

مقاله تحقیقاتی

تأثیر نانوذرات اکسید سریم بر شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و محتوای تانن‌ها ریشه مریم‌گلی قرمز (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) در دو روش محلول‌پاشی برگ‌ی و تغذیه خاکی

سیمین پاریان^۱، منصور قربانپور^{۲*}، جواد هادیان^۳

^۱ فارغ‌التحصیل گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

^۲ گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

^۳ گروه کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

گل‌واژگان:

مریم‌گلی قرمز

الیستور

تانن‌ها

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نانوذرات اکسید سریم

مقدمه: نانوذرات اکسید سریم بسته به گونه گیاهی، شرایط کشت، غلظت و روش مورد استفاده می‌تواند اثرات متفاوتی بر القا فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاهان داشته باشد. **هدف:** بررسی تأثیر نانو اکسید سریم در غلظت‌های مختلف به دو روش محلول‌پاشی برگ‌ی و تغذیه خاک طی دو مرحله رشد بر ویژگی‌های مورفو - فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی مریم‌گلی قرمز. **روش بررسی:** این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید سریم (۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) در دو مرحله رشد (رویشی و زایشی) و به دو روش محلول‌پاشی برگ‌ی و تغذیه خاکی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** بیشترین وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله زایشی مشاهده شد. محتوی کلروفیل a در تیمار تغذیه خاکی با ۲۵۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی بیشترین مقدار بود. همچنین، بیشترین مقدار فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ در گیاهان تحت تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی با ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی حاصل شد. درحالی که در روش تغذیه خاک بیشترین مقدار اسید رزمارینیک و تانن‌ها ریشه در تیمار ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله زایشی حاصل شد که به ترتیب ۵۸/۷ و ۲۴/۶ درصد نسبت به شاهد موردنظر افزایش داشت. **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم به روش محلول‌پاشی برگ‌ی در دوره زایشی بیشترین تأثیر را بر بهبود ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مریم‌گلی قرمز گذاشت.

مخفف‌ها: CeO_2 ، اکسید سریم؛ CeO_2NPs ، نانوذرات اکسید سریم؛ SEM، میکروسکوپ الکترونی روبشی؛ TEM، میکروسکوپ الکترونی عبوری

* نویسنده مسؤول: m-ghorbanpour@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۵ مهر ۱۳۹۸؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۵ دی ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۵ دی ۱۳۹۸

doi: 10.29252/jmp.19.75.168

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

۱. مقدمه

مریم‌گلی قرمز با نام علمی *Salvia miltiorrhiza* Bunge گیاهی چندساله و نیمه خشبی از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی در چین است [۱]. خاستگاه و پراکنش مریم‌گلی نواحی شمالی مدیترانه (آسیا، شمال آفریقا، حوزه اروپایی دریای مدیترانه) گزارش شده است. ترکیبات موجود در عصاره گیاهان جنس سالویا عمدتاً از خانواده‌ی ترپنوئیدها می‌باشد [۱]. بخش‌های هوایی این گیاه عمدتاً شامل فلاونوئیدها و تری‌ترپن‌ها و مونوترپن‌ها است. دی‌ترپن‌ها بیشتر در ریشه‌ها یافت می‌شوند [۲]. از اندام هوایی و ریشه این گیاه در درمان التهاب لثه و مخاط دهان و گلو و همچنین به عنوان داروی گوارشی برای درمان برهم خوردن وضعیت معده، نفخ و اسهال و نیز درمان تعریق شبانه استفاده می‌شود. این گیاه در قدیم به عنوان داروی ضد دیابت نیز مورد استفاده بوده است [۲، ۳]. به ریشه خشک شده گیاه مریم‌گلی قرمز دانشن (Danshen) می‌گویند [۳]. در میان تمام داروهای گیاهی دانشن رایج‌ترین درمان برای گلو درد در چین است [۳]. دانشن همچنین باعث انقباض عروق کرونر با افزایش موقت جریان خون کرونری می‌شود که به طور مؤثر باعث افزایش کارکرد قلب بدون افزایش اکسیژن می‌شود [۴]. اسید رزمارینیک، یکی دیگر از ترکیبات مهم فنلی موجود در مریم‌گلی قرمز است که به عنوان یک ماده ضدسرطان، ضد اکسیدکننده، ضد التهابی، ضد جهش، ضد باکتری و ضد ویروسی شناخته شده است [۵، ۶]. ترکیبات شیمیایی عمده مریم‌گلی قرمز عبارتند از اسیدهای فنولیک و تانن‌ها (اسید سالویانویک، دی‌هیدروتانن‌ها، تانن‌ها I، تانن‌ها IIA و کریپتوتانن‌ها) [۷].

نانو ذرات فلزی در چند سال اخیر به دلیل ویژگی‌های منحصر بفرد و کاربردهای دارویی و پزشکی توجه طیف

وسعی از دانشمندان را به خود جلب کرده است [۸]. از آنجاکه هر روزه خصوصیات و ترکیبات جدیدی از نانو ذرات یافت می‌شود به همان نسبت کاربرد آنها نیز بیشتر می‌شود. در علوم گیاهان دارویی، نانوفناوری و نانوذرات باعث افزایش تولید ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه برای استفاده دارویی می‌شود [۹]. تأثیر نانو ذرات بستگی به ترکیب، غلظت، اندازه، خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و نیز بستگی به گونه‌های گیاهی، مرحله رشدی گیاه، روش و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن دارد [۱۰].

سریم به عنوان فراوان‌ترین عنصر کمیاب در پوسته زمین، به طور وسیعی در صنایع مختلف استفاده می‌شود [۱۱، ۱۲]. اکسید سریم (سریا) یکی از اکسیدهای فلزی لانتانید است که به داشتن پتانسیل اکسایش- کاهش معروف است [۱۳]. مطالعات اندکی در ارتباط با تأثیر نانو اکسید سریم بر متابولیت ثانویه گیاهان دارویی انجام شده است. در گیاه مریم‌گلی استفاده از نانو دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش فلاونوئید کل، محتوی فنل و افزایش مونوترپن‌ها شد [۱۴]. استفاده از نانو دی‌اکسید تیتانیوم و بالک آن روی گیاه بنگ دانه سبب افزایش محتوی تروپان آلکالوئیدها و عملکرد آلکالوئیدها کل شد [۱۵]. طبق تحقیق ژائو و همکاران [۱۶] استفاده از نانو ذرات دی‌اکسید سریم (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در گیاه خیار تأثیر معنی‌داری در رشد، محتوی کلروفیل و تبادل گازی برگ‌های گیاه نداشت، اما تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو دی‌اکسید سریم باعث کاهش ۳۱/۶ درصدی عملکرد نسبت به شاهد شد. همچنین، کاربرد نانو ذرات نقره تا غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش ترکیبات اسانس و محتوی آلفا ترپینیل استات و کاهش میزان تیمول در گیاه آویشن کوهی شد [۱۷]. گزارش شده است که در مرزه‌ی خوزستانی محتوی فلاونوئید، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با قرار گرفتن در معرض سطوح کم نانو لوله‌های کربنی چند دیواره افزایش

یافت [۱۸]. مطالعات نشان می‌دهد که برخی نانو ذرات می‌توانند پتانسیل گیاه را برای جذب آب و مواد غذایی افزایش داده و موجب توسعه کارایی سیستم ریشه و فعالیت نیترات ردوکتاز شده و تجزیه مواد آلی را برای آمینو اسیدهای ضروری تسریع بخشند [۱۹]. نانو مواد می‌توانند به عنوان ترکیبات سیگنال برای واکنش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان دارویی عمل کنند اما اساس مکانیسم آنها هنوز به طور کامل مشخص نشده است [۲۰].

با توجه به اهمیت گیاه مریم‌گلی قرمز از نظر دارویی و فراهم بودن شرایط کشت این گیاه در کشور از نظر موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی، مطالعه و تحقیق پیرامون فعالیت‌های فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه تحت تأثیر نانوذرات مهم به نظر می‌رسد. در همین راستا پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر نانواکسید سریم در غلظت‌های مختلف به دو روش محلول‌پاشی برگ‌ی و تغذیه خاکی طی دو مرحله رویشی و زایشی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی مریم‌گلی قرمز انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد گیاهی و تیمارهای آزمایش

این تحقیق شامل یک مطالعه آزمایشگاهی برای بررسی تأثیر نانو اکسید سریم بر شاخص‌های رشد و میزان متابولیت‌های ثانویه مریم‌گلی قرمز در دو روش محلول‌پاشی برگ‌ی و تغذیه خاکی بود که در آزمایشگاه‌ها و گلخانه گروه گیاهان دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه اراک انجام گرفت.

بذر این گیاه از شرکت فارماست کشور آلمان (<https://www.pharmasaat.de>) توسط آقای دکتر هادیان (پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران) تهیه شد. به منظور آماده‌سازی بذرها، ابتدا با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس با آب مقطر به طور کامل شستشو و

در گلدان کشت شدند. در هر گلدان (با قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متر) ابتدا ۶ بذر کشت شد. در طول دوره رشد مراقبت‌های لازم از قبیل آبیاری و سایر عملیات داشت به صورت مرتب انجام شد. پس از جوانه‌زنی و سبز شدن بوته‌ها، به تدریج به منظور جلوگیری از ایجاد رقابت بین بوته‌ای، اقدام به تنک کردن بوته‌های اضافی شد. به‌طوری که در هر گلدان در نهایت سه بوته قوی‌تر نگهداری شد. ترکیب خاکی به نسبت ۱:۱:۳ (ماسه، کود دامی، خاک) برای گلدان‌ها استفاده شد. اعمال تیمارها در دو نوبت روزت (مرحله رویشی) و شروع ساقه گل‌دهنده (مرحله زایشی) در نظر گرفته شد. نانواکسید سریم به دو روش محلول‌پاشی برگ‌ی و تغذیه خاکی به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر استفاده شد. گلدان‌های شاهد (کنترل) نیز با حجم مساوی (۲۰ میلی‌لیتر) آب مقطر در هر دو روش آبیاری شدند. محلول‌پاشی ساعات ۸ تا ۹ صبح انجام شد، به طوری که کل گیاه بخصوص سطح تحتانی و فوقانی برگ‌ها و محل جوانه گل‌ها با محلول آغشته شد. جدول آنالیز شیمیایی خاک مورد آزمایش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. آنالیز شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

