علوم و تحقیقات بذر ایران
سال دوازدهم/ شماره اول/ ۱۴۰۴ (۶۴ - ۴۵)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2025.8928

نقش پرایمینگ نانوذرات اکسید روی در تنظیم همبستگی بین پاسخ های آنتی اکسیدانت، جوانه زنی، رشد و عملکرد فتوسنتزی در گیاهچه بادرنجبویه

قادر حبیبی*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۳۱

چکیده

هدف این تحقیق، تعیین آستانه تحمل گیاهچه‌های بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) به نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) بود که در قالب طرح کامل تصادفی در کشت گلدانی با پایه خاک پرلیت اجرا شد و نمونه ها پس از ۲۸ روز از اعمال تیمار جهت سنجش برداشت شدند. اعمال غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره باعث کاهش درصد جوانه زنی، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه و افت وزن خشک اندام هوایی شد. اعمال غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره باعث افزایش میزان انباشت کاروتنوئید در برگ ها شد. با افزایش غلظت پرایمینگ از ۵۰ به ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، انباشت پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در برگ ها هم‌زمان با افزایش مقدار نیتریک اکسید (NO) و ارتقاء فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) افزایش یافت. نتایج حاصل از پارامترهای رشد و اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA) نشان دادند که غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سبب بروز سمیت در گیاه بادرنجبویه شده است. در این غلظت، شدت فلورسانس در فاز IP و همچنین بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار نشان دادند. آنالیز PCA وجود همبستگی بین درصد جوانه زنی با پارامترهای فلورسانس کلروفیل و همچنین بین درصد جوانه زنی با مقدار اکسیدانت‌ها (H_2O_2 و MDA) را مشخص کرد. در بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل، فعالیت کمپلکس فتولیز کننده آب در فتوسیستم II (Fv/Fo) و Fv/Fm بیش‌ترین همبستگی را با درصد جوانه زنی داشتند و در نتیجه می‌توان از این پارامترها برای تعیین دقیق سازوکارهای سمیت نانوذرات روی در گیاه بادرنجبویه بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه، درصد جوانه‌زنی، فلورسانس کلروفیل، مالون دی آلدئید، نیتریک اکسید، نانوذرات اکسید روی، همبستگی

*استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. ghabibi@pnu.ac.ir

مقدمه

افزایش تقاضا برای نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) در صنایع مختلف نوری، الکتریکی، آرایشی، زیست پزشکی، دارویی و کشاورزی می تواند منجر به پراکندگی این ذرات در منابع آب و خاک شود (Mosquera-Sánchez *et al*., 2020). با این حال، اطلاعات کافی در مورد سرنوشت این ذرات در محیط موجود نیست. با توجه به سطح زیاد و واکنش پذیری بالا، به تأثیر نانوذرات اکسید روی بر موجودات زنده توجه زیادی شده است. گیاهان از طریق فتوسنتز، می توانند مسیر اصلی ورود نانوذرات به زنجیره غذایی باشند. علی‌رغم کاربرد نانوذرات اکسید روی در کشاورزی، تیمار با نانوذرات روی می تواند منجر به تجمع روی و اثرات سمی در گیاهان شود (Molnár *et al*., 2020; Zoufan *et al*., 2020). بنابراین، تعیین میزان سمیت یون ها در بافت های گیاهی، بخاطر اثر بر فیزیولوژی و رشد گیاه، مهم است. هنگامی که تنش ها سبب تجمع گونه های اکسیژن فعال اضافی می شود، نیتریک‌اکسید با آنیون های سوپراکسید واکنش می‌دهد، در نتیجه تشکیل سایر رادیکال‌های اکسیژن کاهش می‌یابد (Domingos *et al*., 2015). به عبارت دیگر، نیتریک‌اکسید ممکن است به طور مستقیم به عنوان یک مولکول آنتی‌اکسیدانی عمل کند. علاوه بر این، با فعال کردن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول ها، نیتریک‌اکسید می تواند به طور غیر مستقیم اثرات تنش اکسیداتیو را کاهش دهد. اثرات سمیت نانوذرات اکسید روی در چندین گونه گیاهی مختلف از جمله آربیدوپسیس (Li *et al*., 2010)، گندم (Du *et al*., 2011)، خیار (Gao *et al*., 2013)، کلزا (Kouhi *et al*., 2014)، یونجه (Bandyopadhyay *et al*., 2015) و نخود فرنگی (Wang *et al*., 2013) نشان داده شده است. در *Arabidopsis thaliana* ، نانوذرات اکسید روی بیوسنتز کلروفیل و کارایی فتوسنتز را با مهار بیان ژن‌های مرتبط با سنتز کلروفیل تحت تأثیر قرار می دهد (Wang *et al*., 2016). اعمال نانوذرات اکسید روی در گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) در غلظت‌های بالا (۱۰ تا۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) موجب کاهش زیست توده، آسیب سلولی ریشه و فعالیت بالاتر سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می شود (Lee *et al*., 2013). گونه‌های فعال اکسیژن بسیار واکنش‌پذیر هستند و می توانند باعث تنش اکسیداتیو در موجودات زنده شوند (García-Gómez *et al*., 2017). غلظت بالای روی در بافت‌های گیاهی می تواند بر تولید رادیکال‌های آزاد و سطوح مالون دی آلدهید تأثیر بگذارد (Gaschler *et al*., 2017). هر چند نحوه اثر نانوذرات بر گیاهان بستگی به نوع گونه گیاهی، نحوه کاربرد نانوذرات (کاربرد برگی یا ریشه‌ای)، مرحله رویشی گیاه، ویژگی های فیزیکوشیمیایی نانوذره، اندازه نانوذره و غلظت نانوذره دارد (Shekhawat *et al*., 2021). گاهی کاربرد نانوذره در غلظت‌های کم باعث تقویت رشد گیاه و اعمال آن در غلظت‌های بالا سبب مهار رشد می‌شود (Pelegrino *et al*., 2021; Mogazy and Hanafy, 2022). پرایمینگ بذور گیاهان مختلف با غلظت‌های مناسب نانوذرات روی باعث بهبود فعالیت فتوسیستم II و جریان انتقال الکترون و تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در دانه رست‌های حاصل می‌شود (Wang et al., 2020; Mahawar et al., 2024). نانوذرات روی در غلظت های بالای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث ایجاد تنش در گیاهان مختلف و اختلال در رشد آنها می شود (Zohri *et al*., 2021; Khalid *et al*. 2022; El- Maqsood *et al*., 2023).

با اینکه اثرات سمی نانوذرات روی بر گیاهان مختلف مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شده است، اثر این نانوذرات بر گیاه دارویی بادرنجبویه مشخص نشده است فلذا در این تحقیق برای اولین بار اثرات سمی نانوذرات روی بر این گیاه دارویی بررسی شد. از آنجایی که پارامترهای فلورسانس کلروفیل و تست JIP (برای رسم منحنی گذار فلورسانس OJIP برگ ها) ابزارهای مناسبی برای ارزیابی میزان اثر عوامل محیطی از جمله نانوذرات بر گیاهان محسوب می‌شوند (Pollastrini *et al*., 2017; Dimitrova *et al*., 2020)، در این تحقیق علاوه بر سنجش پارامترهای رشد، پرولین، نیتریک‌اکسید، مقدار اکسیدانت‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، سنجش پارامترهای مختلف فلورسانس کلروفیل برگ‌های بادرنجبویه نیز انجام شد تا پارامتر مناسب که اولین اثرات سمیت نانو ذره را نشان می‌دهد مشخص و تعیین گردد. از طرف دیگر با استفاده از ارزیابی جامع با استفاده از تحلیل مؤلفه اصلی (PCA)، ارتباط بین تمامی پارامترهای سنجش شده در همه تیمارها تعیین گردید تا مهم‌ترین عامل اثرگذار بر درصد جوانه زنی بذور بادرنجبویه در شرایط تنش

نانوذرات اکسید روی تعیین و حساس ترین ابزار برای ارزیابی سریع تنش نانوذرات مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) در گلدان های پلاستیکی استوانه‌ای شکل حاوی پرلیت کاشته شد و سپس با ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند تهیه شده در آزمایشگاه شامل آمونیوم دی‌هیدروژن‌فسفات (۱۱۵/۰۳ گرم بر لیتر)، نیترات پتاسیم (۱۰۱/۱۰ گرم بر لیتر)، نیترات کلسیم (۲۳۶/۱۵ گرم بر لیتر)، سولفات منیزیم (۲۴۶/۴۷ گرم بر لیتر)، کلرید پتاسیم (۳/۷۲۸ گرم بر لیتر)، بوریک اسید (۱/۵۴۶ گرم بر لیتر)، سولفات منگنز (۰/۸۴۵ گرم بر لیتر)، سولفات روی (۰/۵۷۵ گرم بر لیتر)، سولفات مس (۰/۱۲۵ گرم بر لیتر)، مولیبدات (۰/۰۹ گرم بر لیتر)، کلات آهن (۹/۳۱ گرم بر لیتر) آبیاری شد. ابعاد قطر و عمق گلدان‌ها به ترتیب ۱۸ و ۴۵ سانتی‌متر بود. برای تیمارهای پرایمینگ، بذرها در محلول های نانوذرات اکسید روی (ZnONPs) با غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (این غلظت ها با استفاده از یک پیش آزمایش به دست آمدند) به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. ۴ هفته پس از کاشت، سنجش پارامترها با استفاده از دانه رست های حاصل انجام گرفت. محصول نانوذرات اکسیدروی از شرکت معتبر پیشگامان نانومواد ایران، مشهد، ایران (با خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل خلوص ۹۹ درصد، APS ۳۰-۱۰ نانومتر، SSA: 20-60m^2/g، رنگ سفید، مورفولوژی: کروی، چگالی واقعی ۵/۶۰۶گرم بر سانتی متر مکعب) تهیه شده بود. گیاهان شاهد با محلول غذایی بدون روی آبیاری شدند. گیاهان در گلخانه با شرایط دمای روز و شب به ترتیب ۲۵ و ۲۱ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد و تراکم جریان نوری روزانه حدود ۳۵۰-۴۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه در طول دوره آزمایش نگه‌داری شدند. پس از تعیین وزن تر (FW)، برگ ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای تعیین وزن خشک (DW[1]) خشک شدند. برای تعیین متابولیت ها و فعالیت آنزیم ها، نمونه ها بلافاصله در N_2 مایع تا زمان سنجش ذخیره شدند.

