون تیمار با سیلیکون شد [۱۵]. در مطالعه‌ای دیگر تأثیر نانو سیلیکون بر روی گیاه موز باعث افزایش پارامترهای رشد مانند طول و تعداد ریشه، تعداد برگ، ارتفاع گیاهچه، وزن تر و خشک ریشه و گیاه شد. در واقع افزایش تدریجی رشد با توجه به کاربرد نانوسیلیکون، مربوط به افزایش سطح برگ است که فعالیت‌های فتوسنتزی را افزایش می‌دهد [۱۸]. امام و همکاران [۱۹] نیز گزارش دادند که کاربرد سیلیکون سطح آمیلوز، ترکیبات فنلی و محتوای فلاونوئید را در دانه‌های برنج تحت تنش خشکی افزایش می‌دهد. لذا، سیلیکون به عنوان یک عنصر غذایی می‌تواند برای بهبود محصولات معرفی شود.

در گزارش‌های مختلف بیان شده که نانو مواد می‌تواند منجر به جذب و انتقال بیشتر آب و مواد در گیاه شوند [۲۱، ۲۰]. همچنین، نانو مواد می‌توانند به عنوان ترکیبات پیام‌رسان برای واکنش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی عمل کنند اما اساس مکانیسم آنها به طور کامل مشخص نشده است [۲۲]. لذا، این پژوهش با هدف بررسی پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون بر تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و محتوای فلاونوئید، میزان فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی همیشه‌بهار تحت تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی بذر و اعمال پیش تیمار

حلال‌ها و مواد شیمیایی استفاده شده در این آزمایش از شرکت مرک و سیگما تهیه شد. همچنین، نانو سیلیکون از



پلاستیکی سفید رنگ پوشیده شد. بعد از اتمام دوره تنش خشکی نمونه برداری از گل‌ها برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر صورت گرفت.

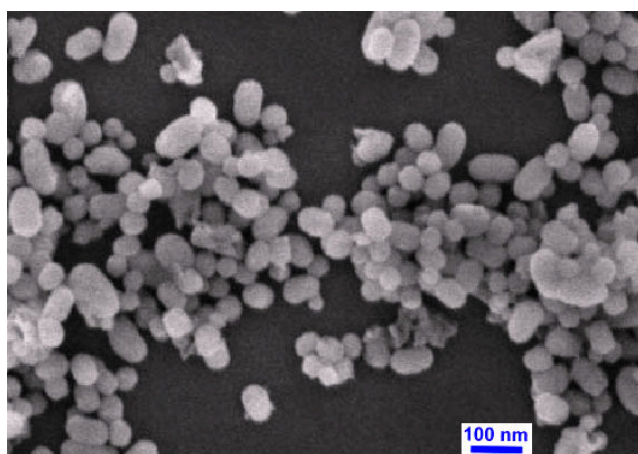
مشخصات نانو سیلیکون

مشخصات نانو سیلیکون مورد استفاده در این آزمایش در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همچنین، شکل شماره ۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) از نانو سیلیکون مورد استفاده را نشان می‌دهد.

صفحه فشاری تعیین شد. برای اعمال تیمارهای تنش خشکی، ابتدا وزن گلدان‌ها در حد رطوبت ظرفیت مزرعه و همچنین سطوح مختلف مصرف آب قابل استفاده خاک محاسبه و بعد تمام گلدان‌ها با آب مقطر آبیاری شدند تا به حد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای رسیدند. پس از این مرحله و با توزین روزانه گلدان‌ها، مقدار آب مصرفی آنها محاسبه و پس از رسیدن رطوبت به حد مجاز تعیین شد. در هر تیمار، آبیاری گلدان برای رسیدن به حد ظرفیت مزرعه انجام شد. برای جلوگیری از تبخیر، سطح گلدان‌ها توسط یونولیت

جدول شماره ۱- مشخصات نانو سیلیکون مورد استفاده در این آزمایش

ویژگی	نانو سیلیکون
خلوص	۹۹ درصد
اندازه (نانومتر)	۲۰ - ۳۰
سطح ویژه (مترمربع در گرم)	۱۸۰ - ۶۰۰
رنگ	سفید
چگالی انباشتگی (گرم در سانتی‌متر مکعب)	< ۰/۱۰
چگالی واقعی (گرم در سانتی‌متر مکعب)	۲/۴
ترکیبات (واحد)	
نانو دی‌اکسید سیلیکون (درصد)	> ۹۹
تیتانیوم (میلی‌گرم در لیتر)	< ۱۲۰
کلسیم (میلی‌گرم در لیتر)	< ۷۰
سدیم (میلی‌گرم در لیتر)	< ۵۰
آهن (میلی‌گرم در لیتر)	< ۲۰



شکل شماره ۱ - تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانو سیلیکون (Nano SiO₂) مورد استفاده در این آزمایش

اندازه‌گیری صفات مرفولوژیکی

الکترولیت‌ها در اثرمرگ سلول‌ها، لوله‌های آزمایش در دستگاه بنماری در دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سرد شدن لوله‌ها، مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC2). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۲۴].

$$\text{درصد نشت الکترولیت} = \frac{EC1}{EC2} \times 100$$

اندازه‌گیری رنگی‌های گیاهی (کلروفیل کل و کارتنوئید)

برای اندازه‌گیری محتوای کلروفیل کل از روش پورا و برای سنجش محتوای کارتنوئید از روش لیختن تالر و ولبورن [۲۷ - ۲۵] استفاده شد. به این منظور ۰/۵ گرم از برگ انتخابی در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد هموزن شد و پس از انجام سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی را برداشته و حجم آن با استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج‌های مربوطه قرائت و با استفاده از روابط زیر رنگدانه‌های فتوسنتزی محاسبه شد.

$$a \text{ کلروفیل} = \frac{V}{1000} \times (A_{663/6} - 2/55 A_{646/6}) = 12/25$$

$$b \text{ کلروفیل} = \frac{V}{1000} \times (A_{663/6} - 4/91 A_{646/6}) = 20/31$$

$$(a + b) \text{ کلروفیل کل} = \frac{V}{1000} \times (A_{663/6} + 7/34 A_{646/6}) = 17/76$$

$$-104 \text{ (کلروفیل } a) = \frac{V}{1000} \times (A_{670} - 3/27 a) \text{ کارتنوئید}$$

$$\times V/198 \times 1000 \text{ (کلروفیل } b)$$

در روابط فوق A طول موج جذب اسپکتروفتومتر است.