۲۸/۹	درصد اشباع (SP)
۵/۶	هدایت الکتریکی
۶/۲	اسیدیته کل اشباع
۱۲/۲	درصد مواد خشتی شونده
۲/۳	کربن آلی (درصد)
۱/۱	ازت آلی (درصد)
> ۵۰	فسفر قابل جذب (ppm)
> ۱۰۰۰	پتاسیم قابل جذب (ppm)
۴۲	شن (درصد)
۲۶	سیلت (درصد)
۳۲	رس (درصد)

تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلف نانو ذرات اکسید سریم (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)،

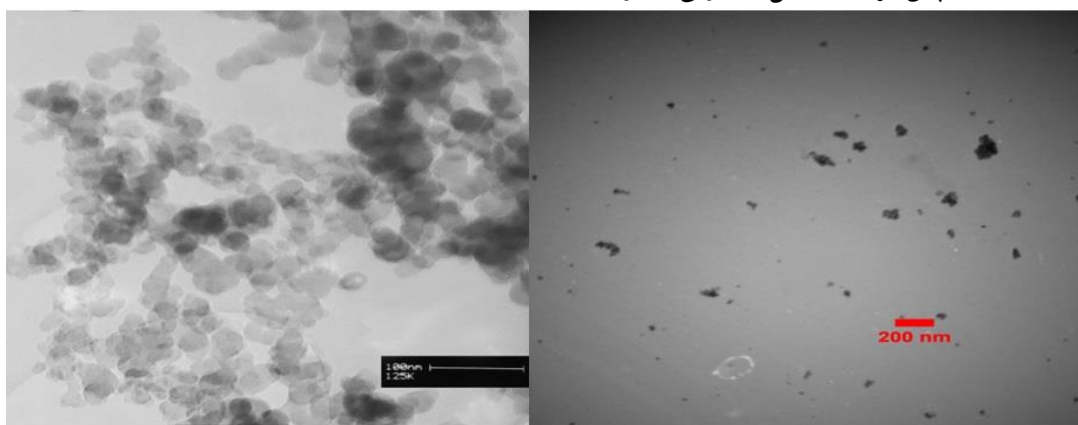
و همگن، به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (با قدرت ۴۰ وات) قرار داده شده و سپس به حجم رسیدند.

جدول ۲. مشخصات نانو سربیم اکساید

CeO ₂	فرمول مولکولی
۹۹/۹۷	خلوص (درصد)
۱۰-۳۰	اندازه (نانومتر)
پودر	شکل ظاهری
زرد روشن	رنگ
۰/۸-۱/۱	چگالی انباشتگی (گرم در سانتی متر مکعب)
۷/۱۳۲	چگالی واقعی (گرم در سانتی متر مکعب)

روش محلول پاشی (برگی و خاکی) در دو مرحله رویشی و زایشی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری و اندازه گیری صفات چهار هفته بعد از اعمال تیمارها انجام شد.

خصوصیات نانو اکسید سربیم استفاده شده در این آزمایش که از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد)، تهیه شد در جدول ۲ و شکل ۱ (الف) و (ب) نشان داده شده است. جهت تهیه غلظت های مورد نیاز از نانو اکسید سربیم، ابتدا نانو ذرات با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسون درآمدند. سپس برای تشکیل محلولی یکنواخت



(ب)

(الف)

شکل ۱. خصوصیات نانو اکسید سربیم (CeO₂): (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM).

۲.۲. تصویربرداری میکروسکوپی (SEM)

از قطع کردن قسمت هوایی از گلدان بیرون آورده شد و ریشه ها ابتدا شسته و سپس وزن تر و خشک، طول و حجم آن اندازه گیری شد. برای اندازه گیری وزن خشک، ریشه های برداشت شده، در شرایط اتاق و در سایه، دما و تهویه مناسب خشک شده و وزن خشک آنها با ترازوی دقیق دیجیتال اندازه گرفته شد. حجم ریشه از روش غوطه ور کردن ریشه در آب مقطر درون استوانه مدرج با حجم یک لیتر اندازه گیری شد. به طوری که اختلاف حجم اولیه آب و حجم آب پس از غوطه ور ساختن ریشه، تعیین کننده حجم ریشه بود [۲۱].

به منظور اطمینان از نفوذ نانو اکسید سربیم به داخل اندام های گیاه، از برگ های انتهایی و ریشه های موین گیاه تحت تیمارهای محلول پاشی برگ و تغذیه خاکی تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه شد (شکل ۲).

۳.۲. اندازه گیری صفات مورفولوژیک

پس از اتمام آزمایش به منظور بررسی اثر تیمارها، صفات رویشی از قبیل وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه (توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه گیری شد. گیاه بعد

۴.۲. اندازه‌گیری رنگی‌های فتوستنتزی

استخراج و سنجش کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای برگ با استفاده از روش آرنون [۲۲] محاسبه شد. بر طبق این روش ۲۰۰ میلی‌گرم برگ تازه از هر تیمار درون هاون چینی توسط ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ساییده شد. عصاره‌ی حاصل ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm قرار داده شد. از محلول رویی به مقدار سه میلی‌لیتر در داخل کووت ریخته شد و مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر برای محتوای کلروفیل a و b و ۴۷۰ نانومتر برای تعیین میزان کاروتنوئیدها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (SPECORD 200 PLUS) خوانده شد. از روابط زیر برای غلظت

کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید استفاده شد:

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

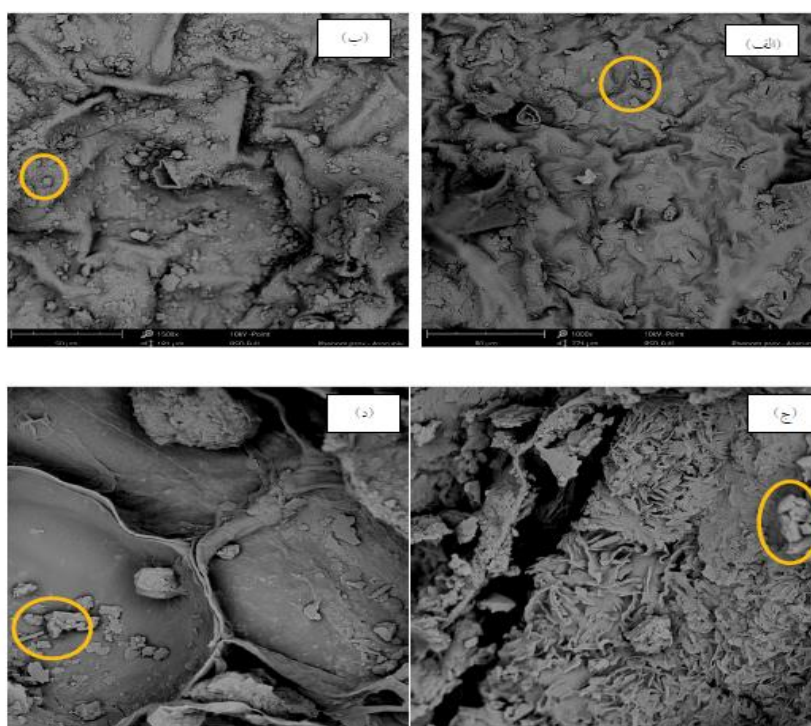
$$b \text{ کلروفیل} = \frac{V}{1000} \times (A_{663/6} - 4/91 A_{646/6}) - 20/31$$

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

$$1000 \times \frac{V}{198} \times [(a \text{ کلروفیل}) - 104(b \text{ کلروفیل}) - 3/27]$$

$$(A_{470}) = \text{کاروتنوئید}$$

در روابط فوق A طول موج جذب اسپکتروفتومتر است، که در آن A_{۶۶۳}، A_{۶۴۶} و A_{۴۷۰} به ترتیب مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگی‌های فتوستنتزی بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح برگ در تیمار تغذیه خاکی (الف) و محلول پاشی برگ (ب) با ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی. تصویر SEM از سطح ریشه در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ (ج) و ۲۵۰ (د) میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله رویشی. نفوذ و تجمع نانوذرات در بافت‌های ریشه و برگ توسط دواير نارنجی رنگ مشخص شده است.

۵.۲. تهیه عصاره الکلی

مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی استاندارد اسید گالیک با قرار دادن مقدار جذب نمونه‌ها در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فنل تام موجود در عصاره محاسبه شد. در نهایت داده‌ها بر حسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک بیان شد [۲۴].

۷.۲. اندازه‌گیری فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید تام از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد اندازه‌گیری عصاره بیان شد. در این روش مقدار دو میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های رقیق شده متانولی (۱:۵) با دو میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم دو درصد داخل لوله آزمایش تیره ترکیب شدند بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد [۲۵].

$$Y = 0.0217x + 0.0658$$

$$R^2 = 0.998$$

۸.۲. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DDPH

برای انجام آزمایش محلول چهار درصد رادیکال پایدار DPPH تهیه شد و ۲۸۰۰ میکرولیتر از این محلول با ۲۰۰ میکرولیتر (حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر) عصاره را در لوله‌های آزمایش تیره ترکیب شد و جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۲۶].

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

در این فرمول AC جذب شاهد و AS بیانگر جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره گیاه می‌باشد.

برای تهیه عصاره‌ی متانولی، ۲۰۰ میلی‌گرم پودر گیاه خشک را در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به عنوان حلال اضافه نموده و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت توسط شیکر هم‌زده شد. سپس به منظور جدا نمودن عصاره‌ی خالص به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، عصاره‌ی رویی در شیشه‌های تیره رنگ، غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۳].