سنجش پارامترهای فلورسانس کلروفیل و تست JIP

جهت تعیین فلورسانس کلروفیل، از دستگاه فلورسانس سنج (PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's &Lynn, Norfolk, PE 32 1JL, Engl) استفاده شد. پارامترهای فلورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش یافته با تاریکی (به مدت حداقل ۲۰ دقیقه) شامل F_0 (فلورسانس پایه) و F_m (فلورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی فلورسانس از تست JIP بهره گرفته شد. تست JIP داده‌های ثبت شده اولیه توسط دستگاه فلورسانس‌سنج را به پارامترهای بیوفیزیکی تبدیل می‌کند و نیز کمیت مراحل جریان انرژی را طی فتوسیستم II تعیین می‌کند. در این دستگاه برای تولید منحنی فلورسانس OJIP (O-J-I-P rise)، از نور قرمز با طول موج ۶۲۷ نانومتر و شدت ۳۵۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه (برای اطمینان از رسیدن به پیک F_m) استفاده می‌شود. شاخص‌هایی که در اندازه‌گیری‌های فلورسانس اولیه مورد استفاده قرار گرفته شد شامل: شدت فلورسانس بیشینه (F_m)، شدت فلورسانس در ۵۰ میکروثانیه به عنوان فلورسانس پایه، شدت فلورسانس در ۳۰۰ میکروثانیه ($F_{300\mu s}$)، نسبت فلورسانس متغیر (V) و شدت فلورسانس در ۲ میلی ثانیه (مرحلهJ) که نشانگر F_J بودند. سپس محاسبات لازم برای بدست آوردن سایر پارامترها شامل شاخص کارآیی فتوسیستم‌ها (PI_{abs})، بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) و فعالیت کمپلکس فتولیز کننده آب (F_v/F_o) انجام شد (Strasser *et al*., 2004). برای رسم منحنی گذار فلورسانس کلروفیل از نرم افزار PEA Plus V1.10 استفاده شد. در منحنی گذار فلورسانس OJIP برگ ها، گذار فلورسانس کلروفیل از سطح پایه «O» (فلورسانس کمینه) به سطح «J» که حدود ۲ میلی ثانیه طول میکشد، مربوط به احیاء QA توسط فتوسیستم II میباشد. تداوم فلورسانس از سطح «J» به سطح «I» که حدود ۳۰ میلی ثانیه طول میکشد با احیاء کامل ذخایر پلاستوکوئینونی (PQ) مرتبط است. گذار فلورسانس از سطح «I» به سطح «P» نتیجه احیاء جایگاه گیرنده الکترون فتوسیستم PSI میباشد (Kalaji *et al*., 2011).

[1]Dry Weight

سنجش رنگیزه های برگ

جهت سنجش مقدار رنگیزه‌ها، نمونه‌های گیاهی با آب دوبار تقطیر شستشو، و روی کاغذ صافی خشک شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم)، نمونه‌ها در داخل ورقه آلومینیومی قرار گرفته و در ازت مایع تا زمان سنجش نگهداری شدند. استخراج رنگیزه با استفاده از حلال استن روی یخ و با هاون چینی سرد انجام شد. غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها به وسیله اسپکتروفتومتر، بعد از ۲۴ ساعت استخراج در استن ۱۰۰ درصد تعیین شد. جذب در ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری، و غلظت کلروفیل های *a* *b* و کاروتنوئیدها طبق رابطه‌های زیر محاسبه شد (Lichtenthaler & Wellburn 1985).

$C_a = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$ (رابطه ۱)

$C_b = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$ (رابطه ۲)

$C_{x+c} = 1000\ A_{470} - 2.270\ C_a - 81.4\ C_b/22$ (رابطه ۳)

که در آن‌ها C_a: کلروفیل a، C_b: کلروفیل b، C_{x+c}: کل کاروتنوئید و A: جذب در طول موج موردنظر بود.

سنجش فعالیت آنزیم ها و متابولیت های سیستم دفاع آنتی اکسیدانی

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مطابق روش Giannapolitis و Ries (۱۹۷۷) و بر اساس درصد ممانعت از احیاء NBT (nitroblue tetrazolium) به ترکیب ارغوانی رنگ دی فورمازان به‌وسیلهٔ رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) حاصل از فتولیز ریبوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه های برگ بلافاصله پس از برداشت در نیتروژن مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر ۲۵ mM از HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) با pH=۷/۸ و حاوی EDTA با غلظت ۰/۱ mM استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شده و روشناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از روشناور به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل HEPES ۲۵ mM با pH=۷/۶، EDTA ۰/۱ mM، Na_2CO_3 ۵۰ mM، (pH=۱۰/۲)، L-متیونین ۱۲ mM، NBT ۷۵ µM و µM ۱ ریبوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور تقریبا ۸۰۰۰ لوکس به منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد مخلوط فوق بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه گردید و جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس مقدار پروتئین آنزیمی لازم برای القاء ۵۰ درصد ممانعت از احیاء NBT در مقایسه با نمونه های شاهد بدون عصارهٔ آنزیمی محاسبه شده و به صورت Unit mg^{-1} protein بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکاران (۱۹۷۴) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ۲۴۰ nm مورد اندازه گیری قرار گرفت. عصارهٔ آنزیمی پس از پودر شدن نمونه‌ها در نیتروژن مایع، در بافر فسفات پتاسیم با غلظت ۵۰ mM و pH=۷ استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم مقدار مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ mM (pH=۷) و ۱۰ mM از H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی H_2O_2 ($۰/۰۴۱\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) بر حسب µM H_2O_2 mg^{-1} protein min^{-1} محاسبه شد.

غلظت پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) بر اساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) به دست آمد. محلول استخراج برگ‌ها، محلول ۰/۱٪ (w/v) تری کلرو استیک اسید (TCA) بود. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ شده و روشناور مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل ۱۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و یدید پتاسیم ۱ M اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی به منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه ها در۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر بر اساس منحنی استاندارد H_2O_2 در محدوده صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

سنجش مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها بر اساس روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) صورت گرفت. عصاره گیاهی در محلول ۰/۱٪ (w/v) تری کلرو استیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشناور با محلول ۲۰٪ از TCA حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

سپس لوله‌ها سریعا در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند. هم‌زمان با عصاره های گیاهی محلول‌های استاندارد در محدودهٔ صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳- تترا اتوکسی‌پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ nm توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در نهایت مقدار MDA نمونه‌ها بر حسب واحد $nmol\ g^{-1}\ FW$ محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری پروتئین کل، عصارهٔ پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۵۰ mM و pH=۶/۸ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. از روشناور حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده به عمل آمد.

تعیین مقدار پرولین و نیتریک اکسید

پرولین بر اساس روش Bates و همکارانش (۱۹۷۳) محاسبه شد. نمونه‌های برگ از هر گروه در سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد (وزنی/حجمی) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد همگن شدند و هموژنه در ۳۰۰۰ گرم به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از افزودن اسید نین هیدرین و اسید استیک گلاسیال، مخلوط به مدت ۱ ساعت در حمام آب جوشانده شد. لوله روی یخ خرد شده خنک شد و سپس جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از پرولین (سیگما) ایجاد شد. برای تعیین مقدار نیتریک اکسید در برگ دانه رست ها از روش Wu و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد. عصاره برگ ها با استفاده از محلول استخراج بافر خنک استیک اسید (حاوی ۴ درصد دی استات روی با pH برابر ۳/۶) استخراج گردید. عصاره ها با سرعت ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و روشناور جدا شد. مقدار مشخصی از روشناور حاصل با محلول واکنش حاوی معرف گریس مخلوط و جذب نمونه ها در ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت NO براساس منحنی استاندار حاصل از $NaNO_2$ بدست آمد.

تحلیل آماری

آزمایش ها در قالب طرح کامل تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از Sigma Stat 3.5 با آزمون Tukey انجام شد ($P<0.05$). ارتباط بین تمامی پارامترهای سنجش شده در همه تیمارها با استفاده از ارزیابی جامع با استفاده از تحلیل مؤلفه اصلی (PCA)، تعیین گردید.