تهیه عصاره الکلی

برای تهیه عصاره، ۰/۵ گرم پودر گیاه خشک شده را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به عنوان حلال اضافه نموده و مخلوط حاصل برای ۲۴ ساعت توسط شیکر هم‌زده شد و بعد از صاف کردن توسط کاغذ صافی، عصاره حاصل در شیشه‌های غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

صفاتی نظیر ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، عملکرد گل، قطر بزرگترین گل، وزن تر ریشه و بوته اندازه‌گیری شد. برای تهیه ماده خشک جهت عصاره‌گیری و اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه، گل‌های برداشت شده در مرحله گل دهی کامل بعد از اندازه‌گیری وزن تر به سرعت توسط آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. بوته‌های گیاه نیز بلافاصله بعد از برداشت وزن تر آنها با ترازوی دقیق دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC)

به منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، در ساعت ۱۰ صبح از جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه یافته و سالم گیاهان نمونه‌برداری شد. بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، وزن تر برگ‌ها با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌ها در آب مقطر به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق و نور کم برای محاسبه وزن اشباع، غوطه‌ور شدند و پس از این مدت نمونه‌ها به سرعت و با دقت با دستمال کاغذی خشک و وزن اشباع آنها اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌های فوق‌الذکر در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و دوباره وزن شدند، بدین ترتیب محتوای نسبی آب برگ‌ها و از طریق رابطه ذیل محاسبه شد [۲۳].

$$RWC \% = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

که در آن FW وزن تر، DW وزن خشک و TW وزن آماس برگ می‌باشد.

اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها

از برگ گیاهان تحت تیمارهای مختلف سیلیکون و نانو سیلیکون به طور جداگانه دیسک‌های دایره‌ای به میزان یکسان تهیه شد. سپس نمونه‌ها در آب مقطر و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از EC متر مدل (Lutron) اندازه‌گیری شد (EC1). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت



اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی

میزان تام ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری و نتایج بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بیان شد. به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین ۵۰ درصد اضافه شد. جذب مخلوط نیم ساعت بعد در طول موج ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. از اسیدگالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار برده شد $(y = 0.0005x + 0.0096, R^2 = 0.9899)$. نتایج معادل میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد [۲۸].

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید تام به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از نگهداری در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد $(y = 0.0069x - 0.239, R^2 = 0.9826)$ و نتایج معادل میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم عصاره بیان شد [۲۹]. به این ترتیب که جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها در معادله به جای y فرض شد و مقدار x به دست آمده به عنوان غلظت در نظر گرفته شد.

به کارگیری کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC)

در این تحقیق روش مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقدار کوئرستین روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا بود. دستگاه HPLC به کار گرفته شده مدل Waters 2695 ساخت آمریکا، مجهز به دتکتور Uv 2487 Dual λ Absorbance و ستون c18، با ابعاد ۴/۶ در ۱۵۰ میلی‌متر و ۳/۵ میکرومتر و نرم‌افزار 32 Millennium بود.

اندازه‌گیری میزان کوئرستین

حلال‌های شیمیایی مورد نیاز شامل متانول با درجه خلوص HPLC از شرکت مرک آلمان تهیه شد. استاندارد کوئرستین از شرکت سگیما آلدریچ تهیه شد. برای تهیه محلول استاندارد با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار ۰/۲ میلی‌گرم از استاندارد استفاده شد و در یک میلی‌لیتر متانول با خلوص HPLC حل شدند که محلول ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کوئرستین به دست آمد. از این محلول پایه، غلظت‌های مناسب جهت رسم منحنی‌های کالیبراسیون مربوط به استاندارد تهیه شد و هر کدام طبق روش بهینه شده به ستون C₁₈ تزریق شد. مساحت پیک غلظت‌های هر استاندارد حساب شد و منحنی استاندارد با نرم‌افزار اکسل رسم شد. سپس معادله خط $y=ax+b$ به دست آمد. مساحت پیک خوانده شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شد و x (غلظت) به دست آمد (شکل شماره ۲ الف و ب).

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد به روش ۲ و ۲-

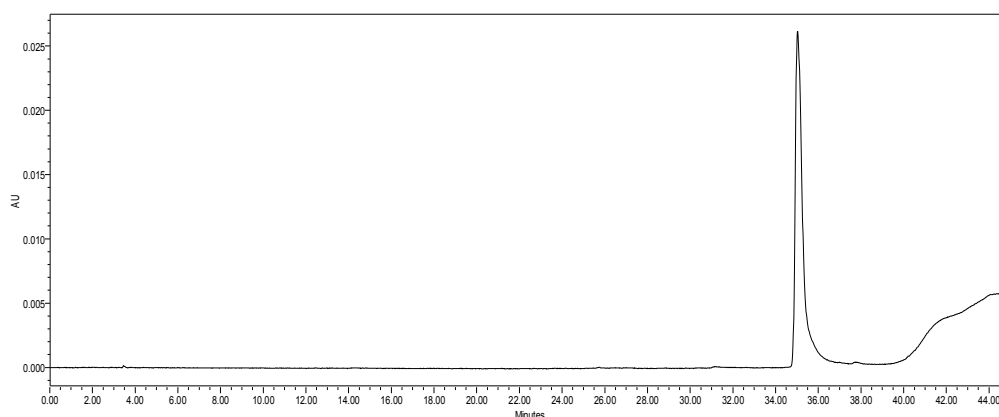
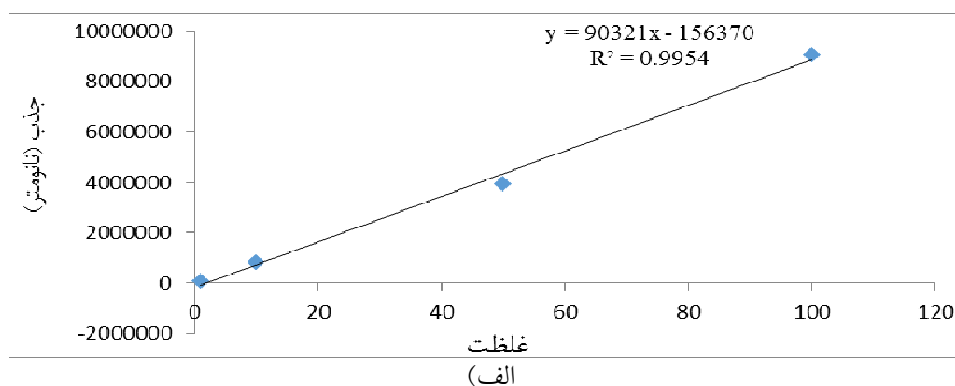
دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)

فعالیت مهار رادیکال‌های ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط ترکیبات استخراج شده از برگ‌های گیاه دارویی همیشه‌بهار طبق روش شایوو و هووانگ اندازه‌گیری شد [۳۰]. به منظور انجام آزمایش ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) به ۲ میلی‌لیتر از عصاره (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) افزوده و مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت $(y = 0.1x + 48.883, R^2 = 0.9727)$. نتایج معادل میلی‌گرم اسید آسکوربیک بر گرم عصاره بیان شد و در نهایت درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط عصاره با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (درصد)} = \left(\frac{AC - AS}{AS} \right) \times 100$$

که در این رابطه AS و AC به ترتیب میزان جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.