۶.۲. اندازه‌گیری فنل کل

جهت اندازه‌گیری فنل کل از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. این روش از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنلی می‌باشد. اساس کار در این روش، احیا معرف فولین توسط ترکیبات فنلی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۵ نانومتر نشان می‌دهد. برای انجام این آزمایش به ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره رقیق شده (۱:۲) دو میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (۱:۱۰) اضافه شد، پس از ۵ دقیقه، ۱/۶ میلی‌لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. بعد از نیم ساعت مقدار جذب مخلوط در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت.

$$Y = 0.0094x + 0.0183$$

$$R^2 = 0.995$$

برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، محلول پایه به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس از این محلول پایه، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف تهیه شد. سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میکروگرم بر لیتر) آماده شد و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده در بالا

۹.۲. اندازه‌گیری اسید رزمارینیک

در این تحقیق از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل ۱۱۰۰ اجیلنت، مجهز به پمپ گرادیان چهار حلالی، با دکتور فوتودیوداری، ستون C18، ۳۰ سانتی متری استفاده شد. برای کمی سازی رزمارینیک اسید در نمونه‌ها، ابتدا محلول استوک ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از رزمارینیک اسید در حلال استونیتریل تهیه شد. پنج غلظت متفاوت ۱، ۶، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی گرم بر لیتر از رقیق سازی محلول استوک تهیه شد و با تزریق ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC زمان بازداری و سطح زیر پیک آنها مشخص شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از داده‌های به دست آمده، رسم شد و معادله کالیبراسیون ($Y = 92.24 X \times 1154.1$) با ضریب همبستگی ۰/۹۹۰۳ به دست آمد. بعد از رسم منحنی کالیبراسیون، نمونه‌های ریشه در هاون پودر و یکنواخت شد. برای تهیه عصاره از نمونه‌ها، حدود ۰/۱ گرم از ریشه توزین و به لوله آزمایش منتقل شد. ۲ میلی لیتر از آبی که حاوی ۱ درصد اسید استیک بود به آن افزوده شد و پس از همزنی کامل به دستگاه اولتراسونیک منتقل شد تا تحت امواج مافوق صوت قرار گیرد و تماس حلال استخراج کننده با نمونه کامل شود. سپس نمونه سانتریفیوژ شده و از فاز بالایی و شفاف بعد از گذراندن از فیلتر به دستگاه HPLC تزریق شد. سطح زیر پیک کروماتوگرام‌های نمونه‌های ریشه محاسبه شده و در معادله کالیبراسیون قرار گرفت و غلظت رزمارینیک اسید در نمونه های ریشه بر حسب (mg/g DW) محاسبه شد [۲۷].

۱۰.۲. اندازه‌گیری تانیشینون ریشه

برای تعیین میزان تانیشینون ریشه از روش HPLC استفاده شد، نمونه‌ها پس از خشک شدن به صورت کامل پودر شده و توسط سوکسله و حلال‌های آب و متانول در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری شدند. برای

مشخص شدن میزان تانیشینون نمونه‌ها از ستون ۴/۶×۲۵۰ میلی متر و نوار فیلم هفت میلی متری استفاده شد، دوره ثابت شامل متانول ۹۹ درصد و آب به همراه تری فلورواستیک اسید دو درصد با سرعت یک میلی متر در دقیقه، تزریق یک به ده و تشخیص UV ۲۵۴ نانومتر در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد دوره متحرک شامل استونیتریل و آب به نسبت ۵۵ به ۴۵ و فلورواستیک اسید یک درصد با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه، حجم تزریق یک به ده و تشخیص UV ۲۹۲/۵ نانومتر انجام شد [۲۸].

۱۱.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به هر صفت بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت. جهت مقایسه میانگین بین تیمارها از نرم افزار MSTAT-C و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

۳. نتایج

شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سطح برگ در تیمار تغذیه خاکی (الف) و محلول پاشی برگی (ب) با ۲۵۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی را نشان می‌دهد. همچنین، تصویر SEM از سطح ریشه در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ (ج) و ۲۵۰ (د) میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله رویشی نشان داده شده است (شکل ۲). با توجه به تصاویر SEM، تأیید می‌شود که نانو اکسید سریم جذب ریشه و به اندام‌های فوقانی گیاه منتقل شده است. همچنین، تصاویر نشان می‌دهد که نانو اکسید سریم در سلول‌های اطراف روزه‌ها نیز حضور دارد. می‌توان از این مشاهدات نتیجه گرفت که نانو اکسید سریم در گیاه مریم‌گلی قرمز از مسیر آوندها جابجا شده است. همچنین، در این تصاویر (ج) نانو اکسید

سریم در غلظت‌های بالاتر به صورت تجمع یافته مشاهده می‌شود که این می‌تواند به دلیل کلوخه‌ای شدن (aggregate) نانوذرات در تماس با سلول‌های گیاهی باشد [۱۲].

۱.۳. صفات مورفولوژیکی

در تمامی صفات مورد مطالعه، یک اثر متقابل سه گانه معنی‌دار ($P < 0.01$) بین غلظت‌های مختلف نانو اکسید سریم، نوع محلول‌پاشی و مرحله رشد گیاه مشاهده شد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌های مورفولوژی (جدول ۴) نشان داد که بیشترین میزان وزن تر اندام هوایی (۱۱۴/۶۶ گرم) در تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی نانو اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در مرحله زایشی به دست آمد که نسبت به شاهد مورد نظر، ۱۷/۰۵ درصد افزایش داشت، اما کمترین مقدار این صفت (۴۱/۲۹ گرم) در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد ۳۵/۳۹ درصد کاهش داشت. همچنین، بیشترین وزن خشک اندام هوایی مریم‌گلی قرمز (۳۸/۰۹ گرم) در تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله زایشی مشاهده شد، اما کمترین وزن خشک بوته (۱۰/۳۶ گرم) در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله رشدی رویشی مشاهده شد (جدول ۴). بیشترین مقدار نسبت وزن تر به خشک اندام هوایی (۴/۴۲) در تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی نانو اکسید سریم در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و مرحله رویشی به دست آمد، در حالی که کمترین مقدار این نسبت با میانگین ۲/۹۴ در تیمار تغذیه خاکی با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله زایشی مشاهده شد. همان گونه که در جدول مقایسه میانگین داده‌های مورفولوژیکی مشاهده می‌شود (جدول ۴)

بیشترین وزن تر ریشه (۱۰۵/۸۴ گرم) در تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی نانو اکسید سریم در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در مرحله رویشی حاصل شد، در حالی که کمترین میزان وزن تر ریشه (۲۴/۷۷ گرم) در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله زایشی حاصل شد (جدول ۴).

طبق جدول مقایسه میانگین داده‌های مورفولوژیکی (جدول ۴) بیشترین مقدار وزن خشک ریشه (۲۳/۱۷ گرم) در تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی نانو اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و در مرحله رویشی حاصل شد، در حالی که کمترین مقدار وزن خشک ریشه (۵/۲۴ گرم) در شاهد و در مرحله زایشی حاصل شد. بیشترین و کمترین میزان نسبت وزن تر به خشک ریشه به ترتیب با میانگین ۶/۳۵ و ۴/۰۹ در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله رویشی و زایشی مشاهده شد.

همچنین، بیشترین مقدار حجم ریشه (۱۰۲ سانتی‌متر مکعب) مربوط به تیمار محلول‌پاشی نانو اکسید سریم با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مرحله رویشی می‌باشد، اما حداقل حجم ریشه مربوط به تیمار محلول‌پاشی برگ‌ی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی به میزان ۳۴/۳۳ سانتی‌متر مکعب بود (جدول ۴).

در مرحله رویشی بالاترین میانگین طول ریشه (۶۹/۸۲ سانتی‌متر) در تیمارهای تغذیه خاکی مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم است که نسبت به شاهد ۷۱/۹۳ درصد افزایش داشت. لیکن، در مرحله زایشی بالاترین میانگین طول ریشه (۶۶/۴۸) در تیمارهای محلول‌پاشی برگ‌ی مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم است که نسبت به شاهد ۶۸/۷۷ درصد افزایش داشت.

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیتی گیاه مریم گلی قرمز در تیمارهای مختلف

میانگین مربعات									
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	نسبت وزن تر به خشک	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	نسبت وزن تر به خشک ریشه	حجم ریشه	طول ریشه
نانو اکسید سریم (N)	۳	۱۱۲۱/۷۱**	۲۲۵۵/۱۴**	۱۲۲۶/۵**	۱۱۹۸/۴**	۲۹۸/۱۲*	۴۸۱۳۰/۱**	۳۱۴۱/۱۴**	۲۳۰۹/۴۱**
دوره رشد (D)	۱	۱۱۴۳۸/۶۹**	۱۳۴۲/۴**	۴۶۳/۱*	۱۴۲۳/۵**	۱۷۶/۲۲*	۴۵۹۴/۲**	۴۲۶/۱۵**	۱۵۱۲/۵۲**
نوع محلول پاشی (S)	۱	۱۰۲۴۳/۴۶*	۱۴۳۸/۵**	۶۶۲/۳*	۵۲/۸۸ ^{ns}	۲۰۵/۱۵*	۷۵۴۲/۵**	۲۰۳/۳۴*	۲۱۱/۷۳*
N × D	۳	۴۱/۶۲ ^{ns}	۲۰۱/۱ ^{ns}	۱۲۴۲/۴**	۲۱/۴۷ ^{ns}	۲۲/۷۱ ^{ns}	۱۱۳۲۴/۱**	۸۶۱/۲۵**	۲۰۳/۳۸*
N × S	۳	۳/۱۸ ^{ns}	۱۸/۱ ^{ns}	۱۸/۶ ^{ns}	۴۶/۱۶ ^{ns}	۴۶/۱۷ ^{ns}	۳۸۲۷/۷**	۴۲/۳۵ ^{ns}	۱۶۲/۵۱*
D × S	۱	۱۵/۲۳ ^{ns}	۱۵/۳ ^{ns}	۲۱/۶ ^{ns}	*۱۰۶/۴	۱۶/۸۴ ^{ns}	۸۲۳۶/۴**	۱۰۰۴/۲۱**	۱۸۹/۴۴*
N × D × S	۳	۱۱۴۹/۶۳**	۳۵۵۶/۲**	۲۱۲۸/۹**	۱۱۶۱/۵**	۲۴۱/۲۵**	۱۳۴۳۷/۲**	۱۳۲۶/۲۴**	۹۴۳/۱۸**
خطای آزمایش	۳۲	۲۷/۴۶	۴/۰۷	۱/۳۸۱	۳۵/۷۸	۱۳/۵۶	۱/۴۲۹	۲۸/۳۵	۳۱/۲۴
ضریب تغییرات		۷/۰۲	۸/۷۴	۳۴/۹	۱۰/۸۳	۳۳/۷۸	۲۲/۸۱	۸/۸۵	۱۰/۴۶

*، ** و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی داری.