نتایج و بحث

تاثیر نانوذرات اکسیدروی بر درصد جوانه زنی و پارامترهای رشد

بررسی اثر پرایمینگ بذور بادرنجبویه با نانوذرات اکسیدروی در غلظت های مختلف بر درصد جوانه زنی نشان داد که پرایمینگ بذور بادرنجبویه با ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سبب افزایش معنی دار درصد جوانه زنی در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۱). با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی به ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر درصد جوانه زنی بصورت معنی دار کاهش نشان داد. وزن خشک اندام‌های هوایی تحت تاثیر غلظت های کم نانوذرات اکسیدروی قرار نگرفت، هرچند با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی به ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، وزن خشک اندام هوایی به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۱). پرایمینگ بذور با غلظت های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر منجر به کاهش معنی دار طول ساقه چه و ریشه چه گردید ولی در سایر غلظت ها، طول ساقه چه و ریشه چه تحت تأثیر قرار نگرفتند (جدول ۲). افزایش درصد جوانه زنی پس از اعمال نانوذرات از طریق افزایش طول ریشه و افزایش جذب نشان داده شده است (Ali *et al*., 2021; Roy *et al*., 2025)، هرچند در این تحقیق، افزایش درصد جوانه زنی پس از اعمال غلظت های پایین نانوذرات با افزایش طول ریشه چه همراه نبود. اثرات مثبت غلظت های کم نانوذرات روی بر پارامترهای رشد مربوط به نقش نانوذرات روی در تقسیم سلولی، سنتز کلروفیل، سنتز پروتئین، متابولیسم اسید نوکلئوئیک، سنتز اکسین و متابولیسم قند می باشد (Mahawar *et al*., 2024). بررسی اثر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر پارامترهای رشد بادرنجبویه در این تحقیق نشان داد که با وجود اثرات مثبت غلظت های کم بر پارامترهای رشد، غلظت های بالا سبب سمیت و کاهش وزن خشک اندام‌های هوایی گردید. این یافته با نتایج تحقیقات Dilnawaz و همکاران (۲۰۲۳) و Maqsood و همکاران (۲۰۲۳) مطابقت داشت، آنها نیز نشان داده اند که اثر مثبت یا بازدارنده نانوذرات بر رشد گیاهان تابع الگوی غلظت اعمال نانوذرات می باشد. مقدار وزن خشک اندام‌های هوایی تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی با غلظت بالا (۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد، که با یافته‌های Mahajan و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت، آن‌ها نشان دادند که الگوهای رشد و تکامل در

گیاهان *Vigna radiate* و *Cicer arietinum* (نخود) پس از تیمار با نانوذرات اکسیدروی کاهش یافت و تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی در گندم سیاه *(Fagopyrum esculentum)* در غلظت‌های بالا (۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، کاهش در تجمع زیست توده، آسیب سلولی در سطح ریشه و افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن مشاهده شد (Lee *et al*., 2013). Zoufan و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که، نانوذرات اکسیدروی در غلظت بالای ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر رشد گیاه *Chenopodium murale* را کاهش می‌دهد. مطالعات Landa و همکاران (۲۰۱۷) و Du و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که نانوذرات اکسیدروی احتمالاً به جای باقی‌ماندن در شکل نانوذرات به یون روی تبدیل می شود.

تأثیر نانوذرات اکسیدروی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی

مقدار کلروفیل به عنوان یک شاخص قابل توجه در رابطه با آلودگی و سمیت فلزات سنگین در گیاهان طبقه-بندی شده‌است (Mazaheri Tirani *et al*., 2018). نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسیدروی در غلظت های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل a و b در برگ ها شد (شکل ۳)، هرچنداعمال غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش انباشت کلروفیل a گردید. برگ های دانه رست های حاصل از بذور پرایمینگ شده با غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانو اکسیدروی بیشترین افزایش کاروتنوئید را نشان دادند (شکل ۳). ولی تیمارهای ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش معنی‌دار مقدار کاروتنوئید را در مقایسه با شاهد بروز دادند. یافته‌های مشابه با نتایج این تحقیق، توسط Zoufan و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه بر روی گیاه *Chenopodium murale* گزارش شده است که

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پرایمینگ بذر با نانوذرات اکسید روی بر جوانه زنی بذر، ویژگی‌های رشدی و فعالیت‌های فیزیولوژیکی

Table 1. Analysis of variance of seed germination, growth components and physiological activity as affected by seed priming with ZnO nanoparticles

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	درصد جوانه زنی Germination percentage	وزن خشک ساقه Shoot dry weight	طول ساقه چه (سانتی متر) Pumlue length (cm)	طول ریشه چه (سانتی متر) Radicle length (cm)	مقدار کلروفیل a Chlorophyll a content	مقدار کلروفیل b Chlorophyll b content	مقدار کاروتنوئید Carotenoids content
پرایمینگ بذر Seed priming	4	1454.80**	104.00**	6.59**	10.29*	24.95**	10.43**	15.65*
خطای آزمایشیError	5	8.52	2.28	0.57	0.71	1.11	0.72	0.88
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	6.05	8.75	6.79	7.14	8.46	11.66	6.16

**، *و ns به ترتیب معنی داری در ۱ و ۵ درصد سطح احتمال و غیرمعنی داری می‌باشد.

**, *, and ns are significant at 1% and 5% and non-significant, respectively.

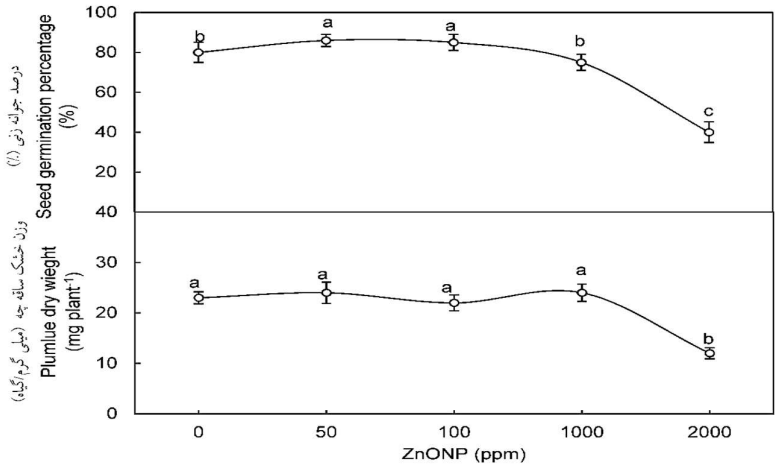
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر پرایمینگ بذر با نانوذرات اکسید روی بر مقدار پرولین و نیتریک اکسید و فعالیت سیستم آنتی اکسیدانت

Table 2. Analysis of variance of proline and nitric oxide content and antioxidant system activity as affected by seed priming with ZnO nanoparticles

منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	مقدار پرولین Proline content	مقدار نیتریک اکسید NO content	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز Superoxide dismutase enzyme activity	فعالیت آنزیم کاتالاز Catalase enzyme activity	مقدار پراکسید هیدروژن H_2O_2 content	مقدار مالون دی آلدئید MDA content
پرایمینگ بذر Seed priming	4	273.20*	115.68**	131.80**	2096.00**	150.80**	1269.20**
خطای آزمایشیError	5	3.69	2.40	2.56	10.23	2.74	7.96
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	7.70	7.00	11.11	5.29	9.20	5.86

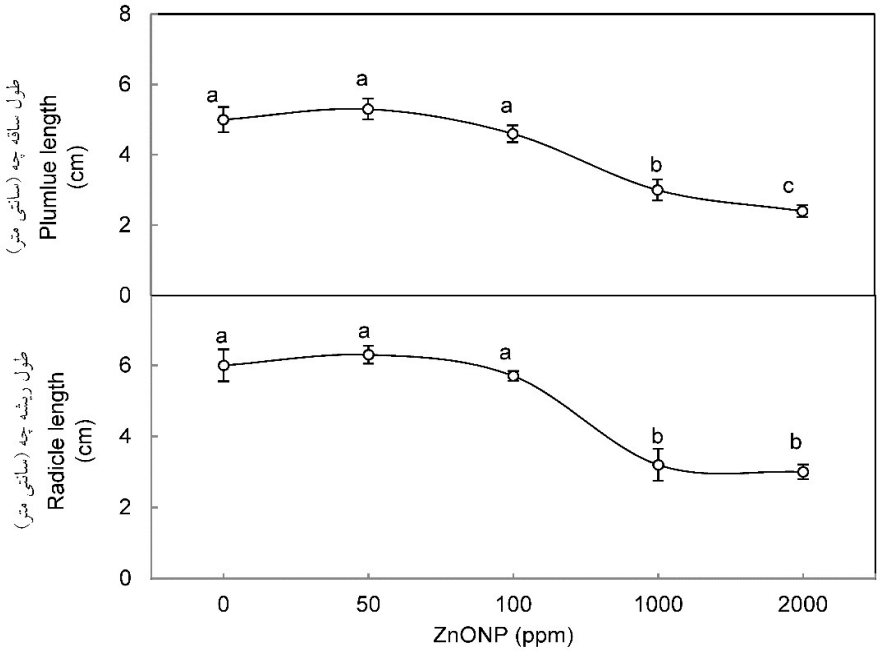
**، *و ns به ترتیب معنی داری در ۱ و ۵ درصد سطح احتمال و غیرمعنی داری میباشد.

**, *, and ns are significant at 1% and 5% and non-significant, respectively.



شکل ۱- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر درصد جوانه زنی و وزن خشک ساقه چه گیاهچه بادرنجبویه. میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک داشته باشند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی: در سطح ۹۵ %). داده ها میانگین ۴ تکرار هستند.