(ب)

شکل شماره ۲ - الف) منحنی استاندارد کوئرستین، ب) مساحت زیر استاندارد کوئرستین

درصد معنی دار بود، اما اثر متقابل تنش خشکی و پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون بر صفات مورفولوژیک (به جز وزن تر بوته) معنی دار نشد. نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک (جدول شماره ۳) نشان داد که بیشترین ارتفاع بوته (۶۷/۷ سانتی متر) در پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد. به طور کلی غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانو سیلیکون بیشترین و غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر کمترین اثرگذاری را بر میزان ارتفاع گیاه داشتند. در حالی که، حداکثر تعداد ساقه فرعی (۷/۳۱) و وزن تر ریشه (۱۶۸/۲۳ گرم) در پیش تیمار بذر با ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانوسیلیکون به دست آمد. پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین تأثیر را بر عملکرد گل همیشه بهار داشت که به ترتیب باعث افزایش ۳۷/۹ و ۳۹/۵ درصد نسبت به شاهد (بدون پیش تیمار) شد (جدول شماره ۳).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد. محاسبات آماری حاصل از آزمایش با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۲ انجام گرفت. برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. همچنین برای رسم نمودار از نرم افزار Excel سری ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج

صفات مورفولوژیکی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر پیش تیمار نانو سیلیکون بر تمامی صفات مورفولوژیکی (شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، عملکرد گل، قطر بزرگترین گل، وزن تر ریشه و وزن تر بوته) گیاه همیشه بهار در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول شماره ۲). همچنین، اثر تنش خشکی نیز بر تمامی صفات مورفولوژیک (به جز وزن تر ریشه) در سطح ۵

جدول شماره ۲ - نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاه همیشه بهار تحت تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون

میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع بوته	تعداد ساقه فرعی	عملکرد گل	قطر بزرگترین گل	وزن تر ریشه	وزن تر بوته
پیش تیمار نانو سیلیکون (N)	۳	۵۷۶/۴۸**	۹/۸۰**	۴۷۲/۳۱**	۶/۰۱**	۳۷۲۹۸/۵۷**	۱۱۶۱/۹۲**
تنش خشکی (D)	۳	۵۶۰۳/۲۱*	۷۲/۳۷*	۰/۸۷*	۶۲/۱۴*	۱۶/۲۵ ^{ns}	۲/۳۸**
(D) × (N)	۹	۱۶/۷۰ ^{ns}	۲/۶۳ ^{ns}	۴۰/۰۷ ^{ns}	۰/۱۰ ^{ns}	۲۹۹۷/۰۸ ^{ns}	۵۳/۸۵*
خطای آزمایش	۴۸	۳۳/۴۲	۲/۲۲	۸۰/۳۰	۰/۳۱	۱۷۸۵/۳۹	۲۱۷/۶۶
ضریب تغییرات (درصد) CV	-	۱۱/۷۲	۲۳/۹۲	۲۱/۱۷	۹/۲۲	۲۷/۰۲	۲۰/۵۵

**، * و ns به ترتیب بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال یک درصد ($P \leq 0.01$)، تفاوت معنی دار در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) و عدم تفاوت معنی دار می باشد.

جدول شماره ۳ - مقایسه میانگین اثرات ساده سطوح مختلف تنش خشکی و پیش تیمار بذر با غلظت های مختلف نانوسیلیکون بر صفات مورفولوژیکی گیاه همیشه بهار

تیمارها	ارتفاع بوته (سانتی متر)	تعداد ساقه فرعی (تعداد در گیاه)	عملکرد گل (گرم)	قطر بزرگترین گل (سانتی متر)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر بوته (گرم)
۱۰۰	۵۷/۱۴ ^a	۵/۷۳ ^b	۴۱/۶۵ ^a	۶/۲۹ ^a	۱۲۶/۳۱ ^a	۸۰/۲۲ ^a
تنش خشکی (۷۵)	۵۲/۴۲ ^b	۶/۱۸ ^a	۴۷/۵۰ ^a	۶/۲۷ ^a	۱۲۹/۸۷ ^a	۷۲/۵۰ ^b
(%FC) ۵۰	۴۷/۷۱ ^c	۴/۶ ^c	۴۴/۷۱ ^a	۵/۶۶ ^b	۱۲۲/۷۰ ^a	۶۲/۲۳ ^c
۲۵	۳۹/۲۵ ^d	۳/۵۱ ^d	۳۱/۶۰ ^a	۴/۰۴ ^c	۱۱۷/۶۲ ^a	۵۷/۳۵ ^d
نانوسیلیکون ۱۰۰	۴۶/۳۳ ^c	۵/۶۸ ^c	۲۸/۸۷ ^c	۵/۳۴ ^b	۱۰۴/۱۴ ^d	۶۴/۵۱ ^d
(میلی گرم بر لیتر) ۲۰۰	۵۴/۸۱ ^b	۵/۹۲ ^c	۴۶/۵۶ ^a	۵/۶۷ ^b	۱۱۸/۱۴ ^c	۷۰/۷۵ ^c
۵۰۰	۶۷/۷۰ ^a	۶/۳۱ ^b	۴۷/۷۵ ^a	۶/۷۵ ^a	۱۳۹/۹۹ ^b	۸۹/۳۳ ^a
	۴۲/۲۳ ^d	۷/۳۱ ^a	۳۹/۰۶ ^b	۶/۵۰ ^a	۱۶۸/۲۳ ^a	۸۲/۵۵ ^b

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین ها در آزمون دانکن می باشد.

پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون بر محتوای نسبی آب برگ معنی دار نبود. اما اثرات ساده تیمار تنش خشکی و پیش تیمار نانو سیلیکون بر این صفت به ترتیب در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار شد (جدول شماره ۴). در تیمار با تنش خشکی، بیشترین و کمترین محتوای نسبی آب برگ به ترتیب در ۱۰۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. در غلظت های مختلف نانو سیلیکون نیز محتوای نسبی آب برگ تفاوت معنی داری نشان داد، به طوری که بیشترین و کمترین محتوای نسبی آب برگ در پیش تیمار بذر با ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوسیلیکون و شاهد (عدم استفاده از پیش تیمار) مشاهده شد (جدول شماره ۵). استفاده از پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب باعث افزایش ۴/۲، ۲۸/۵ و ۲۴/۵ درصد در محتوای نسبی آب برگ گیاه همیشه بهار شد.

سطوح مختلف تنش خشکی نیز تأثیر معنی داری بر روی تمامی صفات به جز وزن تر ریشه داشت، به طوری که کمترین ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، وزن تر ریشه و بوته و قطر بزرگترین گل، در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و بیشترین عملکرد گل، بزرگترین قطر گل و بیشترین تعداد ساقه فرعی در تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (جدول شماره ۳). ارتفاع و وزن تر بوته با افزایش سطح تنش خشکی کاهش معنی داری داشتند. به طوری که تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) به ترتیب باعث کاهش ۲۸/۵ و ۳۱/۳ درصدی ارتفاع و وزن تر بوته نسبت به شاهد (عدم تنش خشکی) شد.