جدول ۴. نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی گیاه مریم گلی قرمز در تیمارهای آزمایش

دوره رشد	نحوه کاربرد	نانو اکسید سریم (mg/L)	وزن تر اندام هوایی (g)	وزن خشک اندام هوایی (g)	نسبت وزن تر به خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)	نسبت وزن تر به خشک ریشه	حجم ریشه (cm ³)	طول ریشه (cm)
برگی	رویشی	۰	۶۸/۹۴ ^{fg}	۱۸/۸۳ ^f	۳/۶۹ ^{bc}	۵۷/۲۵ ^{cd}	۱۰/۰۰ ^{def}	۵/۹۵ ^{abc}	۵۵/۳۳ ^{def}	۴۲/۴۸ ^{gh}
		۲۵۰	۸۰/۷۰ ^{de}	۲۲/۹۷ ^{de}	۳/۵۲ ^{bcd}	۱۰۵/۸۴ ^a	۲۳/۱۷ ^a	۴/۶۰ ^{bcd}	۱۰۲/۰۰ ^a	۵۳/۹۲ ^{def}
		۵۰۰	۵۸/۷۲ ^h	۱۶/۵۸ ^f	۳/۵۵ ^{bcd}	۸۷/۷۷ ^b	۱۵/۸۱ ^{bc}	۵/۶۱ ^{abcd}	۶۶/۰۰ ^{cd}	۶۰/۲۳ ^{bcd}
		۱۰۰۰	۴۸/۲۴ ⁱ	۱۱/۰۵ ^g	۴/۴۲ ^a	۶۰/۹۹ ^{cd}	۱۱/۹۵ ^{de}	۵/۱۴ ^{abcd}	۵۸/۳۳ ^{def}	۶۶/۸۴ ^{ab}
خاکی	رویشی	۰	۶۳/۹۰ ^{gh}	۱۷/۹۹ ^f	۳/۵۹ ^{bcd}	۵۳/۶۸ ^{de}	۸/۸۷ ^{efg}	۶/۲۳ ^{ab}	۵۲/۳۳ ^{defg}	۴۰/۶۱ ^{gh}
		۲۵۰	۶۷/۰۲ ^{gh}	۱۹/۹۵ ^{ef}	۳/۳۵ ^{bcd}	۸۱/۲۹ ^b	۱۸/۳۵ ^b	۴/۴۷ ^{cd}	۸۵/۶۶ ^b	۴۸/۰۶ ^{fg}
		۵۰۰	۴۴/۳۳ ⁱ	۱۲/۰۹ ^g	۳/۷۰ ^{bc}	۶۵/۸۳ ^c	۱۱/۹۴ ^{de}	۵/۵۰ ^{abcd}	۷۴/۳۳ ^{bc}	۵۷/۳۰ ^{cde}
		۱۰۰۰	۴۱/۲۹ ⁱ	۱۰/۳۶ ^g	۴/۰۱ ^{ab}	۵۵/۸۴ ^{cd}	۹/۱۱ ^{efg}	۶/۳۵ ^a	۶۱/۰۰ ^{cde}	۶۹/۸۲ ^a
برگی	زایشی	۰	۹۷/۴۸ ^b	۳۲/۳۱ ^b	۳/۰۱ ^d	۳۲/۰۶ ^{gh}	۶/۱۱ ^{gh}	۵/۲۴ ^{abcd}	۴۶/۰۰ ^{fgh}	۳۹/۶۰ ^h
		۲۵۰	۱۱۴/۶۶ ^a	۳۸/۰۹ ^a	۳/۰۱ ^d	۶۶/۹۶ ^c	۱۳/۲۵ ^{cd}	۵/۰۸ ^{abcd}	۸۶/۱۳ ^b	۵۱/۳۶ ^{ef}
		۵۰۰	۸۷/۳۶ ^{cd}	۲۹/۳۹ ^{bc}	۲/۹۷ ^d	۵۷/۰۰ ^{cd}	۱۰/۳۱ ^{def}	۵/۵۸ ^{abcd}	۳۹/۶۶ ^{gh}	۵۴/۵۶ ^{def}
		۱۰۰۰	۷۸/۹۸ ^{de}	۲۶/۳۰ ^{cd}	۳/۰۰ ^d	۳۳/۱۳ ^{gh}	۶/۵۲ ^{gh}	۵/۱۲ ^{abcd}	۳۴/۳۳ ^h	۶۶/۸۴ ^{ab}
خاکی	زایشی	۰	۹۲/۳۱ ^{bc}	۲۹/۹۵ ^b	۳/۰۹ ^{cd}	۲۷/۴۵ ^{gh}	۵/۲۴ ^h	۵/۲۷ ^{abcd}	۴۷/۳۳ ^{efgh}	۴۰/۱۱ ^{gh}
		۲۵۰	۹۹/۰۷ ^b	۳۲/۶۴ ^b	۳/۰۴ ^{cd}	۴۴/۱۴ ^{ef}	۱۰/۹۸ ^{de}	۴/۰۹ ^d	۷۳/۶۶ ^{bc}	۴۶/۳۸ ^{fgh}
		۵۰۰	۷۷/۲۰ ^{ef}	۲۶/۳۱ ^{cd}	۲/۹۴ ^d	۳۷/۵۸ ^{fg}	۷/۳۶ ^{fgh}	۵/۱۲ ^{abcd}	۴۵/۰۰ ^{fgh}	۵۲/۹۷ ^{def}
		۱۰۰۰	۷۳/۰۶ ^{efg}	۲۴/۴۹ ^d	۲/۹۸ ^d	۲۴/۷۷ ^h	۵/۴۷ ^h	۴/۵۷ ^{bcd}	۳۵/۰۰ ^h	۶۳/۸۸ ^{abc}

در هر ستون میانگین‌ها با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی دار نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < ۰/۰۵$ ، آزمون چند دامنه‌ای دانکن)

۲.۳. صفات فیزیولوژیکی

طبق نتایج جدول مقایسه میانگین داده‌های فیزیولوژیکی (جدول ۵) بیشترین مقدار کلروفیل a با میانگین ۶۱۹/۸۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر مربوط به تیمار تغذیه خاکی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی بود. کمترین مقدار این صفت با میانگین ۲۱۷/۶۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر مربوط به شاهد (محلول‌پاشی برگ با آب مقطر) در مرحله رویشی می‌باشد (جدول ۵). همچنین، بیشترین مقدار کلروفیل b با میانگین ۲۳۴/۴۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمار تغذیه خاکی با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی مشاهده شد. در حالی که، کمترین مقدار کلروفیل b با میانگین ۱۱۸/۰۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر مربوط به شاهد برگی در مرحله زایشی بود. بیشترین محتوی کاروتنوئید با میانگین ۱۹۷/۱۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمار محلول‌پاشی برگی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی مشاهده شد (به عبارت دیگر افزایش ۴۴/۱۶ درصدی نسبت به شاهد مورد نظر). کمترین مقدار این صفت با میانگین ۶۷/۴۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر مربوط به شاهد (محلول‌پاشی خاک با آب مقطر) در مرحله رویشی بود.

۳.۳. صفات فیتوشیمیایی

مقایسه میانگین داده‌های صفات فیتوشیمیایی در تیمارهای مختلف آزمایش در جدول ۶ نشان داده شده است. همان‌طوری که ملاحظه می‌شود بیشترین مقدار فنول (۳۴/۳۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در تیمار محلول‌پاشی برگی نانو اکسید سریم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در مرحله زایشی حاصل شد که افزایش ۲۷/۲ درصدی نسبت به شاهد مورد نظر داشت، در حالی که کمترین مقدار فنول (۱۱/۶۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در شاهد (محلول‌پاشی برگی با آب مقطر) و در مرحله

رویشی حاصل شد (جدول ۶). به طور کلی، میانگین محتوی فنول در تیمارهای مرحله زایشی (۲۹/۱۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) نسبت به میانگین این صفت در تیمارهای مرحله رویشی (۱۸/۷۷ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، در حدود ۵۵/۰۹ درصد افزایش نشان داد.

مطابق جدول ۶، بیشترین مقدار فلاونوئید (۷۷/۶۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در تیمار محلول‌پاشی برگی با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی مشاهده شد که افزایش ۵۴/۶ درصدی نسبت به شاهد مورد نظر داشت. در حالی که کمترین محتوی فلاونوئید برگ (۲۴/۰۹ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مربوط به شاهد (محلول‌پاشی برگی با آب مقطر) در مرحله رویشی بود (جدول ۶). میانگین مقدار فلاونوئید در تیمارهای مربوط به مرحله زایشی (۶۰/۱۵۱ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) نسبت به میانگین آن در تیمارهای مرحله رویشی (۵۰/۰۲۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، در حدود ۲۰/۲۴ درصد افزایش داشت.

طبق جدول مقایسه میانگین صفات فیتوشیمیایی (جدول ۶) بیشترین مقدار فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی (۶۷/۱۴ درصد) در تیمار محلول‌پاشی برگی با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله زایشی حاصل شد که افزایش ۴۱/۸ درصدی نسبت به شاهد مورد نظر داشت، در حالی که کمترین مقدار آن (۳۲/۰۷ درصد) در شاهد برگی و در مرحله رویشی حاصل شد.

نتایج حاصل از تعیین محتوی اسید رزمارینیک نشان داد که بیشترین مقدار اسید رزمارینیک (۲۳/۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در تیمار تغذیه خاکی نانو اکسید سریم با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مرحله زایشی حاصل شد که نسبت به شاهد مورد نظر ۵۸/۷ درصد افزایش داشت، در حالی که کمترین مقدار اسید رزمارینیک (۶/۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در شاهد تغذیه خاکی و در مرحله رویشی حاصل شد (جدول ۶).