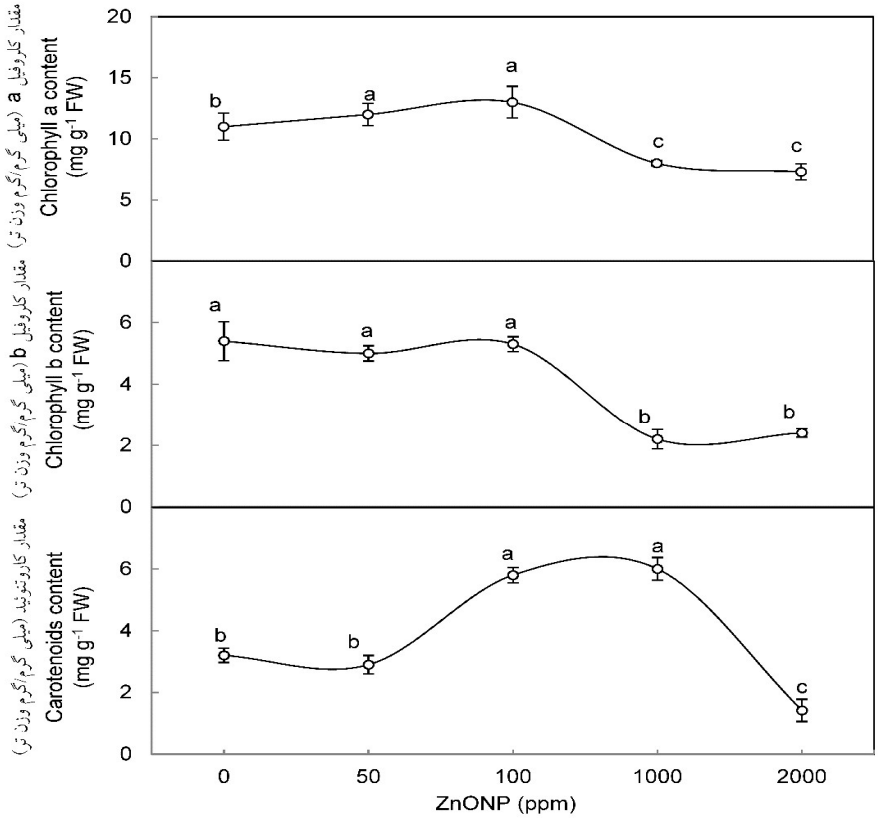
Figure 1. The effects of different concentrations of ZnONPs on the seed germination rate and shoot dry weight of lemon balm plantlets. *Bars* indicated with the *same letter* are not significantly different (p<0.05 Tukey test). Values are the mean ± SD (n=4).



شکل ۲- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر طول ساقه چه و ریشه چه گیاهچه بادرنجبویه. میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک داشته باشند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی: Tukey test در سطح ۹۵ درصد). (داده ها میانگین ۴ تکرار هستند)

Figure 2. The effects of different concentrations of ZnONPs on the shoot length and root length of lemon balm plantlets. *Bars* indicated with the *same letter* are not significantly different (p<0.05 Tukey test). (Values are the mean ± SD (n=4))

نانوذرات اکسیدروی میزان رشد گیاه و مقدار کلروفیل را کاهش می‌دهد. همچنین Ruiz-Torres و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که با اعمال نانوذرات روی مقدار کلروفیل در *Coriandrum sativum* کاهش یافت. مقدار کلروفیل برگ خردل (*Brassica juncea*) تحت تاثیر تنش نانوذرات اکسیدروی کاهش یافت و این کاهش با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی همبستگی داشت (Bhat *et al*., 2021). در این گونه گیاهی، افزودن روی منجر به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی شد، این پدیده احتمالاً به این دلیل رخ داده است که کلروپلاست‌ها محلی ترجیحی برای تشکیل گونه-های فعال اکسیژن هستند و نانوذرات اکسیدروی می‌توانند موجب آسیب شدید به غشاهای تیلاکوئید گیاه شود (Du *et al*., 2017). افزایش کاروتنوئید برگ های دانه رست های حاصل از بذور پرایمینگ شده با غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانو اکسیدروی با افزایش شاخص های رشد و جوانه زنی در این تیمارها همخوانی داشت. به نظر می رسد یکی از عوامل حفظ شاخص کارآیی فتوسنتز در تیمارهای ذکر شده، بالا بودن محتوی کاروتنوئیدها در برگ‌های آن‌ها بود. افزایش کاروتنوئیدها با فعال‌سازی چرخه ویولاگزانتین/زئاگزانتین و فروکش غیرفتوشیمیایی باعث تخفیف آسیب‌های ناشی از تنش در گیاهان می‌شوند (Habibi and Ajory, 2015). یافته های این تحقیق با نتایج Habibi و Ajory (۲۰۱۵) که نشان دادند شاخص کارآیی فتوسیستم‌ها با محتوی کاروتنوئیدها در گیاه ماروبیوم ولگار (*Marrubium vulgare*) همبستگی دارد، مطابقت دارد.

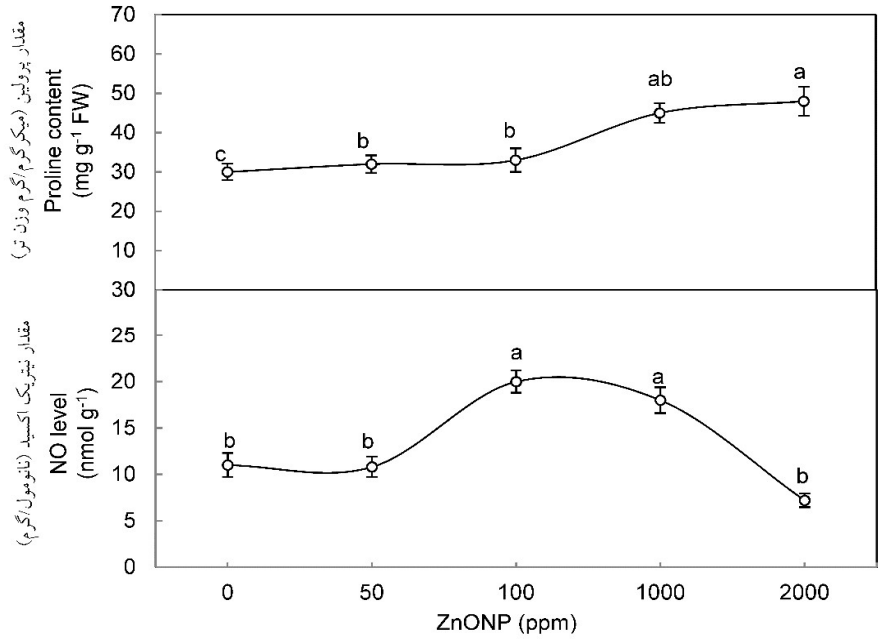


شکل ۳- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر محتوی کلروفیل و کاروتنوئید گیاهچه بادرنجبویه. میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک داشته باشند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی: Tukey test در سطح ۹۵ درصد). داده ها میانگین ۴ تکرار هستند.

Figure 3. The effects of different concentrations of ZnONPs on the chlorophylls and carotenoids contents of lemon balm plantlets. *Bars* indicated with the *same letter* are not significantly different (p<0.05 Tukey test). Values are the mean ± SD (n=4).

تاثیر نانوذرات اکسیدروی بر مقدار پرولین و نیتریک اکسید

نتایج نشان داد که مقدار پرولین برگ‌ها تحت تأثیر اعمال غلظت های مختلف نانوذره اکسیدروی افزایش معنی-داری نشان داد (شکل ۴). بسیاری از گیاهان زمانی که در معرض تنش سمیت قرار می‌گیرند، پرولین را به‌عنوان یک جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تنظیم‌کننده اسمزی انباشته می‌کنند (Chun *et al*., 2018). در این مطالعه پرایمینگ موجب افزایش مقدار پرولین گردید که با نتایج Faraz و همکاران (۲۰۲۰) در خصوص افزایش سطح پرولین تحت تنش فلزات سنگین مطابقت داشت. در واقع، افزایش معنی‌دار مقدار پرولین می-تواند تحمل گیاه را به شرایط تنش محیطی افزایش دهد (Estaji and Niknam, 2020). البته تحقیقات دیگری هم وجود دارند که کاهش پرولین پس از اعمال نانوذرات روی در غلظت بالا در گیاه *Raphanus sativus* را تایید می کنند (Mahawar *et al*., 2024). در این تحقیق، الگوی افزایش مقدار نیتریک اکسید در غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر با الگوی افزایش مقدار کاروتنوئید و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در این غلظت ها مطابقت داشت. به نظر می رسد همبستگی بین الگوی تغییرات نیتریک اکسید با الگوی تغییرات مقدار کاروتنوئید و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت نشان دهنده نقش نیتریک اکسید بعنوان علامت ثانویه در شروع پاسخ های گیاه به تنش و در نتیجه افزایش مقاومت به شرایط تنش باشد (Habibi, 2020).



شکل ۴- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر مقدار پرولین و نیتریک اکسید در گیاهچه بادرنجبویه. میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک داشته باشند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی: در سطح ۹۵ ٪). داده ها میانگین ۴ تکرار هستند.

Figure 4. The effects of different concentrations of ZnONPs on the proline and nitric oxide contents of lemon balm plantlets. *Bars* indicated with the *same letter* are not significantly different (p<0.05 Tukey test). Values are the mean ± SD (n=4).