صفات فیزیولوژیکی و متابولیتی

محتوای نسبی آب برگ

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل تنش خشکی و



جدول شماره ۴- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی گیاه دارویی همیشه بهار تحت تأثیر تنش خشکی و پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نائوسیلیکون

میانگین مربعات

منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوی نسبی آب	نشت یونی	کلروفیل کل	کارتونید	فنل کل	فلاونوید کل	کورتستین	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی
پیش تیمار نائو سیلیکون (N) <td>۳</td> <td>۲۲۵۶/۲۵**</td> <td>۱۶۸/۷۵^{ns}</td> <td>۳۰/۱۹*</td> <td>۳/۵۲۷^{ns}</td> <td>۲۹/۲۸**</td> <td>۴/۹۰**</td> <td>۳۰۶/۳۵^{ns}</td> <td>۷/۳۰**</td>	۳	۲۲۵۶/۲۵**	۱۶۸/۷۵ ^{ns}	۳۰/۱۹*	۳/۵۲۷ ^{ns}	۲۹/۲۸**	۴/۹۰**	۳۰۶/۳۵ ^{ns}	۷/۳۰**
تنش خشکی (D) <td>۳</td> <td>۲۶۵/۲۳*</td> <td>۷۶/۴۱*</td> <td>۱۶/۷۶*</td> <td>۳/۷۶۸*</td> <td>۱۹/۲۵**</td> <td>۲۶/۳۴**</td> <td>۲۸۹/۵۰۴*</td> <td>۳/۶۴**</td>	۳	۲۶۵/۲۳*	۷۶/۴۱*	۱۶/۷۶*	۳/۷۶۸*	۱۹/۲۵**	۲۶/۳۴**	۲۸۹/۵۰۴*	۳/۶۴**
(D) × (N) <td>۹</td> <td>۹۱/۷۸^{ns}</td> <td>۷۱/۹۷^{ns}</td> <td>۱۰/۳۱^{ns}</td> <td>۱/۸۰۴^{ns}</td> <td>۱۳/۰۵^{ns}</td> <td>۲/۰۴**</td> <td>۲۹۲/۸۷**</td> <td>۱/۳**</td>	۹	۹۱/۷۸ ^{ns}	۷۱/۹۷ ^{ns}	۱۰/۳۱ ^{ns}	۱/۸۰۴ ^{ns}	۱۳/۰۵ ^{ns}	۲/۰۴**	۲۹۲/۸۷**	۱/۳**
خطای آزمایش <td>۴۸</td> <td>۹۳/۶۳</td> <td>۱۲۴/۸۸</td> <td>۹/۶۶</td> <td>۱/۴۴</td> <td>۱۵/۷۴</td> <td>۰/۶۳</td> <td>۱۰۹/۹۳</td> <td>۱/۲۵</td>	۴۸	۹۳/۶۳	۱۲۴/۸۸	۹/۶۶	۱/۴۴	۱۵/۷۴	۰/۶۳	۱۰۹/۹۳	۱/۲۵
ضرب تغییرات (درصد) CV <td>-</td> <td>۱۳/۵۹</td> <td>۱۱/۹۰</td> <td>۲۴/۷۱</td> <td>۲۶/۴۹</td> <td>۲۷/۶۸</td> <td>۱۵/۷۷</td> <td>۲۳/۴۱</td> <td>۳۳/۳۵</td>	-	۱۳/۵۹	۱۱/۹۰	۲۴/۷۱	۲۶/۴۹	۲۷/۶۸	۱۵/۷۷	۲۳/۴۱	۳۳/۳۵

** و * به ترتیب بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$)، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ($p \leq 0.05$) و عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی و پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون بر صفات فیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار

تیمارها	محتوای نسبی آب (درصد)	نشست یونی (درصد)	کلروفیل کل (میکروگرم بر میلی لیتر)	کارتونوئید (میکروگرم بر میلی لیتر)	میزان فنل کل (میکروگرم بر میلی لیتر)
۱۰۰	۸۲/۳۴ ^a	۷۳/۵۰ ^d	۱۰/۲۲ ^a	۲/۸۷ ^a	۸/۳۴ ^d
تنش خشکی (درصد FC)	۷۴/۲۳ ^b	۸۰/۲۸ ^c	۷/۵۶ ^b	۲/۷۷ ^a	۱۰/۲۱ ^c
۵۰	۷۰/۲۵ ^c	۸۷/۵۵ ^b	۴/۸۹ ^c	۱/۸۷ ^b	۱۳/۲۲ ^a
۲۵	۶۵/۳۱ ^d	۹۳/۲۳ ^a	۳/۵۶ ^d	۱/۱۱ ^c	۱۱/۷۵ ^b
۰	۵۹/۷۱ ^d	۶۹/۸۲ ^a	۵/۶۶ ^c	۲/۸۱ ^a	۱۳/۷۱ ^{bc}
نانوسیلیکون (میلی گرم بر لیتر)	۶۲/۳۵ ^c	۷۰/۱۴ ^a	۸/۱۵ ^a	۱/۹۵ ^a	۱۶/۴۸ ^a
۲۰۰	۸۳/۵۸ ^a	۷۲/۲۰ ^a	۷/۸۹ ^b	۲/۱۲ ^a	۱۲/۳۴ ^c
۵۰۰	۷۹/۱۳ ^b	۷۳/۰۷ ^a	۴/۸۹ ^d	۱/۷۴ ^a	۱۴/۸۲ ^{ab}

حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون دانکن می‌باشد.

نشست یونی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون و سطوح مختلف تنش خشکی بر شاخص نشست یونی معنی‌دار نبود (جدول شماره ۴). همچنین، نشست یونی تحت تأثیر پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون قرار نگرفت و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. اما در میان سطوح مختلف تنش خشکی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد در میزان نشست یونی نونه‌ها مشاهده شد، به طوری که بیشترین میزان نشست یونی (۹۳/۲۳ درصد) در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد که افزایش ۲۱/۱ درصدی نسبت به شاهد داشت.

رنگیزه‌های فتوستزی (کلروفیل کل و کارتونوئید)

با توجه به نتایج به دست آمده حاصل از تجزیه آماری داده‌ها اثرات ساده تنش خشکی و پیش تیمار نانو سیلیکون بر میزان کلروفیل کل در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول شماره ۴). محتوای کارتونوئید نیز در تیمار تنش خشکی در سطح ۵ درصد معنی‌دار و در پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون غیرمعنی‌دار بود (جدول شماره ۴). به طوری که بیشترین مقدار کلروفیل کل (۸/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر) در پیش تیمار بذر با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانو سیلیکون به دست آمد، هر چند از نظر آماری با غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نانو سیلیکون

اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول شماره ۵). کمترین میزان کلروفیل کل در ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو سیلیکون مشاهده شد، که کاهش ۱۳/۶ درصدی نسبت به شاهد (عدم استفاده از پیش تیمار) داشت. همچنین، بیشترین و کمترین میزان کلروفیل کل در تیمار تنش خشکی به ترتیب در شاهد (بدون تنش خشکی) و تنش خشکی در ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد. میزان کارتونوئید در پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول شماره ۴). اما با افزایش شدت تنش خشکی میزان کارتونوئید کاهش یافت و اعمال تنش خشکی تا سطح ۷۵ درصد ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌داری را از نظر میزان کارتونوئید با شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) نشان نداد. همچنین، کمترین میزان کارتونوئید در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (کاهش ۶۱/۳ درصد نسبت به شاهد) مشاهده شد.