طبق جدول مقایسه میانگین داده‌های صفات فیتوشیمیایی کمترین مقدار تانن‌شون (۲/۶ میلی گرم در گرم وزن خشک) در (جدول ۶) بیشترین مقدار تانن‌شون ریشه (۷/۷ میلی گرم در گرم وزن خشک) در تیمار تغذیه خاک با ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم و در مرحله زایشی حاصل شد، که ۲۴/۶ درصد نسبت به شاهد مورد نظر افزایش داشت. در حالی که تیمار محلول پاشی برگ با ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سریم در مرحله رویشی حاصل شد (جدول ۶). شکل‌های ۳ و ۴ نمونه‌هایی از کروماتوگرام HPLC مربوط به اسید رزمارینیک و تانن‌شون را در تیمارهای مختلف نشان می‌دهند.

جدول ۵. نتایج مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی مریم‌گلی قرمز در تیمارهای آزمایشی

دوره رشد	نحوه کاربرد	نانو اکسید سریم (mg/L)	کلروفیل a (mg/g FW)	کلروفیل b (mg/g FW)	کلروفیل کل (mg/g FW)	کارتونوئید (mg/g FW)
برگی	رویشی	۰	۲۱۷/۶۳ ^f	۱۲۹/۵۹ ^{cde}	۳۴۷/۲۲ ^f	۶۸/۴۴ ^d
		۲۵۰	۴۱۴/۹۲ ^{cd}	۱۵۶/۸۱ ^{bcd}	۵۷۱/۷۲ ^{cd}	۱۰۷/۷۰ ^{bcd}
		۵۰۰	۳۴۷/۵۵ ^{de}	۱۷۸/۱۹ ^{abcde}	۵۲۵/۷۳ ^{cde}	۹۱/۵۷ ^{bcd}
		۱۰۰۰	۳۱۵/۹۲ ^e	۱۲۷/۴۷ ^{cde}	۴۴۳/۳۹ ^e	۸۹/۷۰ ^{bcd}
	خاکی	۰	۲۲۱/۴۶ ^f	۱۲۳/۲۲ ^{de}	۳۴۴/۶۸ ^f	۶۷/۴۷ ^d
		۲۵۰	۴۱۹/۱۴ ^{cd}	۱۵۵/۹۶ ^{bcd}	۵۷۵/۱۰ ^{cd}	۱۱۱/۰۹ ^{bcd}
		۵۰۰	۳۴۸/۹۳ ^{de}	۱۸۰/۸۳ ^{abcde}	۵۲۹/۷۶ ^{cde}	۹۰/۸۴ ^{bcd}
		۱۰۰۰	۳۱۷/۳۰ ^e	۱۳۰/۱۱ ^{cde}	۴۴۷/۴۲ ^e	۸۸/۹۷ ^{cd}
زایشی	برگی	۰	۴۰۵/۶۹ ^{cd}	۱۱۸/۰۱ ^e	۵۲۳/۷۰ ^{de}	۱۱۰/۱۰ ^{bcd}
		۲۵۰	۶۰۵/۸۷ ^a	۱۹۵/۷۵ ^{abc}	۸۰۱/۶۲ ^{ab}	۱۹۷/۱۸ ^a
		۵۰۰	۴۹۲/۶۱ ^b	۲۲۸/۲۸ ^a	۷۲۰/۸۹ ^b	۱۳۴/۴۸ ^{bc}
		۱۰۰۰	۴۴۰/۴۸ ^{bc}	۱۸۲/۵۸ ^{abcde}	۶۲۲/۸۷ ^c	۱۲۰/۲۱ ^{bcd}
	خاکی	۰	۴۰۹/۶۸ ^{cd}	۱۱۸/۷۹ ^e	۵۲۸/۴۷ ^{cde}	۱۰۷/۲۸ ^{bcd}
		۲۵۰	۶۱۹/۸۳ ^a	۲۰۴/۷۱ ^{ab}	۸۲۴/۵۴ ^a	۱۹۵/۰۲ ^a
		۵۰۰	۴۹۱/۱۵ ^b	۲۳۴/۴۱ ^a	۷۲۵/۵۶ ^b	۱۴۷/۳۲ ^{ab}
		۱۰۰۰	۴۳۲/۳۹ ^{bc}	۱۹۰/۷۸ ^{abcd}	۶۲۳/۱۷ ^c	۱۲۵/۴۳ ^{bcd}

در هر ستون میانگین‌ها با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < 0.05$ ، آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

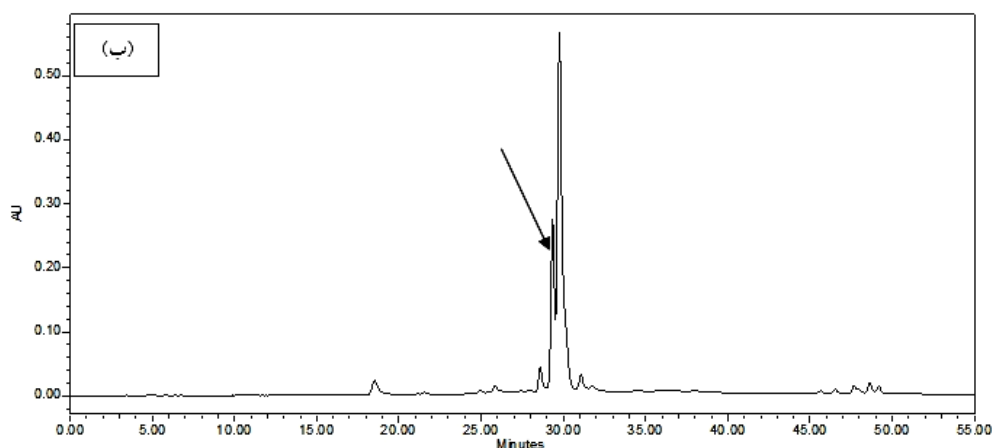
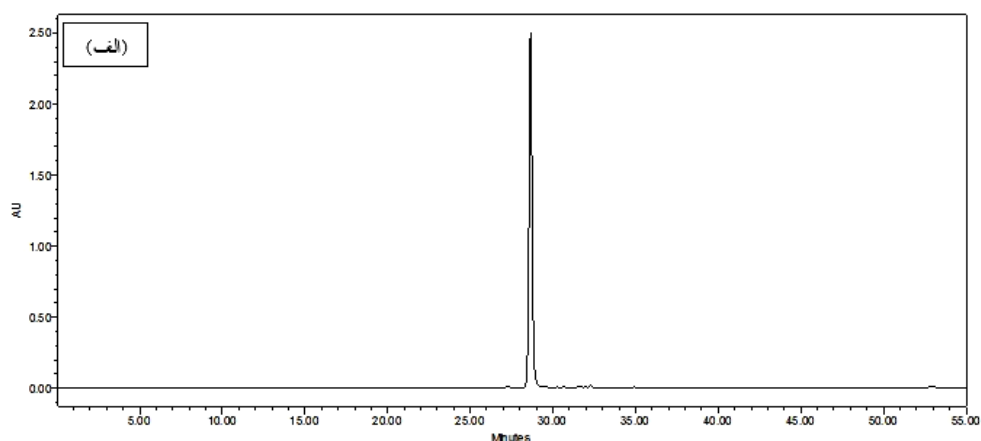
جدول ۶. نتایج مقایسه میانگین صفات فیتوشیمیایی مریم‌گلی قرمز در تیمارهای آزمایشی

دوره رشد	نحوه کاربرد	نانو اکسید سریم (mg/L)	فنل (mg/g DW)	فلاونوئید (mg/g DW)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (درصد)	اسید رزمارینیک (mg/g DW)	تانن‌شون (mg/g DW)
برگی	رویشی	۰	۱۱/۶۷ ^f	۲۴/۰۹ ^e	۳۲/۰۷ ^e	۶/۹ ^c	۲/۹ ^{ij}
		۲۵۰	۱۱/۶۷ ^f	۶۱/۹۳ ^{abc}	۴۹/۶۷ ^{abcd}	۹/۴ ^c	۳/۲ ^{hi}
		۵۰۰	۳۰/۲۲ ^{abc}	۶۸/۶۰ ^{ab}	۶۰/۶۱ ^{ab}	۸/۵ ^c	۲/۸ ^{ij}
		۱۰۰۰	۱۶/۹۵ ^{def}	۴۶/۷۶ ^{cd}	۴۲/۳۸ ^{bcde}	۷/۰ ^c	۲/۶ ^j
	خاکی	۰	۱۲/۰۲ ^f	۲۴/۱۵ ^e	۳۳/۹۰ ^{de}	۶/۳ ^c	۳/۴ ^f
		۲۵۰	۲۲/۴۴ ^{cde}	۶۰/۷۸ ^{abc}	۴۸/۶۷ ^{abcde}	۷/۷ ^c	۳/۹ ^{ghi}
		۵۰۰	۲۸/۷۱ ^{abc}	۶۴/۴۴ ^{abc}	۵۷/۴۵ ^{abc}	۹/۲ ^c	۳/۵ ^{gh}
		۱۰۰۰	۱۶/۵۲ ^{ef}	۴۹/۴۱ ^{bcd}	۴۳/۶۵ ^{bcde}	۶/۹ ^c	۳/۲ ^{hi}