تاثیر نانوذرات اکسیدروی بر فعالیت فتوشیمیایی برگ ها

برای رسم منحنی فلورسانس از تست JIP بهره گرفته شد. تست JIP داده‌های ثبت شده اولیه توسط دستگاه فلوئورسانس سنج را به پارامترهای بیوفیزیکی تبدیل می کند و کمیت مراحل جریان انرژی را طی فتوسیستم II تعیین می‌کند. بررسی تغییرات منحنی فلورسانس OJIP (شکل ۳: محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان

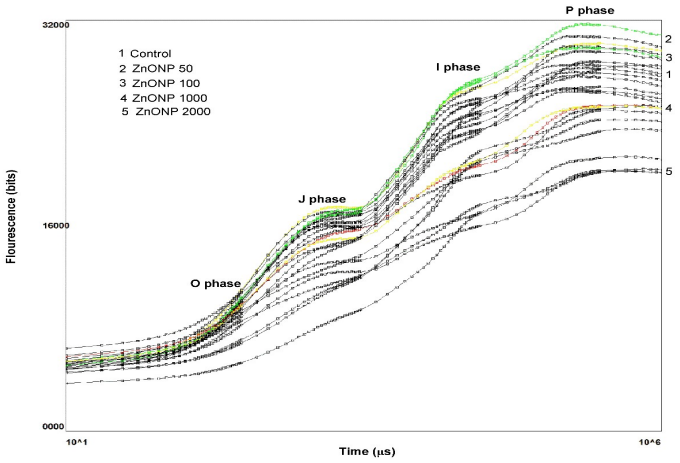
بر اساس میکروثانیه) در گیاهچه بادرنجبویه نشان داد که بطور کلی شدت فلورسانس در برگ‌های حاصل از دانه رست های تیمار شده با غلظت‌های کم یعنی ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بیشتر است (شکل ۵). بررسی تغییرات منحنی فلورسانس در تیمارهای پرایمینگ ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد که شدت فلورسانس در فاز IP کاهش چشم‌گیری یافته است و منحنی فلورسانس نسبت به حالت شاهد شکل مسطحی پیدا کرده است (شکل ۵). کاهش شدت فلورسانس در فاز IP با کاهش بیشینه فلورسانس (F_m) همراه بود (شکل ۶). بصورت کلی پارامتر بیشینه فلورسانس (F_m) در مقایسه با سایر پارامترهای فلورسانس کلروفیل اندازه گیری شده حساسیت بیش‌تری به تنش نانواکسیدروی نشان داد و کاهش آن از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر شروع شد (شکل ۶). کاهش بیشینه فلورسانس و افزایش جزیی فلورسانس پایه (F_0) در تیمار ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر باعث افت معنی‌دار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) گردید (شکل های ۷ و ۸). بررسی منحنی توزیع پارامتر مرتبط با فعالیت کمپلکس فتولیز آب و آزاده کننده اکسیژن (F_v/F_0) نشان داد که هر دو غلظت ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ باعث کاهش فعالیت این کمپلکس شده‌اند (شکل ۹). بررسی منحنی توزیع پارامتر شاخص کارآیی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) نشان داد که هر چند شاخص کارآیی فتوسیستم‌ها در پاسخ به پرایمینگ ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش چشم‌گیری داشت ولی شاخص کارآیی فتوسیستم‌های برگ‌های دانه رست‌های پرایمینگ شده با غلظت های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ کاهش معنی‌دار نشان داد (شکل ۱۰).

افزایش فلورسانس پایه (F_0) در برگ‌های تیمارهای ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد که اعمال نانوذرات اکسید روی با کاهش ذخایر کوئینون A احیاء (QAH2) و پلاستوکوئینون احیاء (PQH2) مرتبط می باشد (Habibi, 2017). کاهش ذخایر QAH2 و PQH2 احتمالا نشان می‌دهد که جریان انتقال الکترون در ناقل‌های پایین دست در برگ‌های زمستانه بلوکه شده است (Strasser *et al*., 2004). با اعمال غلظت های بالا، منحنی فلورسانس برگ‌ها شکل مسطحی را نشان دادند و شدت فلورسانس در فاز IP کاهش شدیدی را نشان داد.کاهش فاز IP که با کاهش شدت فلورسانس بیشینه (F_m) در ارتباط می‌باشد نشان دهنده‌ی غیر فعال شدن پروتئین‌ها در ساختار فتوسیستم II می‌باشد (Habibi, 2017) که در همه برگ‌های گیاهچه بادرنجبویه در پاسخ به حتی غلظت کم یعنی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هم مشاهده شد.

شاخص F_v/F_m یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین مقاومت به انواع تنش‌ها می‌باشد (Rousseau *et al*., 2013). سنجش F_v/F_m برگ‌های گیاهچه بادرنجبویه نشان داد که این پارامتر در پاسخ به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو ذرات اکسید روی تغییری نشان نداد. هر چند شاخص PI_{abs} در پاسخ به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش معنی دار نشان داد. این یافته با نتایج تحقیق Brestič و Živčák (۲۰۱۳) که نشان دادند پارامترPI_{abs} در مقایسه با پارامتر F_v/F_m به شرایط تنش حساس‌تر است، مطابقت دارد. پارامتر PI_{abs} یک پارامتر کمپلکس است که با ظرفیت فتوسنتزی و میزان تثبیت دی اکسیدکربن در برگ‌ها همبستگی دارد (Zhou *et al*., 2024). مقدار بالای پارامتر PI_{abs} در برگ دانه رست های حاصل از پرایمینگ ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر نشان داد که شاید غلظت های کم نانوذرات اکسیدروی سبب بهبود ظرفیت فتوسنتزی و سرعت تثبیت دی اکسیدکربن شده است. با عنایت به اینکه در بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل اندازه گیری شده، پارامتر بیشینه فلورسانس (F_m) حساسیت بیش‌تری به تنش نانواکسیدروی نشان داد و کاهش آن از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر شروع شد، می‌توان از این پارامتر بعنوان یک آزمایش مناسب برای تعیین سطوح سمیت نانوذرات روی در گونه‌های مختلف بهره برد.

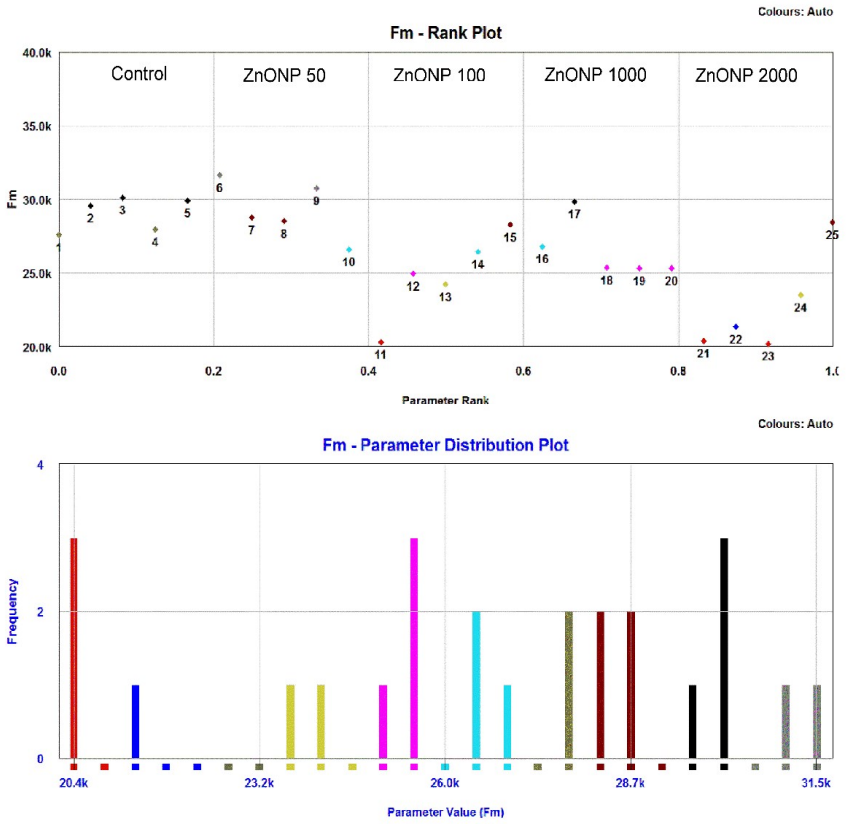
تأثیر نانوذرات اکسیدروی بر فعالیت آنتی اکسیدانتی

در این پژوهش، افزودن نانوذرات اکسیدروی در غلظت های بالای ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهچه بادرنجبویه را افزایش داد و فعالیت‌های آنزیمی نیز تحت تأثیر اعمال روی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و آنزیم کاتالاز تحت تاثیر اعمال نانوذرات اکسیدروی با غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ افزایش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۱۱). با افزایش غلظت پرایمینگ به ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، فعالیت هر دو آنزیم به شدت کاهش یافت و به میزان کم‌تر از سطح شاهد رسید. از آن جایی که غشا اولین بخش از سلول است که تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد، در این تحقیق برای تعیین آسیب غشاها در شرایط خشکی، مقدار MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها سنجش شد. هر چند



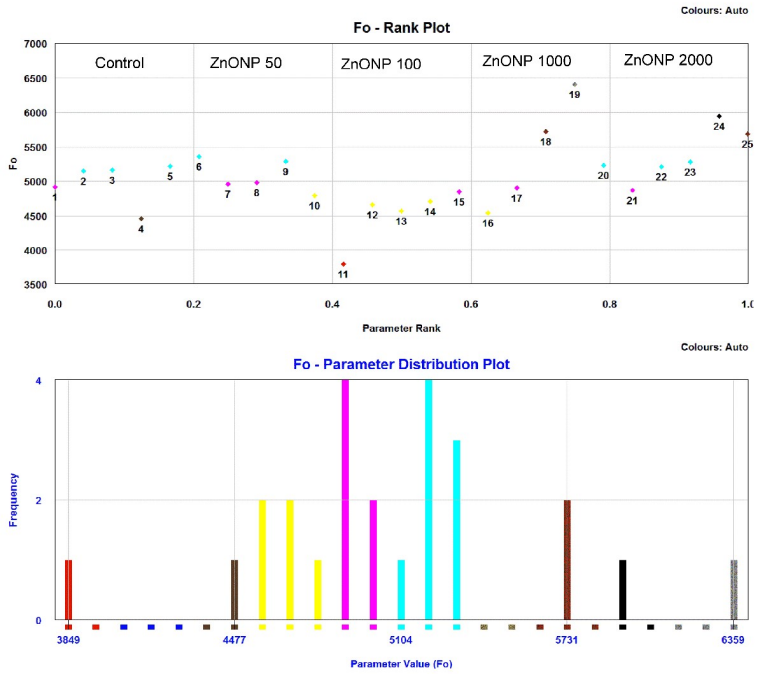
شکل ۵- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر تغییرات منحنی فلورسانس OJIP (محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان بر اساس میکروثانیه است) برگ های گیاهچه بادرنجبویه.