مقدار فنل کل

نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و کاربرد نانو سیلیکون به عنوان ماده پیش تیمار کننده بذر بر میزان فنل کل در گیاه دارویی همیشه بهار معنی‌دار نبود، اما اثرات ساده آنها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول شماره ۴). بیشترین مقدار فنل کل (۱۶/۴۸ میلی گرم در گرم وزن خشک) در پیش تیمار با نانو سیلیکون مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین میزان



طوری که میزان این ترکیب در پیش تیمار بذر با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوسیلیکون تحت تنش خشکی متوسط در حدود ۱۷/۵ درصد افزایش نسبت به عدم استفاده از پیش تیمار و بدون اعمال تنش خشکی نشان داد. در حالی که استفاده از پیش تیمار با نانوسیلیکون تأثیر معنی داری بر میزان کوئرستین در شرایط رطوبتی نرمال (عدم تنش خشکی) نشان نداد. در شکل شماره ۵، دو نمونه از کروماتوگرام HPLC عصاره برگ گیاه همیشه بهار در تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (بدون تنش خشکی) و بدون پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون (الف) و در تیمار تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و پیش تیمار با ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نانوسیلیکون (ب) نشان داده شده است.

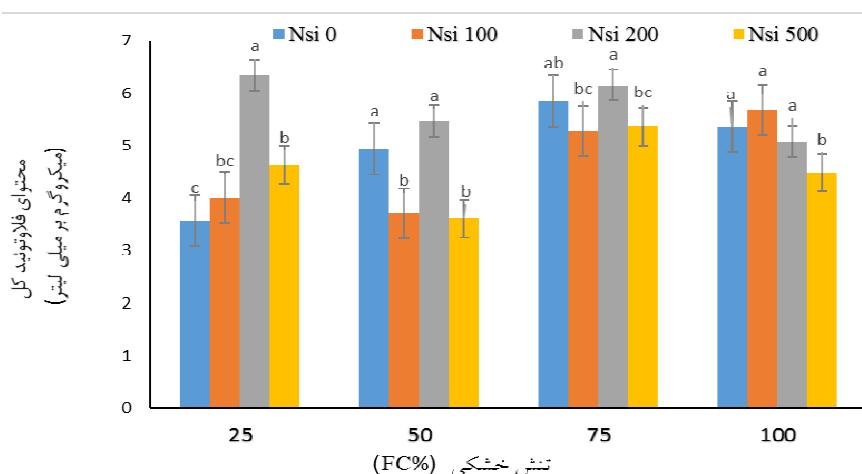
فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه دارویی همیشه بهار حاصل از تیمارهای مختلف آزمایشی تأثیر معنی داری بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشت (جدول شماره ۴). با افزایش سطح تنش خشکی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه افزایش داشت به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره (۴/۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در گیاهان تحت پیش تیمار با نانو سیلیکون در غلظت ۲۰۰ میلی گرم و تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (شکل شماره ۶).

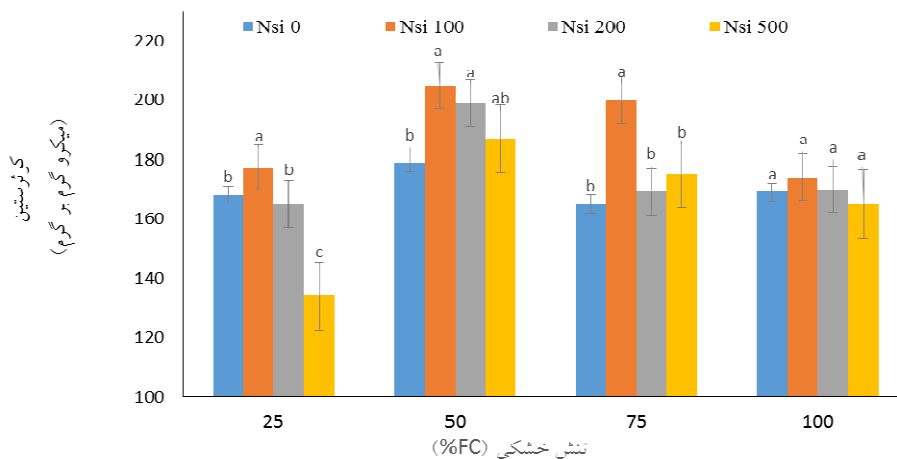
آن (۱۲/۳۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد. در تیمار تنش خشکی، اعمال تنش در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش ۳۶/۹ درصد فنل کل نسبت به شاهد شد (جدول شماره ۵).

میزان فلاونوئید کل و کوئرستین

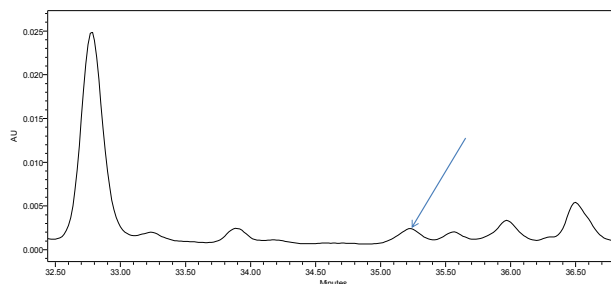
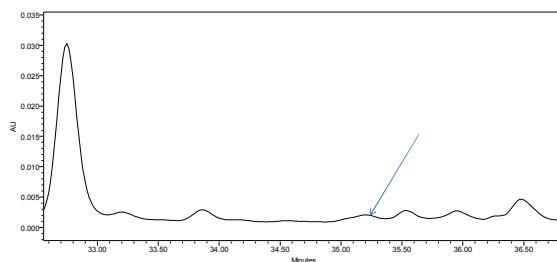
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها تأثیر معنی دار ($P \leq 0/01$)، پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون و تنش خشکی و اثر متقابل این تیمارها بر میزان فلاونوئید کل گیاه همیشه بهار را نشان می‌دهد (جدول شماره ۴). میزان کوئرستین نیز تحت تأثیر تنش خشکی و اثر متقابل تنش خشکی و پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون قرار گرفت، اما اثر ساده پیش تیمار معنی دار نبود (جدول شماره ۴). بر اساس این نتایج کمترین میزان فلاونوئید کل (۳/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در رطوبت ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بدون پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون مشاهده شد (شکل شماره ۳). در حالی که پیش تیمار بذر با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوسیلیکون تحت تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی محتوای فلاونوئید کل را به میزان ۴۳/۶ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون (در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و اعمال تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) بیشترین تأثیر را بر میزان کوئرستین داشت (شکل شماره ۴). به



شکل شماره ۳- اثر پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون بر فلاونوئید کل گیاه همیشه بهار تحت تنش خشکی. حروف غیرمشابه در هر سطح تنش خشکی نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن (۵ درصد) می‌باشد.