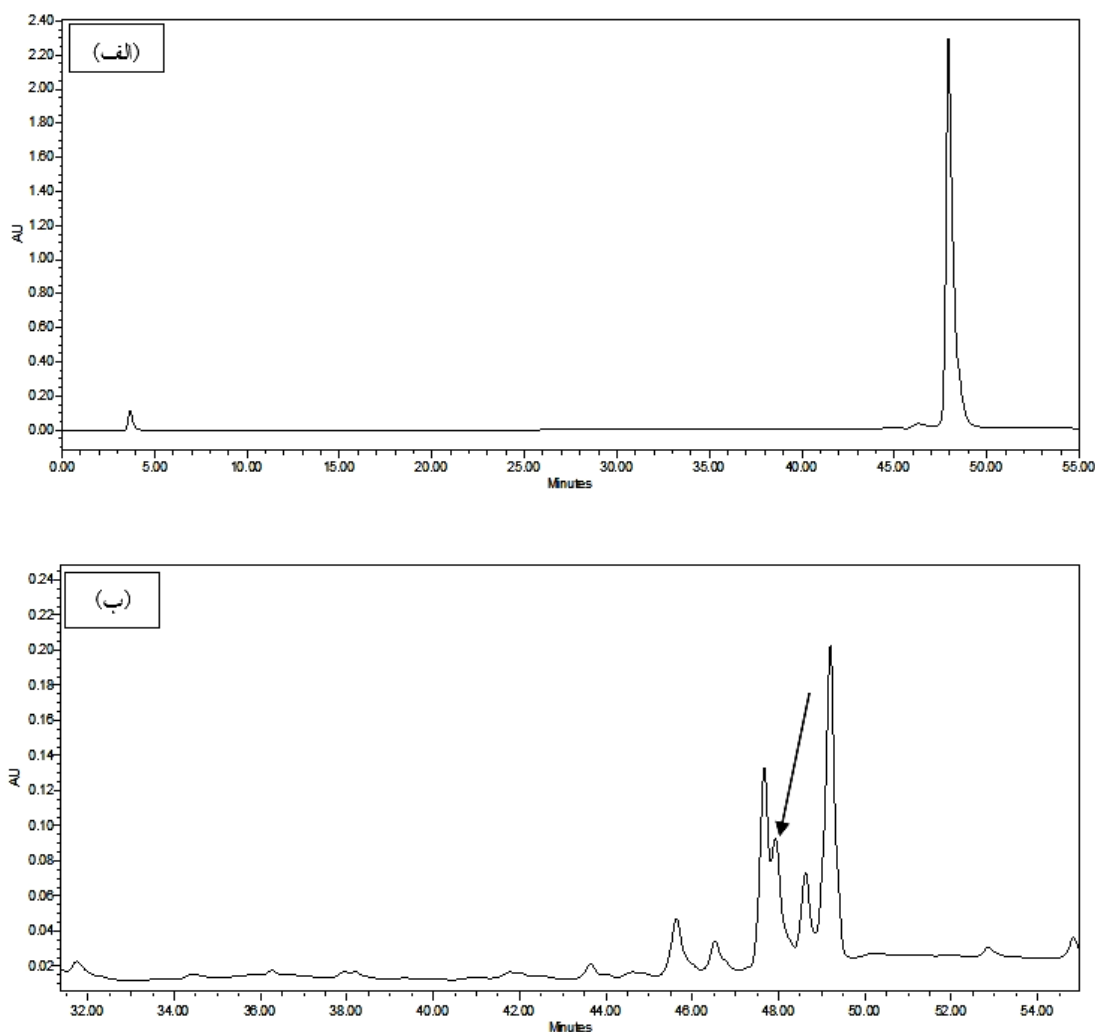
ادامه جدول ۶. نتایج مقایسه میانگین صفات فیتوشیمیایی مریم‌گلی قرمز در تیمارهای آزمایشی

دوره رشد	نحوه کاربرد	نانو اکسید سریم (mg/L)	فلفل (mg/g DW)	فلاونوئید (mg/g DW)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (درصد)	اسید رزمارینیک (mg/g DW)	تانشینون (mg/g DW)
زایشی	برگی	۰	۲۵/۰۱ ^{bcd}	۳۵/۱۸ ^{de}	۳۹/۰۳ ^{cde}	۱۵/۷ ^b	۴/۵ ^{de}
		۲۵۰	۳۰/۱۴ ^{abc}	۷۰/۴۳ ^a	۵۹/۱۷ ^{ab}	۱۹/۲ ^b	۵/۰ ^d
		۵۰۰	۳۴/۳۶ ^a	۷۷/۶۰ ^a	۶۷/۱۴ ^a	۱۷/۰ ^b	۴/۹ ^{de}
		۱۰۰۰	۲۸/۰۴ ^{abc}	۵۹/۰۰ ^{abc}	۵۲/۶۰ ^{abcd}	۱۵/۰ ^b	۴/۴ ^{ef}
خاکی		۰	۲۳/۹۴ ^{cde}	۳۴/۰۵ ^{de}	۳۹/۰۵ ^{cde}	۱۴/۸ ^b	۵/۸ ^c
		۲۵۰	۲۹/۵۰ ^{abc}	۷۰/۳۳ ^a	۵۷/۴۰ ^{abc}	۱۹/۰ ^b	۶/۵ ^b
		۵۰۰	۳۳/۰۴ ^{ab}	۷۱/۶۱ ^a	۶۶/۲۳ ^a	۲۳/۵ ^a	۷/۷ ^a
		۱۰۰۰	۲۸/۹۳ ^{abc}	۶۲/۹۸ ^{abc}	۵۵/۷۵ ^{abc}	۱۷/۰ ^b	۵/۱ ^d

در هر ستون میانگین‌ها با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < ۰/۰۵$). آزمون چند دامنه‌ای دانکن).



شکل ۳. (الف) کروماتوگرام اسید رزمارینیک استاندارد، (ب) کروماتوگرام اسید رزمارینیک ریشه در تیمار محلول پاشی برگی با ۱۰۰۰ ppm نانو اکسید سریم در مرحله رویشی.



شکل ۴. (الف) کروماتوگرام تانشینون استاندارد، (ب) کروماتوگرام تانشینون ریشه در تیمار تغذیه خاکی با ۱۰۰۰ ppm نانو اکسید سریم در مرحله زایشی.

۴. بحث

کنند. با این حال هنوز مکانیسم جذب و انتقال نانوذرات در سلول‌های گیاهان دقیقاً شناخته نشده‌اند [۱۰]. مطالعات قبلی نیز تأیید کرده‌اند که گیاهان می‌توانند ذرات نانو اکسید سریم را جذب کنند و جذب و توزیع آنها در بافت‌های گیاهی بستگی به اندازه، مواد پوششی، شرایط رشد گیاه و گونه گیاهی دارد [۱۰]. در اندازه‌گیری‌های انجام شده در مطالعه حاضر شباهت‌ها و تفاوت‌هایی در نتایج به دست آمده از تأثیر نانو اکسید سریم بر گیاه مریم‌گلی قرمز طی دو روش محلول‌پاشی برگ‌گی و تغذیه خاکی در مقایسه با سایر

نانوذرات می‌توانند از طریق ریشه‌ها و برگ‌هایی که در معرض آنها قرار دارند جذب گیاه شوند (شکل ۲). نانوذراتی که در معرض ریشه قرار می‌گیرند ابتدا وارد اپیدرم و آندودرم ریشه شده و سپس وارد آوند چوبی و از آنجا به بخش‌هایی هوایی گیاه منتقل می‌شوند. در حالی که نانو ذرات در معرض برگ‌ها، برای ورود به سیستم آوندی ابتدا به روزنه‌های برگ نفوذ کرده و از آنجا وارد آوند آبکش و در نهایت به سایر قسمت‌های گیاه انتقال پیدا می‌

تحقیقات انجام شده بر روی گیاهان دیگر وجود داشت. این تناقضات ممکن است ناشی از تفاوت در زمان استفاده، گونه گیاهی و یا روش‌های مختلف کشت و رشد و روش تیمار آنها باشد.

نتایج حاصل از آزمایش محلول‌پاشی برگی با نانو اکسید سربیم در گیاه دارویی مریم‌گلی قرمز نشان داد که استفاده از نانو اکسید سربیم در مرحله رویشی موجب بهبود صفات مورفولوژیکی گیاه از قبیل وزن تر و خشک ریشه و نسبت وزن تر به خشک اندام هوایی شد. استفاده از نانو اکسید سربیم به روش تغذیه خاکی در مرحله رویشی موجب افزایش نسبت وزن تر به خشک ریشه شد. گزارشات محققین نشان می‌دهد که استفاده از نانو ذرات سربیم در مرحله رشد رویشی بیشتر باعث افزایش عملکرد گوجه‌فرنگی می‌شود [۲۹]. تیمار گیاه سویا با نانو اکسید سربیم (۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و نانوذرات روی (۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) به طور کلی غلاف و زیست توده گیاه را افزایش داد. گیاه در معرض مقادیر مختلف نانو ذرات الگوی رشد رویشی مختلفی را نشان می‌دهد [۳۰]. گیاهان گشنیز تحت تیمار با نانو اکسید سربیم (قطر ۸ نانومتر) یک افزایش کلی در رشد را نشان دادند، به طوری که در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم باعث افزایش شاخصاره، طول ریشه و عملکرد زیست توده شد [۳۱]. در یک مطالعه، Pagano و همکاران [۳۲]، مکانیسم‌های مولکولی پاسخ گیاهان به نانو اکسید سربیم را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که کلرپلاست در گوجه‌فرنگی و کدو سبز نقش مهمی در پاسخ گیاه به نانو اکسید سربیم دارد. مطالعه‌ای که توسط Rico و همکاران در مورد جذب و انباشت نانو ذرات اکسید سربیم در بخش‌های مختلف گیاه جو انجام شد نشان داد که نانو ذرات اکسید سربیم باعث افزایش رشد ریشه و عملکرد جو شده است، به طوری که غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو

اکسید سربیم در خاک باعث افزایش قابل توجهی در زیست توده شد [۳۳]. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده کردند که غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سربیم افزایش معنی‌داری در زیست توده گیاه سویا شد، در حالی که غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر آن باعث کاهش رشد شده است [۳۴]. همچنین، در آزمایشی دیگر غلظت بسیار بالاتری از نانو اکسید سربیم (محدوده ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش تولید طول ریشه و زیست توده در ذرت و خیار شد [۳۵]. در مطالعه‌ای که بر روی چهار گیاه یونجه، خیار، گوجه‌فرنگی و ذرت انجام شد غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید سربیم هیچ تأثیر منفی بر روی گیاهان مورد مطالعه نداشت، تقریباً در تمام غلظت‌ها نانو اکسید سربیم باعث افزایش طول ساقه در گونه‌های مورد مطالعه شد [۳۵]. مشخص شد که غلظت کم نانو سربیم در گیاه ذرت اثرات مفیدی بر افزایش طول ریشه و وزن خشک داشت [۳۶]. نتایج تحقیقات ذکر شده با نتایج آزمایش ما مبنی بر اینکه تأثیر تیمار نانوذرات بر گیاه وابسته به غلظت است مطابقت دارد. در تحقیق حاضر نانو اکسید سربیم با غلظت کم باعث افزایش عملکرد ریشه مریم‌گلی قرمز شد ولی از غلظت بیشتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش مقدار این صفت شد. نشان داده شده است که تأثیر نانو ذرات بستگی به ترکیب، غلظت، اندازه، خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و نیز بستگی به گونه‌های گیاهی مورد آزمایش، مرحله رشدی گیاه، روش و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن دارد [۱۰].