Figure 5. The effects of different concentrations of ZnONPs on the chlorophyll *a* fluorescence induction curve of lemon balm plantlets.



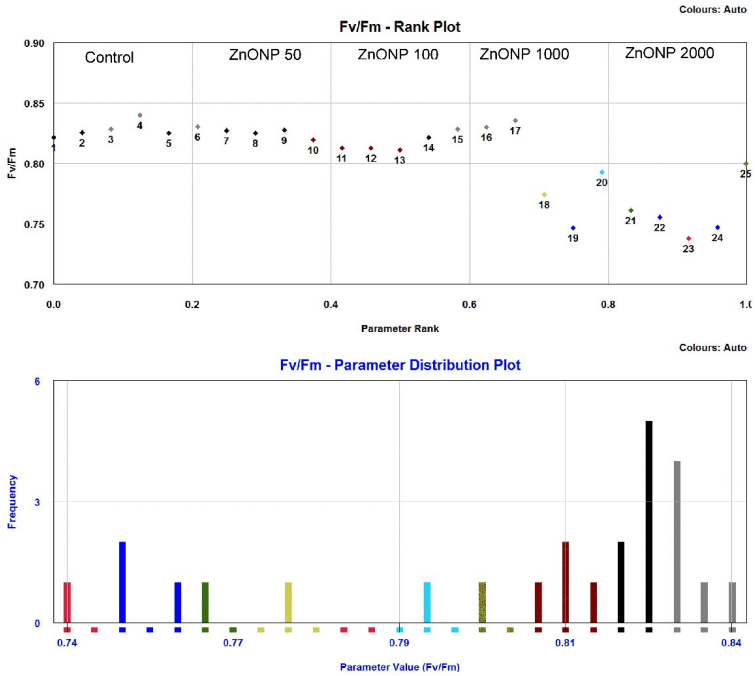
شکل ۶-تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر توزیع داده های فلورسانس بیشینه (F_m) برگ های گیاهچه بادرنجبویه.

Figure 6. The effects of different concentrations of ZnONPs on the distribution plot of maximum flourencense (F_m) in lemon balm plantlets leaves.



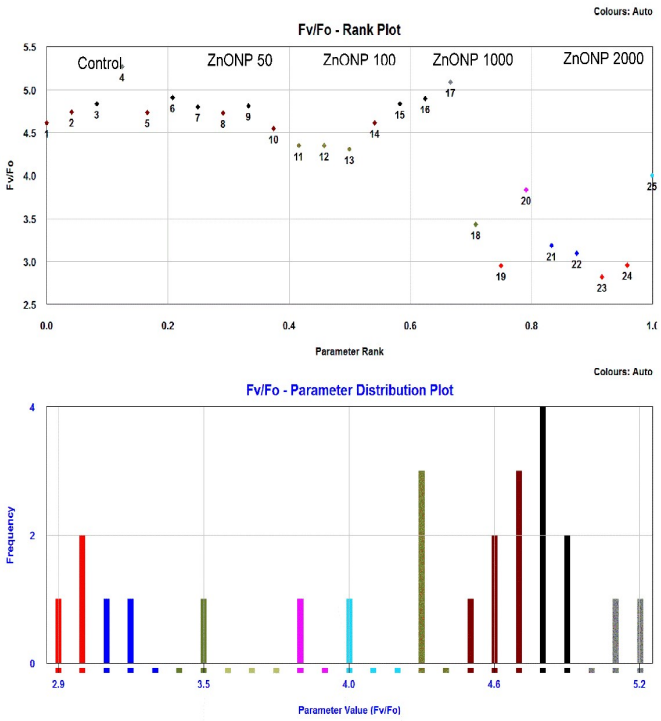
شکل ۷- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر توزیع داده های فلورسانس پایه (F_o) برگ های گیاهچه بادرنجبویه.

Figure 7. The effects of different concentrations of ZnONPs on the distribution plot of initial flourencense (F_o) in lemon balm plantlets leaves.



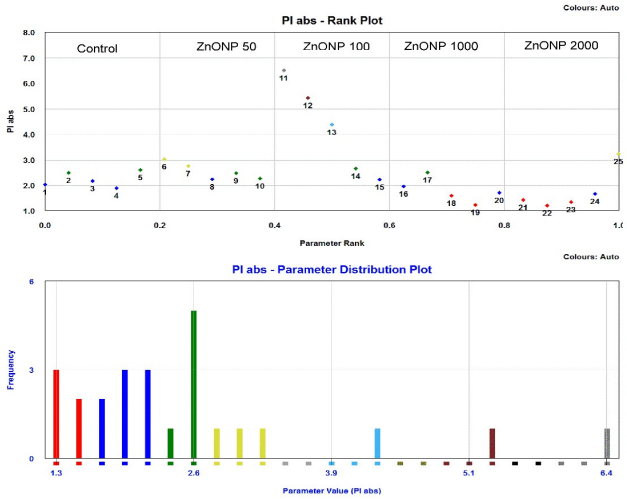
شکل ۸- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر توزیع داده های بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) برگ های گیاهچه بادرنجبویه.

Figure 8. The effects of different concentrations of ZnONPs on the distribution plot of maximum quantum yield (F_v/F_m) in leaves of lemon balm plantlets.



شکل ۹- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر توزیع داده های فعالیت کمپلکس فتولیز کننده آب در فتوسیستم II (F_v/F_o) برگ های گیاهچه بادرنجبویه.

Figure 9. The effects of different concentrations of ZnONPs on the distribution plot of oxygen-evolving complex efficiency of PSII (F_v/F_o) in leaves of lemon balm plantlets.



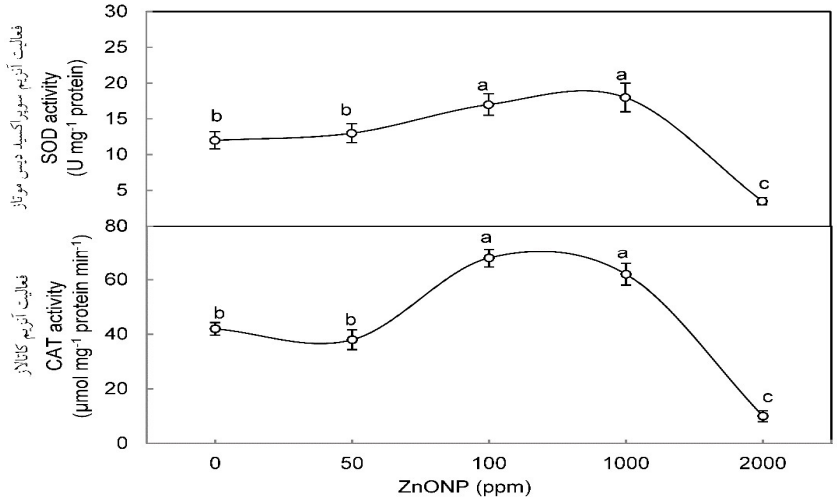
شکل ۱۰- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر توزیع داده های شاخص کارآیی فتوسیستم ها (PI_{abs}) برگ های گیاهچه بادرنجبویه.

Figure 10. The effects of different concentrations of ZnONPs on the distribution plot of on the performance index (PI_{abs}) in leaves of lemon balm plantllets.

افزایش مقدار انباشت H_2O_2 حتی در غلظت های کم نانوذرات (۵۰ میلی گرم بر لیتر) نیز ثبت گردید، افزایش مقدار MDA تنها با اعمال غلظت های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۱۲). نمودار بای پلات PCA همبستگی بین پارامترهای مختلف با مؤلفه های درصد جوانه زنی بذور (SG) را تحت غلظت‌های مختلف ZnONPs نشان داد (شکل ۱۳). بررسی همبستگی بین پارامترها در تیمارهای مختلف نشان داد که بین درصد جوانه زنی بذور با مقدار پرولین، F_o، مقدار پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید همبستگی منفی وجود داشت. بیش‌ترین میزان همبستگی مثبت بین درصد جوانه زنی بذور با وزن خشک اندام هوایی، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت و شاخص های اصلی فلورسانس کلروفیل F_v/F_m و F_v/F_o وجود داشت (شکل ۱۳).

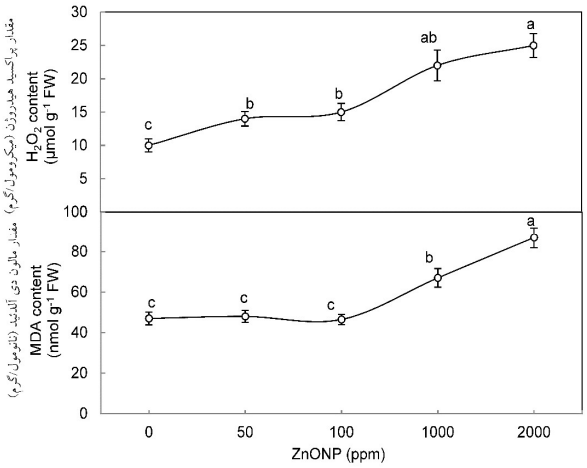
در تطابق با یافته های این تحقیق، نشان داده شده است که پرایمینگ بذور با نانوذرات روی در غلظت های بالا سبب کاهش فعالیت آنزیم های SOD و CAT در گندم شده است (Rai-Kalal and Jajoo, 2021). کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت پس از اعمال نانوذرات روی در غلظت بالا در گیاه *Raphanus sativus* نیز گزارش شده است (Mahawar *et al*., 2024) که شاید بدلیل تخریب پروتئین آنزیم ها در شرایط تنش شدید حاصل از سمیت عناصر سنگین می باشد. همچنین نتایج این تحقیق با نتایج Panda و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد، آن‌ها نشان دادند که نانوذرات اکسیدروی در غلظت بحرانی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد و آنزیم کاتالاز را غیرفعال می‌کند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به دلیل واکنش مثبت گیاهان برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، اما هنگامی که رادیکال‌های آزاد ناشی از این سمیت قابل مهار نباشند، مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی می-توانند مختل شوند (Bhaduri and Fulekar, 2012).