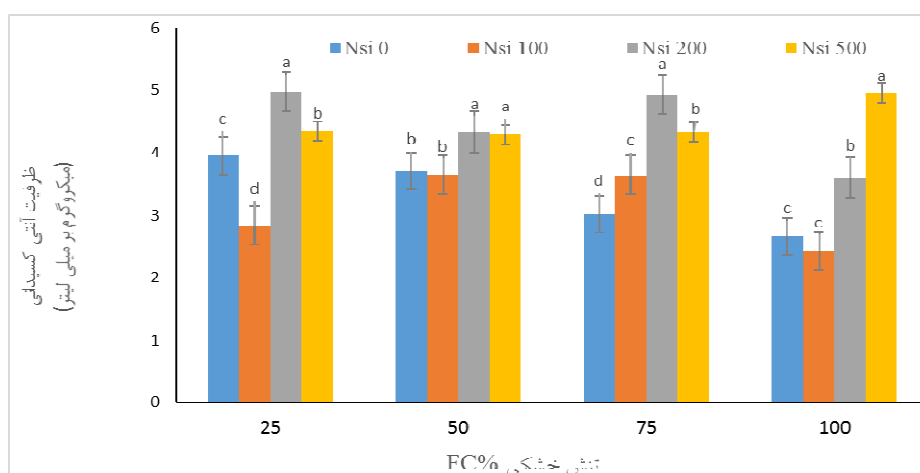


شکل شماره ۴ - اثر پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون بر محتوای کوئرستین گیاه همیشه بهار تحت تنش خشکی. حروف غیر مشابه در هر سطح تنش خشکی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن (۵ درصد) می‌باشد.



شکل شماره ۵ - کروماتوگرام HPLC عصاره برگ گیاه همیشه بهار در تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای (بدون تنش خشکی) و بدون پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون (الف) و در تیمار تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) و پیش تیمار با نانوسیلیکون (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (ب). فلش آبی رنگ معرف پیک مربوط به کوئرستین است.





شکل شماره ۶ - اثر پیش تیمار بذر با غلظت‌های مختلف نانو سیلیکون بر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه همیشه‌بهار تحت تنش خشکی. حروف غیرمشابه در هر سطح تنش خشکی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن (۵ درصد) می‌باشد.

بحث

است. گیاهان، به طور کلی، با تنظیم اسمزی آب بیشتری را در پاسخ به تنش خشکی حفظ می‌کنند [۳۱]. با این حال، تنش خشکی باعث کاهش قابل توجه محتوای آب برگ و پتانسیل آب در بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌شود [۳۴، ۳۵]. از طرفی همه گیاهان نیاز به مقدار کافی از مواد مغذی گیاهی ضروری برای رشد و نمو طبیعی دارند. جذب مواد مغذی گیاهی زمانی که گیاهان در معرض تنش‌های غیرزیستی مختلف از جمله خشکی قرار می‌گیرند مختل می‌شود [۳۳].

خشکی همچنین باعث کاهش قابل توجهی در رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهان می‌شود. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که کاربرد سیلیکون، در بسیاری از گونه‌های گیاهان تحت تنش خشکی رنگدانه‌های فتوسنتزی را افزایش داده است [۳۶]. همچنین استفاده از سیلیکون باعث افزایش قابل توجه پتانسیل آب برگ و محتوای آب در گیاهان تحت تنش خشکی می‌شود [۳۷]. روزه‌ها سطح آب گیاه را با کنترل سرعت ویژه تعرق تحت تنش خشکی تنظیم می‌کنند. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد سیلیکون کیفیت تبادل گاز در گیاهان تحت تنش خشکی را تنظیم می‌کند [۳۸، ۳۹]. گونگ و چن [۴۰] مشاهده کردند که سیلیکون در تغییرات روزانه سرعت فتوسنتز خالص در برگ، سرعت تعرق، و هدایت روزنه در گیاهان گندم تحت تنش خشکی در شرایط مزرع‌ای نقش واسطه‌گری دارد. همه این اثرات مثبت سیلیکون ممکن است به

در بین تنش‌های غیرزیستی، خشکی از جمله تنش‌های محیطی مهم در مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد که بیشترین اثر را روی گیاهان دارد. در مطالعه حاضر با افزایش سطح تنش خشکی، محتوای آب نسبی برگ کاهش یافت، اما گیاهان با پیش تیمار بذر با نانوسیلیکون در غلظت‌های کمتر (۲۰۰ - ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) توانستند این کمبود رطوبت را تا حدودی جبران کنند. در سایر صفات نیز پیش تیمار نانو سیلیکون تأثیرگذار بوده و اثرات مثبتی بر کارایی گیاه داشت. همچنین، تنش خشکی تأثیر منفی بر رشد و زیست توده گیاه نشان داد. مطالعات زیادی اثر مثبت سیلیکون در گیاهان تحت تنش خشکی را نشان داده است، در واقع نانو ذرات سیلیکون جذب شده توسط ریشه گیاه یک لایه در دیواره سلولی ایجاد می‌کند که به تحمل تنش و بهبود عملکرد در گیاهان کمک می‌کند [۳۳ - ۳۱]. یکی از دلایل کاهش میزان محتوای نسبی آب برگ در گیاهان کاهش رشد و فعالیت ریشه و افزایش میزان تبخیر و تعرق می‌باشد [۴۲]. اخیراً گزارش شده است که افزایش محتوای نسبی آب با استفاده از کاربرد نانو سیلیکون در گیاهان ممکن است به دلیل اثرات مثبت نانو ذرات سیلیکون بر نیروی آب درون آوند آبکش گیاهان باشد که اثرات منفی تنش خشکی بر میزان آب درون آوندها را کاهش می‌دهد [۴۳]. در شرایط تنش خشکی، سطح بهینه آب برای بقای گیاهان، حیاتی

نقش دفاعی متابولیت‌های ثانویه برای همه تقریباً پذیرفته شده است، اما هنوز بررسی ساز و کار تأثیر تنش‌های محیطی بر تولید این مواد تصویر پیچیده و پر ابهامی پیش روی ما می‌گذارد. شواهد زیادی نشان می‌دهد که در شرایط تنش تولید برخی از این ترکیبات تا چندین برابر افزایش می‌یابد. ترکیبات فنلی از مشتقات مسیر فنیل پروپانویید بوده و از اجزای سیستم دفاع غیر آنزیمی و آنتی‌اکسیدانی سلول محسوب می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند به عنوان خاموش کننده یا جاروب کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا سایر گونه‌های فعال اکسیژن عمل نمایند. با توجه به نقش ترکیبات فنولی در کاهش و یا مهار اکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، خاموش کردن اکسیژن یکتایی یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیبات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیش روی زنجیره‌ی اکسیداتیو و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند [۴۶].