نانو ذرات باعث افزایش جذب آب و بهبود رشد گیاه از طریق افزایش متابولیسم نیتروژن و کارایی فتوسنتز می‌شوند. اما دلایل اثرات مفید سربیم بر فتوسنتز هنوز ناشناخته است. محققین افزایش فتوسنتز، بویژه فعالیت فتوشیمیایی فتوسیستم II، محتوی کلروفیل و رشد در اسفناج را پس از تیمار پرایمنگ بذر (قبل از جوانه‌زنی) با محلول اکسید

است، اما مطالعات قبلی نشان داد که آنها می‌توانند هر دو ویژگی آنتی‌اکسیدان و القاء کننده تنش اکسیداتیو را بسته به اندازه، خواص سطح (مانند سطح شارژ)، مدت زمان در معرض بودن و سن گیاه داشته باشند [۱۰]. علاوه بر این، عناصر کمیاب و ریز مغذی (از قبیل سریم) سبب افزایش بیوستز متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، ایزوفلاون‌ها و گلیکوزیدهای بنزیل اتانول در سلول‌های گیاهان دارویی می‌شوند [۴۵].

ریشه مریم‌گلی قرمز شامل دو دسته اصلی از ترکیبات زیست فعال است که یک گروه چربی دوست (شامل تانیشون‌های دی‌ترپنوئید و مشتقات کونین) و گروه دیگر آب دوست (اسیدهای فنلی مانند اسید رزمارینیک) است. هر دو دسته از ترکیبات ریشه مریم‌گلی قرمز فعالیت‌های قابل توجهی را که مربوط به اثرات درمانی گیاه است نشان داده‌اند [۴۶]. طبق مطالعات محققان اسیدسالیونولیک جزء مشترکی از اندام هوایی و زمینی گیاه مریم‌گلی قرمز بوده و غلظت آن در مراحل مختلف رشد متفاوت است. این نشان می‌دهد که اسیدهای سالیونولیک ممکن است در برگ‌ها تولید شوند سپس از طریق ساقه به ریشه‌ها انتقال یابند. همچنین ممکن است در هر دو بخش هوایی و زیرزمینی تولید و سپس منتقل شود. به طور کلی محتوی اسیدسالیونولیک در بخش‌های مختلف مریم‌گلی قرمز عبارت از: ساقه > گل > برگ > ریشه و محتوی فلاونوئید: ساقه > گل > برگ و محتوی ترپن‌ها: برگ > ساقه > گلبرگ [۴۷]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که روند تغییر سالیونولیک اسید در ریشه‌های مریم‌گلی قرمز در بالاترین میزان خود ۶/۵۹ درصد در مرحله روزت (ماه آوریل) و دوره به ساقه رفتن (ژوئن تا اوت) به بالاترین سطح خود رسیده است. بر اساس گزارش این محققین مقدار سالیونولیک اسید و تانیشون‌ها در مرحله رویشی گیاه زیاد است. در نتیجه زمان بهینه برداشت ریشه‌های مریم‌گلی قرمز

سریم و پس از جوانه‌زنی از طریق محلول پاشی برگی روی گیاه نشان دادند [۳۷، ۳۸]. اثرات مفید مشابه بر فتوستتیز نیز در سریم با غلظت ۵، ۱۰ و ۳۰ میکرومولار گزارش شده است [۳۹]. چن و همکاران این اثرات را به یک جایگزینی احتمالی منیزیم (Mg) توسط سریم (Ce) در مکان‌های کوآنزیم اختصاص دادند [۴۰]. اثرات منفی بر فتوستتیز پس از محلول پاشی سریم در غلظت‌های بالا مشاهده شده است. در گیاه گوجه‌فرنگی تولید کلروفیل تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانو اکسید سریم قرار نمی‌گیرد [۳۶]. پاگانا و همکاران مکانیسم‌های مولکولی برای پاسخ گیاهان به نانو اکسید سریم را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که کلروپلاست گیاه در گوجه فرنگی و کدو سبز نقش مهمی در پاسخ گیاه به نانو اکسید سریم دارد [۳۲]. محتوای کلروفیل یک پارامتر حساس در شرایط تنش فلزات است. غلظت‌های بالای سریم (۸۹/۲۰۶ و ۴۴۶/۰۳۰ میکرومول) باعث کاهش محتوی کلروفیل (a، b و کل) بیشتر از شاهد می‌شود که می‌تواند به دلیل تأثیر بر آنزیم‌های دخیل در تخریب کلروفیل مانند کلروفیل‌از باشد [۴۱]. از جمله مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان تحت تنش، افزایش سطوح ترکیبات فنلی است، چرا که این ترکیبات به عنوان پالاینده‌های گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن عمل کرده و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی و مانع پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند [۴۲، ۴۳]. در آزمایش حاضر گیاهان تحت تیمار نانو اکسید سریم فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نسبت به شاهد نشان دادند که این می‌تواند به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی عنصر سریم باشد. گزارش‌های متناقض در مورد نقش نانو اکسید سریم به عنوان یک القا کننده تنش اکسیداتیو یا آنتی‌اکسیدان وجود دارد که قادر به تخریب رادیکال‌های آزاد و محافظت از سلول‌ها از آسیب اکسیداتیو می‌باشد [۴۴]. با وجودی که خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانو اکسید سریم به طور کامل مشخص نشده

سریم هم می‌توان اظهار کرد که روش محلول‌پاشی برگ‌گی در مقایسه با کاربرد این ذرات در خاک تأثیر بیشتری بر گیاه مریم‌گلی قرمز گذاشته است. همچنین، قابل ذکر است که کاربرد نانو اکسید سریم در دوره زایشی نسبت به دوره رویشی نقش فزاینده‌ای در افزایش مقدار اکثر صفات مورد بررسی در این تحقیق داشت. بنابراین، با توجه به جدید بودن فناوری نانو و روند رو به رشد تحقیقات گسترده در زمینه استفاده از نانومواد برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان و به طور کلی دستیابی به محصولات کشاورزی با کیفیت، می‌توان به آینده استفاده از این فناوری در کشاورزی و به‌ویژه در زمینه گیاهان دارویی امیدوار بود.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: اجرای تحقیق، نویسنده دوم: طراحی و راهنمایی در اجرای تحقیق و نگارش و ویرایش مقاله، نویسنده سوم: مشاوره در اجرای مطالعه، تهیه بذر و نشا و آنالیز ترکیبات و تحلیل داده‌ها.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک جهت مساعدت در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

را مرحله رویشی (روزت) در بهار گزارش کردند. اما در مطالعه حاضر، مقدار فنل و فلاونئید کل، اسید رزمارینیک و تانسیون ریشه گیاه در مرحله زایشی زیاد است که می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی در سنتز این متابولیت‌ها باشد [۴۷، ۴۸] که نیاز به تحقیق بیشتر دارد. همچنین، گزارش شده است که نانو اکسید سریم به طور قابل توجهی بفرایندهای متابولیسم ثانویه نهال‌های کاج تأثیر دارد و تجمع فلاونوئیدها در بافت‌ها را تحریک می‌کند که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد [۴۹]. به عبارت دیگر نانو اکسید سریم می‌تواند به عنوان الیسیتور (محرک تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی) ایفای نقش کند. گزارش شده است که کریپتوتانسیون یکی از شایع‌ترین تانسیون‌ها است که بیش‌تر از سایر تانسیون‌ها تحت تأثیر الیسیتورها قرار می‌گیرد [۵۰]. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) به عنوان یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی درون سلول‌های ریشه و تولید تانسیون به طور قابل توجهی با الیسیتورهای مختلف زیستی و غیرزیستی از جمله عصاره مخمر و یون نقره افزایش یافته است [۵۱].

۵. نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسیدسریم و بویژه غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آن بیشترین تأثیر را بر ویژگی‌های مورفو- فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی مریم‌گلی قرمز داشته‌است. در مقایسه دو روش تیمار نانو ذرات اکسید

منابع

1. Guo BL, Feng YX and Zhao YJ. Review of germplasm resources studies on *Salvia miltiorrhiza*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2002; 27: 492-5.
2. Shu T, Pang M, Rong L, Zhou W, Wang J, Liu C and Wang X. Effects of *Salvia miltiorrhiza* on neural differentiation of

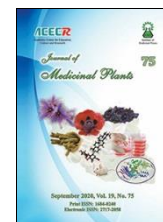
- induced pluripotent stem cells. *J. Ethnopharmacol.* 2014; 153: 233-41.
3. Zhang LJ, Chen L, Lu Y, Wu JM, Xu B, Sun ZG, Zheng SZ and Wang AY. Danshensu has anti-tumor activity in B16F10 melanoma by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 643: 195-201.
 4. Kang DG, Oh H, Chung HT and Lee HS. Inhibition of angiotensin converting enzyme by lithospermic acid B isolated from *Radix Salviae miltiorrhiza* Bunge. *Phytother. Res.* 2003; 17: 917-20.
 5. Petersen M and Simmonds MSJ. Molecules of interest rosmarinic acid. *Phytochem.* 2003; 62: 121-5.
 6. Tóth J, Mrlianová M, Tekel'ová D and Koreňová M. Rosmarinic acid- an important phenolic active compound of Lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 2003; 50: 139-46.
 7. Chen J, Wang F, Lee FS, Wang X and Xie M. Separation and identification of water-soluble salvianolic acids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-speed counter-current chromatography and ESI-MS analysis. *Talanta* 2006; 69: 172-9.
 8. Nwugo CC and Huerta AJ. The effect of silicon on the leaf proteome of rice (*Oryza sativa* L.) plants under cadmium-stress. *J. Proteome Res.* 2011; 10: 518-28.
 9. Remya Nair, Saino Hanna Varghese Baiju G, Nair T, Maekawa YY, oshida D and Sakthi Kumar (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179: 154-63.
 10. Ma X, Wang Q, Rossi L and Zhang W. Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. *Environmental Science and Technol.* 2015; 50: 6793-802.
 11. Naumov A. Review of the world market of rare-earth metals. *Russ. J. Non-Ferr. Metals* 2008; 49: 2-14.
 12. Masui T, Hirai H, Imanaka N, Adachi G, Sakata T and Mori H. Synthesis of cerium oxide nanoparticles by hydrothermal crystallization with citric acid. *J. Mater. Sci. Lett.* 2002; 21: 489-91.
 13. Otsuka K, Wang Y, Sunada E and Yamanaka I. Direct Partial Oxidation of Methane to synthesis Gas by Cerium Oxide. *J. Catalysis* 1998; 175: 152-60.
 14. Ghorbanpour M. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal Plant Physiol.* 2015; 20: 249-56.
 15. 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.
 16. Zhao L, Sun Y, Hernandez-Viezcas JA, Servin AD, Hong J, Niu G, Peralta-Videa JR, Duarte-Gardea M and Gardea-Torresdey JL. Influence of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: A life cycle study. *J. Agricultural and Food Chem.* 2013; 61: 11945-51.
 17. Aghajani Z, Pourmeidani A and Ekhtiyari R. Effect of nano-silver on stages of plant Growth and yield and composition of essential of *Thymus kotchyanus* Boiss. *Hohen African Journal of Agricultural Res.* 2013; 8: 707-10.