برای درک بیشتر سمیت سلولی نانوذرات، مقدار پراکسیدهیدروژن اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، مقدار پراکسیدهیدروژن تحت تاثیر نانوذرات روی افزایش معنی-داری نشان داد. عوامل تنش‌زای غیرزیستی از جمله فلزات سنگین منجر به افزایش مقدار پراکسید هیدروژن می‌شود که در نتیجه تنش اکسیداتیو، آسیب غشاء و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی رخ می‌دهد (Zandalinas and Mittler, 2018; Romero-Puertas *et al*., 2019; Perveen *et al*., 2020). افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در غلظت های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد که غلظت‌های بالای اعمال شده در این تحقیق باعث تنش اکسیداتیو در برگ‌های دانه رست‌ها شده است.



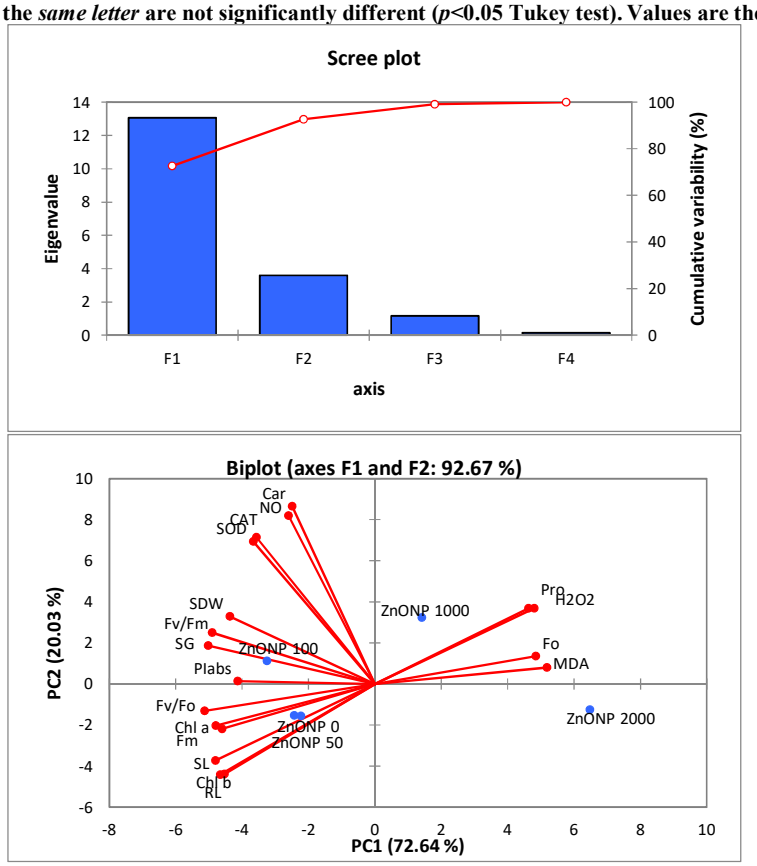
شکل ۱۱- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز برگ های گیاهچه بادرنجبویه. میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک داشته باشند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی: Tukey test **در سطح ۹۵ درصد). داده ها میانگین ۴ تکرار هستند.**

Figure 11. The effects of different concentrations of ZnONPs on the activity of SOD and CAT in lemon balm plantlets. *Bars* indicated with the *same letter* are not significantly different (p<0.05 Tukey test). Values are the mean ± SD (n=4).



شکل ۱۲- تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و مالون دی آلدئید (MDA) برگ های گیاهچه بادرنجبویه. میانگین هایی که حداقل یک حرف مشترک داشته باشند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی: Tukey test در سطح ۹۵ درصد). داده ها میانگین ۴ تکرار هستند.

Figure 12. The effects of different concentrations of ZnONPs on the H_2O_2 and MDA contents of lemon balm plantlets. *Bars* indicated with the *same letter* are not significantly different (p<0.05 Tukey test). Values are the mean ± SD (n=4).



شکل ۱۳- تجزیه و تحلیل توزیع اجزای اصلی. نمودار بالا که مقادیر ویژه را در پاسخ به تیمارها برای پارامترهای اندازه گیری شده نشان می دهد (a). نمودار بای پلات PCA که همبستگی بین پارامترهای مختلف با مولفه های درصد جوانه زنی بذور (SG) تحت غلظت‌های مختلف ZnONPs نشان می‌دهد (b).

Figure 13. The analysis of the contribution rate of the principal components. Scree plot showing eigenvalues in response to the number of components for the estimated variables (a). PCA biplot showing the correlations between variable parameters and SG (seed germination percentage) under different concentrations of ZnONPs (b).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پارامترهای رشد و اندازه گیری مقدار مالون دی آلدئید نشان دادند که غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم بر لیتر سبب بروز سمیت در گیاهچه بادرنجبویه شده است. در این غلظت مقدار نیتریک اکسید و فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به شاهد کاهش یافتند و شدت فلورسانس در فاز IP و همچنین بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) نسبت به شاهد کاهش معنی دار نشان دادند. در بین پارامترهای فلورسانس کلروفیل، فعالیت کمپلکس فتولیز کننده آب در فتوسیستم II (F_v/F_o) و F_v/F_m بیشترین همبستگی را با درصد جوانه زنی داشتند و در نتیجه میتوان از این پارامترها برای تعیین دقیق سازوکارهای سمیت نانوذرات روی در گیاهچه بادرنجبویه بهره برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از همکارانی که در این کار پژوهشی ما را یاری نمودند، به ویژه مسئول آزمایشگاه خانم داغستانی اعلام می نمایند.

منابع

Ali, S., Mehmood, A., Khan, N. 2021. Uptake, translocation, and consequences of nanomaterials on plan growth and stress adaptation. Journal of Nanomaterials, 20: 1-17. DOI. 10.1155/2021/6677616 **(Journal)**

Boominathan, R. and Doran, P. M. 2002. Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumlator, Alyssum bertoloni. New Phytologist, 156(2): 202-205. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00506x **(Journal)**

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72 (1-2): 248-54. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3 **(Journal)**

Brestic, M. and Zivcak, M. 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In *Molecular stress physiology of plants* (pp. 87-131). Springer India. DOI: 10.1007/978-81-322-0807-5 **(Chapter)**

Cazzonelli, C. I. and Pogson, B. J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Trends in Plant Science, 15: 266-274. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.02.003 **(Journal)**

Chun, S. C., Paramasivan, M. and Chandrasekaran, M. 2018. Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. Journal of Frontiers in Microbiology, 9: 2525. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02525 **(Journal)**

Dilnawaz, F., Misra, A. N., Apostolova, E. 2023. Involvement of nanoparticles in mitigating plant's abiotic stress. Plant Stress, 100280. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100280 **(Journal)**

Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C. and Feijo, J. A. 2015. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. Molecular Plant, 8(4): 506-520. DOI: 10.1016/j.molp.2014.12.010 **(Journal)**

Du, W., Tan, W., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Ji, R., Yin, Y. and Guo, H. 2017. Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: physiological and biochemical aspects. Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 110: 210-225. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.024 **(Journal)**

El-Zohrim M., Al-Wadaani, N. A. and Bafeel, S.O. 2021. Foliar sprayed green zinc oxide nanoparticles mitigate drought-induced oxidative stress in tomato. Plants, 10(11): 2400. https://doi.org/10.3390/plants10112400 **(Journal)**

Estaji, A. and Niknam, F. 2020. Foliar salicylic acid spraying effect on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum* L. plant. Journal of Agricultural Water Management, 234: 106116. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106116 **(Journal)**

Faraz, A., Faizan, M., Sami, F., Siddiqui, H. and Hayat, S. 2020. Supplementation of salicylic acid and citric acid for alleviation of cadmium toxicity to *Brassica juncea*. Journal of Plant Growth Regulation, 39: 641-655. DOI: 10.1007/s00344-019-10007-0 **(Journal)**

Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Journal of Plant Physiology, 59(2): 309-314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309 **(Journal)**

Habibi, G. 2020. Effects of altitudinal gradient on daily rhythm of antioxidant capacity and dynamic photoinhibition in *Marrubium vulgare*. Iranian Journal of Plant Biology, 12(3): 57-72. DOI: 10.22108/ijpb.2020.120483.1188 (In Persian)**(Journal)**

Habibi, G. and Ajory, N. 2015. The effect of drought on photosynthetic plasticity in *Marrubium vulgare* plants growing at low and high altitudes. Journal of Plant Research, 128: 987-994. DOI: 10.1007/s10265-015-0748-1 **(Journal)**

Habibi, G., Servataian, N. and Abedini, M. 2017. Photoprotection mechanisms in wheat plants under high light and cold temperature conditions. Iranian Journal of Plant Biology, 9(1): 59-72. DOI: 10.22108/ijpb.2017.21566 (In Persian)**(Journal)**

Kalaji, H. M., Bosa, K., Kościelniak, J. and Żuk-Gołaszewska, K. 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO2 assimilation of two Syrian barley landraces. Environmental and Experimental Botany (EBB). 73, 64-72. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7-164 **(Journal)**

Khalid, M. F., Iqbal Khan, R., Jawaid, M. Z., Shafqat, W., Hussain, S., Ahmed, T., Alina, Marc, R. 2022. Nanoparticles: the plant savior under abiotic stresses. Nanomaterials, 12(21): 3915. https://doi.org/10.3390/nano12213915 **(Journal)**