پیش تیمار بذر با سیلیکون ممکن است به طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث بیان ژن‌های مسیر بیوستنز این ترکیبات شده باشد و یا اینکه فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوستنز آنها را افزایش داده باشد و از این طریق باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شده است [۴۷]. یکی دیگر از ترکیبات فنولی فلاونوئید است. بر اساس مشاهدات حاصل از این مطالعه تأثیر پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون و اعمال تنش خشکی بر میزان ترکیبات فلاونوئیدی گیاه همیشه بهار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. علاوه بر اینکه اثرات تیمارها بر میزان متابولیت‌های ثانویه بسیار مثبت بوده است، لیکن اثرات متقابل تیمارهای اعمال شده باعث افزایش قابل توجه میزان ترکیبات فلاونوئیدی گیاهان در مقایسه با شاهد شد.

از جمله مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش خشکی، افزایش سطوح ترکیبات فنلی است، چرا که این گونه ترکیبات به عنوان پالاینده‌های گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن عمل کرده و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی و مانع پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند [۴۸]. نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز افزایش یافت در گیاهان تغییر در فعالیت‌های

دلیل مکانیزم‌های مختلف از جمله افزایش جذب مواد غذایی معدنی توسط گیاهان، تعادل در تبادل گاز، تنظیم اسمزی، کاهش تنش اکسیداتیو و تعادل در بیان ژن گیاهان باشد. در گیاهان زمانی که در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند در آنها تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد [۳۴]. به طور گسترده‌ای گزارش شده است که کاربرد سیلیکون در گیاهان آسیب‌های اکسیداتیو را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به شاهد که ممکن است تحمل به خشکی را در گیاهان بهبود ببخشد، کاهش دهد [۴۱].

غشای سلولی از نخستین اندام‌هایی است که تحت شرایط تنش، آسیب می‌بیند و تراوایی آن افزایش یافته و نشت الکتروولیتی از سلول باعث مرگ آن می‌شود. پایداری غشای سلولی می‌تواند به عنوان معیاری از تحمل به تنش خشکی در نظر گرفته شود در مطالعات اظهار شده است که غشاهای سلولی گیاهان در تنش خشکی دچار تغییراتی شده و باعث افزایش نفوذپذیری کلی یونها و کاهش نفوذپذیری انتخابی می‌شود که از طریق افزایش نشت یونی قابل مشاهده است [۴۴]. تحت تنش خشکی، غشای سلولی پایداری خود را از دست داده و در صورت قرار گرفتن برگ در یک محیط آبی مواد محلول از سلول‌های آن به بیرون تراوش می‌کند، لذا پایداری غشا بوسیله ارزیابی تراوش یونها از آن ارزیابی می‌شود [۴۵]. تنش خشکی موجب افزایش نشت یونی سلول‌ها شده که نشان‌دهنده وقوع آسیب به غشای سلولی بوده است. در مطالعه حاضر تفاوت میان سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان نشت یونی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود، در حالی که پیش تیمار بذر با نانو ذرات سیلیکون تأثیر معنی‌داری بر میزان نشت یونی نداشت. همچنین در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوسیلیکون (به عنوان پیش تیمار کننده بذر) بیشترین میزان نشت یونی سلول‌ها را در مقایسه با سایر غلظت‌های به کار گرفته شده، مشاهده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کاربرد نانو سیلیکون به صورت پیش تیمار بذر، تأثیر معنی‌داری بر میزان فنل کل گیاه همیشه بهار دارد. به طوری که بیشترین میزان فنل در پیش تیمار با نانو سیلیکون در غلظت کم (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به دست آمد. با توجه به اینکه امروزه



صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه دارویی همیشه بهار داشت. به طوری که، بیشترین مقدار فلاونوئید کل در پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر و تنش خشکی ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. همچنین، استفاده از غلظت‌های کمتر نانو سیلیکون به صورت پیش تیمار بذر در تنش خشکی متوسط باعث افزایش محتوای کوئرستین که مهم‌ترین ماده مؤثره گیاه همیشه بهار می‌باشد شد.

تشکر و قدرانی

مقاله حاضر از طرح پژوهشی به شماره ۵۳۲۷/۹۵ مورخ ۹۵/۶/۱۳ مصوب دانشگاه اراک می‌باشد. لذا از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک به دلیل حمایت در اجرای این تحقیق (در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد) تقدیر و تشکر می‌شود.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از سازوکارهایی است که برای افزایش مقاومت در برابر تنش‌ها رخ می‌دهد. فعالیت تخریب رادیکال DPPH در گیاه *Cakile maritima Scop* تحت تنش شوری به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت [۴۹]. با توجه به عدم شناخت کافی از مکانیسم دقیق عمل نانو سیلیکون در ایجاد مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و همچنین افزایش رشد گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی، پیشنهاد می‌شود مطالعات مولکولی بر روی این عنصر در بافت‌های گیاهان انجام شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال تنش خشکی و پیش تیمار بذر با نانو سیلیکون و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر

منابع

1. Torney F, Trewyn BG, Lin VSY, Wang K., Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nano Tech.* 2007; 2: 295 - 300.
2. Albulescu M, Alexa N, Cojan C. *Calendula officinalis* flowers, source of extracts with antioxidant activity. *Ann. West Univ. Timisoara Ser Chem.* 2004; 13 (2): 169–176.
3. Jan N, John R. *Calendula officinalis* -An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad.* 2017; 83: 769-787.
4. Shekari F, Baljani R, Saba J and Afsahi K. effect of priming with salicylic acid on the properties borage seedlings (*Barago officinalis*). *J. Modern Agricultural Sci.* 2010; 18: 47 - 53.
5. Demir Kaya M, Okcu G, Atak M A and Kolsarici O. Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sunflower. *European Journal of Agronomy* 2006; 24: 291 - 5.
6. Masoudi P, Gezancheyan A, Jajarami V and Bozorgmehr A. Effect of seed treatment on germination and seedling vigor in three species of permanent grass under salinity stress. *JAST.* 2008; 22: 57 - 67.
7. Basra MAS, Ashraf M, Iqbal N, Khliq A and Ahmad R. Physiological and biochemical aspect of pre-sowing heat stress on cotton seed. *SST.* 2004; 32: 765 - 74.
8. Omidi H, Movahadi F and Movahadi S H. The effect of salicylic acid and scarification on germination characteristics and proline, protein and soluble carbohydrate content of *Prosopis farcta* L.) seedling under salt stress. *Rang. Des. Res.* 2012; 18: 608 - 23.
9. Siddique MRB, Hamid A and Islam MS. Drought stress effects on photosynthetic rate and leaf gas exchange of wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica.* 1999; 40: 141 - 5.
10. Yordanov V and Tsoev T. Plant responses to drought, acclimation and stress tolerance. *Photosynthica* 2000; 38: 171 - 86.
11. Bhatt RM and Srinivasa-Rao NK. Influence of pod load on response of okra to water stress. *Indian Journal Plant Physiol.* 2005; 10: 54 - 9.