18. Ghorbanpour M and Hadian J. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*. 2015; 94: 749-59.
19. Harrison CC. Evidence for intramineral macromolecules containing protein from plant silicas, *Phytochem*. 1996; 41: 37-42.
20. Hatami M, Naghdi Badi H and Ghorbanpour M. Nano-Elicitation of Secondary Pharmaceutical Metabolites in Plant Cells: A Review. *J. Med. Plants* 2019; 71(3): 6-36.
21. Böhm W. Root Parameters and Their Measurement. In: *Methods of Studying Root Systems. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*, 1979; Vol 33. Springer, Berlin, Heidelberg.
22. Arnon DI. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 1949; 24: 1-15.
23. Anokwuru CP, Anyasor GN, Ajibaye O, Fakoya O and Okebugwu P. Effect of extraction solvents on phenolic, flavonoid and antioxidant activities of three nigerian medicinal plants. *Nat. Sci*. 2011; 9: 53-61.
24. Singleton VL and Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Enology and Viticulture J*. 1965; 16(3): 144-58.
25. Rivas MA, Vignale D, Ordóñez RM, Zampini IC, Alberto MR, Sayago JE and Isla MI. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Cyclanthera pedata*, an Andinean Fruit and Products Derived from Them. *Materials J*. 2013; 5: 1-14.
26. Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I and Sadikun A. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem. J*. 2005; 93(2): 311-7.
27. Reich E and Schibli A. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. Thieme Medical Pub, New York, 2006, p: 197.
28. Rey JP, Levesque J, Pousset JL and Roblot F. Analytical and quantitative studies of californin and protopin in aerial part extracts of *Eschscholtzia californica* Cham. With high-performance liquid chromatography. *Chromatography J*. 1991; 87(2): 314-7.
29. Wang Q, Ma X, Zhang W, Pei H and Chen Y. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its implications for food safety. *Metallomics* 2012; 4: 1105-12.
30. Peralta-Videa JR, Hernandez-Viezcás JA, Zhao L, CorralDiaz B, Ge Y, Priester JH, AnnHolden P and Gardea-Torresdey JL. Cerium dioxide and zinc oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014; 80: 128-35.
31. Morales MI, Rico CM, Hernandez-Viezcás JA, Nunez JE, Barrios AC, Tafuya A, Flores-Marges JP, Peralta-Videa JR and Gardea-Torresdey JL. Toxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in cilantro (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in organic soil. *J. Agricultural and Food Chem*. 2013; 61: 6224-30.
32. Pagano L, Servin AD, De La Torre-Roche R, Mukherjee A, Majumdar S, Hawthorne J, Marmiroli M, Maestri E, Marra RE, Isch SM, Dhankher OP, White JC and Marmiroli N. Molecular response of crop plants to

- engineered nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 2016; 50: 7198-207.
33. Rico CM, Peralta-Videa JR and Gardea-Torresdey JL. Differential effects of cerium oxide nanoparticles on rice, wheat, and barley roots: A Fourier Transform Infrared (FT-IR) microspectroscopy study. *Appl. Spectrosc.* 2015; 69: 287-95.
34. López-Moreno ML, de la Rosa G, Hernández-Viezcas JA, Castillo-Michel H, Botez CE, Peralta-Videa JR and Gardea-Torresdey JL. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44: 7315-20.
35. López-Moreno ML, de La Rosar G, Hernández-Viezcas JA, Peralta-Videa JR and Gardea-Torresdey JL. X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO₂ nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 3689-93.
36. Diatloff E, Smith FW and Asher CJ. Rare-earth elements and plant growth. III. Responses of corn and mung bean to low concentrations of cerium in dilute, continuously flowing nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 1995; 18: 1991-2003.
37. Fashui H, Ling W, Xiangxuan M, Zheng W and Guiwen Z. The effect of cerium (III) on the chlorophyll formation in spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* 2002; 89: 263-76.
38. Fashui H, Chao L, Lei Z, Xuefeng W, Kang W, Weiping S, Shipeng L, Ye T and Guiwen Z. Formation of complexes of Rubisco – Rubisco activase from La³⁺, Ce³⁺ treatment spinach. *Science in China Series B: Chemistry* 2005; 48: 67-74.
39. Xiaoqing L, Mingyu S, Chao L, Lu Z, Wenhui S and Fashui H. Effects of CeCl₃ on energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II. *J. Rare Earths* 2007; 25, 624-30.
40. Chen J, Patil S, Seal S, McGinnis JF. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides. *Nat. Nanotechnol.* 2006; 1: 142-50.
41. Shyam R, and Aery NC. Effect of cerium on growth, dry matter production, biochemical constituents and enzymatic activities of cowpea plants [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2012; 12: 1-14.
42. Hatami M, Hosseini SM, Ghorbanpour M, Kariman K. Physiological and antioxidative responses to GO/PANI nanocomposite in intact and demucilaged seeds and young seedlings of *Salvia mirzayanii*. *Chemosphere* 2019; 233: 920-35.
43. Mohammadi M, Hatami M, Feghezadeh K and Ghorbanpour M. Mitigating effect of nano-zerovalent iron, iron sulfate and EDTA against oxidative stress induced by chromium in *Helianthus annuus* L. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2018; 40: 69.
44. Wang X X, Shi G X, Xu Q S, Xu B J and Zhao J. Lanthanum- and Cerium-Induced Oxidative Stress in Submerged *Hydrilla verticillata* Plants. *Russian Journal of Plant Physiol.* 2007; 54: 693-7.
45. Wang X, Morris-Natschke SL and Lee KH. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med. Res. Rev.* 2007; 27: 133-48.
46. Zhao JL, Zhou LG and Wu JY. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 87: 137-44.

47. Li J, Liang X, Dong J, Wang G and Liang Z. Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Salvia miltiorrhiza* Bunge Roots and Leaves. *J. Science and Application*. 2015; 3: 34-40.
48. Zhang Z, He X, Zhang H, Ma Y and Zhang P. Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics* 2011; 3: 816-22.
49. Pinchuk AP, Likhanov AF, Babenko LP, Kryvtsova MV, Demchenko AO, Sherbakov OB, Lazarenko LM and Spivak M. The influence of cerium dioxide nanoparticles on seed germination and accumulation of plastid pigments and phenolic compounds of scots pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.). *Biotechnologia Acta*. 2017; 10: 63-71.
50. Wang JW and Wu JY. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 88: 437-49.
51. Yan Q, Shi M, Ng J and Wu JY. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci.* 2006; 170: 853-8.

How to cite this article: Paryan S, Ghorbanpour M, Hadian J. Influence of CeO₂-nanoparticles on morpho-physiological traits and tanshinone contents of roots in *salvia miltiorrhiza* bunge upon foliar and soil application methods. **Journal of Medicinal Plants** 2020; 19(75): 168-187. doi: 10.29252/jmp.19.75.168



Research Article

Influence of CeO₂-Nanoparticles on morpho-physiological traits and tanshinone contents of roots in *Salvia miltiorrhiza* Bunge upon foliar and soil application methods

Simin Paryan¹, Mansour Ghorbanpour^{1,*}, Javad Hadian²

¹ Graduate Student (MSc.) Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

² Associate Professor Department of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran

³ Associate Professor Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Salvia miltiorrhiza Bunge
Elicitor
Tanshinon
Photosynthetic pigments
Cerium oxide nanoparticles

ABSTRACT

Background: Cerium oxide nanoparticles (CeO₂NPs) may differentially affect physiological and metabolic processes of plants depends on plant species, culture conditions, concentrations and application methods. **Objective:** Evaluation of the effects of different concentrations of CeO₂NPs through two different methods at two growth stages on morpho-physiological and phytochemical characteristics of red sage (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). **Methods:** In this study CeO₂NPs (0, 250, 500, 1000 mg/l) was applied at two growth stages (vegetative and reproductive) via foliar and soil application in a factorial experiment based on completely randomized design with three replications. **Results:** Maximum dry weight of aerial parts was observed in 250 mg/l CeO₂NPs foliar application treatment at reproductive stage. Chlorophyll *a* content was peaked at 250 mg/l CeO₂NPs soil applied treatment at reproductive stage. Furthermore, the highest content of total phenol, flavonoid, and antioxidant activity were obtained in leaf extract of plants foliar treated with 500 mg/l CeO₂NPs at reproductive stage. The highest root rosmarinic acid and tanshinon content was achieved at soil applied CeO₂NPs of 500 mg/l at reproductive stage, which increased 58.7 and 24.6 % compared to the respective control, respectively. **Conclusion:** According to the obtained results in this study, CeO₂NPs at 250 and 500 mg/l through foliar application at reproductive stage showed strong effect on improvement of morpho-physiological and phytochemical characteristics in *S. miltiorrhiza*.

Abbreviations: CeO₂, Cerium oxide; CeO₂NPs, Cerium oxide Nanoparticles; SEM, Scanning Electron Microscopy; TEM, Transmission Electron Microscopy

* Corresponding author: m-ghorbanpour@araku.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.75.168](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.168)

Received 17 October 2019; Received in revised form 26 December 2019; Accepted 5 January 2020

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)