12. Hatami M, Kariman K and Ghorbanpour M. Engineered nanomaterial-mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science of the Total Environment* 2016; 571: 275 – 91.
13. Ghorbanpour M, Hatami M and Hatami M. Activating antioxidant enzymes, hyoscyamine and scopolamine biosynthesis of *Hyoscyamus niger* L. plants with nano-sized titanium dioxide and bulk application. *Acta Agric. Slov.* 2015; 105: 23 - 32.
14. Bao-Shan L, Shao-qi D, Chun-hui L, Li-jun F, Shu-chun Q, Min Y. Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings. *J. Forest Res.* 2004; 15: 138 - 40.
15. Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Sakran AM, Ali HM, Basalah MO, FaisalM, Alatar A and Al-Amri AA. Calcium-induced amelioration of boron toxicity in radish. *J. Plant Growth Regul.* 2013; 32: 61 – 71.
16. Yinfeng X, Bo L, Qianqian Z, Chunxia Z, Kouping L and Gongsheng T. Effects of nano-TiO₂ on photosynthetic characteristics of *Indocalamus barbatus*. *J. Northeast Forest Uni.* 2011; 39: 22 – 5.
17. Amira MS, Abdul Qados and Ansary EM. Influence of Silicon and Nano-Silicon on Germination, Growth and Yield of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Under Salt Stress Conditions. *American J. Experimental Agriculture* 2015; 5 (6): 509 - 24.
18. EL-Kady ME, El-Boray MS, Shalan AM and Lamiaa M. Effect of silicon dioxide nanoparticles on growth improvement of banana shoots in vitro within rooting stage. *J. Plant Production, Mansoura Univ.* 2017; 8 (9): 913 - 6.
19. Emam MM, Khattab HE, Helal NM and Deraz AE. Effect of selenium and silicon on yield quality of rice plant grown under drought stress. *AJCS.* 2014; 8: 596 – 605.
20. Hatami M, Hadian J and Ghorbanpour M. Mechanism's underlying toxicity and stimulatory role of single-walled carbon nanotubes in *Hyoscyamus niger* during drought stress simulated by polyethylene glycol. *J. Hazardous Materials* 2017; 324: 306 – 20.
21. Baiiazidi-Aghdam MT, Mohammadi H and Ghorbanpour M. Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (Linaceae) under well watered and drought stress conditions. *Braz. J. Bot.* 2016; 39: 139 - 46.
22. Hatami M and Ghorbanpour M. Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biol.* 2014; 38: 130 - 9.
23. Ferrat IL and Lova CJ. Relation between relative water content, Nitrogen pools and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius*, A. Gray during water deficit. *Crop Science* 1999; 39: 467 - 74.
24. Karlidag H, Yildirim E and Turan M. Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Science Agriculture* 2009; 66 (2): 180 - 7.
25. Porra RJ. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Res.* 2002; 73: 149 - 56.
26. Sims DA and Gamon JA. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* 2002; 81: 337 - 54.
27. Lichtenthaler HK and Wellburn AR. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Transac.* 1983; 11: 591 - 2.
28. Meda A, Lamien C, Romito E, Millogo M J and Nacoulma O G. Determination of the total phenolic, flavonoid and pralin contents in Burkina Fasan honey, as well as their scavenging activity. *Food Chem.* 2005; 91: 571 - 7.
29. Chang C, Yang M, Wen H and Chern J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis



- by Two Complementary Colorimetric Methods. *Food and Drug Analysis*. 2002; 10: 178 - 82.
- 30.** Shyu YS and Hwang LS. Antioxidant activity of the crude extract of lignin glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Res. Int.* 2002; 35: 357 - 65.
- 31.** Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K and Tran LSP. Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 2014; doi:10.3389/fpls.2014.00086.
- 32.** Ahmed M, Hassan FU and Asif M. Amelioration of drought in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by silicon. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2014; 45: 470 – 86.
- 33.** Emam MM, Khattab HE, Helal NM and Deraz AE. Effect of selenium and silicon on yield quality of rice plant grown under drought stress. *AJCS*. 2014; 8: 596 – 605.
- 34.** Noman A, Ali S, Naheed F, Ali Q, Farid M, Rizwan M and Irshad MK. Foliar application of ascorbate enhances the physiological and biochemical attributes of maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Arch. Agron. Soil Sci.* 2015; doi:10.1080/03650340.2015.1028379.
- 35.** Baiazidi-Aghdam MT, Mohammadi H, Ghorbanpour M. 2016. Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (Linaceae) under well watered and drought stress conditions. *Braz J Bot.* 39: 139-146.
- 36.** Da Silva Lobato AK, de Oliveira Neto CF, Marques DJ and Guedes EMS. Silicon: a benefic element to improve tolerance in plants exposed to water deficiency. INTECH Open Access Publisher. 2013.
- 37.** Ming DF, Pei ZF, Naeem MS, Gong HJ, Zhou WJ. Silicon alleviates PEG-induced water deficit stress in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *J. Agron Crop Sci.* 2012; 198: 14 – 26.
- 38.** Putra ETS, Issukindarsyah T and Purwanto BH. Physiological responses of oil palm seedlings to the drought stress using boron and silicon applications. *J. Agron. Doi.* 2015; 10: 3923/ja.2015.
- 39.** Saud S, Li X, Chen Y, Zhang L, Fahad S, Hussain S and Chen Y. Silicon application increases drought tolerance of Kentucky bluegrass by improving plant water relations and morphophysiological functions. *Sci. World J. doi.* 2014; 10: 1155/2014/368694.
- 40.** Gong H, Chen K. Thereregulatoryrole of silicon on water relations, photosynthetic gas exchange, and carboxylation activities of wheat leaves in field drought conditions. *Acta Physiol. Plant.* 2012; 34: 1589 – 94.
- 41.** Shen X, Zhou Y, Duan L, Li Z, Eneji AE and Li J. Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedling sunder drought and ultraviolet-B radiation. *J. Plant Physiol.* 2010; 167: 1248 – 52.
- 42.** Tarumingkeng RC and Coto Z. Effects of drought stress on growth and yield of soybean. Kisman. Science Philosopy Agricultural University. 2003, pp: 702.
- 43.** Ashkavand P, Tabari M, Zarafshar M, Tom skova I and Struve D. Effect of SiO₂ nanoparticles on drought resistance in hawthorn seedlings. *Lesne Prace Badawcze.* 2015; 76: 350 - 9.
- 44.** Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany* 2003; 91: 179 – 94.
- 45.** Sairam RK, Rao KV and Srivastava GC. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 2002; 163: 1037 – 46.
- 46.** Gao X, Zou C, Wang L, Zhang F. Silicon improves water use efficiency in maize plants. *J. Plant Nutrition.* 2005; 27: 1457 – 70.
- 47.** Maksimovic JD, Bogdanovic J, Maksimovic V and Nikolic M. Silicon modulates the metabolism and utilization of phenolic compounds in cucumber



(*Cucumis sativus* L.) grown at excess manganese. *J. Plant Nutrition and Soil Sci.* 2007; 170: 739 - 44.

48. Ghorbanpour M, Khaltabadi Farahani A.H, Hadian J. Potential toxicity of nano-graphene oxide on callus cell of *Plantago major* L. under polyethylene glycol-induced dehydration.

Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018; 148: 910–922.

49. Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C and Abdelly C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochem.* 2007; 45: 244 - 9.