Kohli, S. K., Handa, N., Bali, S., Arora, S., Sharma, A., Kaur, R. and Bhardwaj, R. 2018. Modulation of antioxidative defense expression and osmolyte content by co-application of 24-epibrassinolide and salicylic acid in Pb exposed Indian mustard plants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 147: 382-393. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.051 **(Journal)**

Landa, P., Prerostova, S., Petrova, S., Knirsch, V., Vankova, R. and Vanek, T. 2015. The transcriptomic response of Arabidopsis thaliana to zinc oxide: a comparison of the impact of nanoparticle, bulk, and ionic zinc. Journal of Environmental Science and Technology, 49(24): 14537-14545. DOI: 10.1021/acs.est.5b03330 **(Journal)**

Lee, S., Kim, S., Kim, S. and Lee, I. 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnONPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. Environmental Science and Pollution Research, 20(2): 848-854. DOI: 10.1007/s11356-012-1069-8 **(Journal)**

Li, C. C., Dang, F., Li, M., Zhu, M., Zhong, H., Hintelmann, H. and Zhou, D. M. 2017. Effects of exposure pathwayson the accumulation and phytotoxicity of silver nanoparticles in soybean and rice. Nanotoxicology, 11: 699-709. DOI: 10.1080/17435390.2017.1344740 **(Journal)**

Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11: 591-592. https://doi.org/10.1042/bst0110591 **(Journal)**

Lu, Q., Zhang, T., Zhang, W., Su, C., Yang, Y., Hu, D. and Xu, Q. 2018. Alleviation of cadmium toxicity in Lemna minor by exogenous salicylic acid. Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety, 147: 500-508. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.015 **(Journal)**

Mahawar, L., Živčák, M., Barboricova, M., Kovár, M., Filaček, A., Ferencova, J., Vysoká, D.M. and Brestič, M. 2024. Effect of copper oxide and zinc oxide nanoparticles on photosynthesis and physiology of Raphanus sativus L. under salinity stress. Plant Physiology and Biochemistry, 206: 108281. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108281 **(Journal)**

Mahajan, P., Dhoke, S. K., Khanna, A. S. and Tarafdar, J. C. 2011. Effect of nano- ZnO on growth of mung bean (*Vigna radiata*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seedlings using plant agar method. Applied Biological Research, 13(2): 54-61. **(Journal)**

Magne, C., Saladin, G. and Clement, C. 2006. Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera*. Chemosphere, 62(4): 650-657. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.119 **(Journal)**

Maqsood, M. F., Shahbaz, M., Khalid, F., Rasheed, Y., Asif, K., Naz, N., Zulfiqar, U., Zulfiqar, F., Moosa, A., Alamer, K., Attia, H. 2023. Biogenic nanoparticles application in agriculture for ROS mitigation and abiotic stress tolerance: A review. Plant Stress, 10: 100281. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100281 **(Journal)**

Mazaheri Tirani, M., Madadkar-Haghjou, M., Sulieman, S. and Ismaili, A. 2018. Comparative evaluation of zinc oxide effects on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) grown in different media. Journal of Agricultural Science and Technology, 20(4): 787-802. **(Journal)**

Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies, 15(4). **(Journal)**

Molnár, Á., Papp, M., Kovács, D. Z., Bélteky, P., Oláh, D., Feigl, G. and Kolbert, Z. 2020. Nitro-oxidative signaling induced by chemically synthesized zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) in Brassica species. Chemosphere, 251: 126419. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126419 **(Journal)**

Maqsood, M. F., Shahbaz, M., Khalid, F., Rasheed, Y., Asif, K., Naz, N. and Attia, H. 2023. Biogenic nanoparticles application in agriculture for ROS mitigation and abiotic stress tolerance: A review. Plant Stress, 10: 100281. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100281 **(Journal)**

Mosquera-Sánchez, L. P., Arciniegas-Grijalba, P. A., Patiño-Portela, M. C., Guerra–Sierra, B. E., Muñoz-Florez, J. E. and Rodríguez-Páez, J. E. 2020. Antifungal effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on Colletotrichum sp., causal agent of anthracnose in coffee crops. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 25: 101579. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101579 **(Journal)**

Mostofa, M. G., Fujita, M. and Tran, L. S. P. 2015. Nitric oxide mediates hydrogen peroxide-and salicylic acid-induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Journal of Plant Growth Regulation, 77(3): 265-277. DOI: 10.1007/s10725-015-0061-y **(Journal)**

Panda, K. K., Golari, D., Venugopal, A., Achary, M. M, Phaomei, G., Parinandi, N. L., Sahu, H. K. and Panda, B. B. 2017. Green synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage in *Lathyrus sativus* L. root bioassay system. Antioxidants, 6(2): 35. https://doi.org/10.3390/antiox6020035 **(Journal)**

Perveen, S., Saeed, M., Parveen, A., Javed, M. T., Zafar, S. and Iqbal, N. 2020. Modulation of growth and key physiobiochemical attributes after foliar application of zinc sulphate ($ZnSO_4$) on wheat (*Triticum aestivum L.*) under cadmium (Cd) stress. Physiology and Molecular Biology of Plants, 26(9): 1787-1797. DOI: 10.1007/s12298-020-00861-8 **(Journal)**

Rodríguez-Salinas, P. and García-López J. I. 2021. Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate Impact Physiological Parameters and Boosts Lipid Peroxidation in Soil Grown Coriander Plants *(Coriandrum sativum)*. Molecules, 26:1998. https://doi.org/10.3390/molecules26071998 **(Journal)**

Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F. and Berruyer, R. 2013. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. Plant Methods, 9: 17. DOI: 10.1186/1746-4811-9-17 **(Journal)**

Roy, T. K., Islam, M. S., Mahiddin, N. A., Hossain, S. A., Biswas, T., Antu, U. B., Serity, S. A., Miti, J. F., Akter, S., Roy, S. and Biswas, A. 2025. Application of Nanoparticles (NPs) to Ameliorate Abiotic Stress in Economically Important Crop Species: a Potential Review. Journal of Crop Health, 77(1): 1-20. DOI: 10.1007/s10343-024-01069-6 **(Journal)**

Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovics, B. 1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of Phaseolus vulgaris. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 166(5-6): 387-392. https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30073-2 **(Journal)**

Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A. 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Springer, Dordrecht, 321-362. DOI: 10.1007/978-1-4020-3218-9-12 **(Chapter)**

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10): 4113-4117. DOI: 10.1021/jf9801973 **(Journal)**

Wang, L. J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G. J., Cheng, J. S. and Li, S. H. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. BMC Plant Biology, 10:1-10. DOI: 10.1186/1471-2229-10-34 **(Journal)**

Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J. L., Colvin, V. L., Braam, J. and Alvarez, P. J. J. 2013. Phytostimulation of poplars and arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag^+ at sublethal concentrations. Environmental Science and Technology, 47: 5442-5449. DOI: 10.1021/es4004334 **(Journal)**

Wang, S., Wu, B. D., Wei, M., Zhou, J. W., Jiang, K. and Wang, C. Y. 2020. Silver nanoparticles with different concentrations and particle sizes affect the functional traits of wheat. Biologia Plantarum, 64: 1-8. https://doi.org/10.32615/bp.2019.122 **(Journal)**

Wu, Q., Su N., Zhang, X., Liu, Y., Cui, J., Liang, Y. 2016. Hydrogen peroxide, nitric oxide and UV Resistance Locus and interact to mediate UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in *radish sprouts*. Scintific Report, 6(1): 29164. DOI: 10.1038/srep29164 **(Journal)**

Zhou, L., Zhou, L., Wu, H., Jing, T., Li, T., Li, J., Kong, L. and Zhu, F. 2024. Application of chlorophyll fluorescence analysis technique in studying the response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to cadmium stress. Sensors, 24(5): 1501. https://doi.org/10.3390/s24051501 **(Journal)**

Zoufan, P., Baroonian, M. and Zargar, B. 2020. ZnO nanoparticles-induced oxidative stress in *Chenopodium murale* L, Zn uptake, and accumulation under hydroponic culture. Journal of Environmental Science and Pollution Research, 27(10): 11066-11078. DOI: 10.1007/s11356-020-07735-2 **(Journal)**

Zucker, M. 1965. Induction of phenylalanine Deaminase by light and its relation to Chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiology, 40(5): 779-784. https://doi.org/10.1104/pp.40.5.779 **(Journal)**

Zinc oxide nanoparticles priming modulate correlation between antioxidative responses, growth and photosynthetic function in lemon balm plantlets

Ghader Habibi*

Received: March 19, 2025 Accepted: June 21, 2025

Abstract

The purpose of this research was to investigate the tolerance threshold of lemon balm plantlets (Melissa officinalis) under the influence of zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) toxicity. This experiment was conducted in the form of a completely randomized design in the form of pot cultivation in a perlite bed, and the plants were harvested after 28 days of treatment. The results showed that ZnONPs priming at 50 and 100 mg/l had a promoting effect on the seed germination percentage (SG), while ZnONPs stress at 2000 mg/l had an inhibitory effect. Lemon balm plants primed with 100 and 1000 mg/l ZnONPs exhibited higher synthesis of carotenoid pigments. A further increase in H2O2 content was observed in NP-primed plants, which was attendant with the high level of NO content as well as CAT activity. The results of growth parameters together with measurement of malondialdehyde (MDA) indicated that exposure to 2000 mg/l ZnONPs exerted more toxicity. Under ZnONPs stress at 2000 mg/l, the fluorescence intensity at the IP phase and the Fv/Fm of leaves showed a significant decrease compared to the control group. Principal component analysis (PCA) revealed that there is a high correlation between SG and chlorophyll fluorescence parameters as well as between SG and oxidant (H2O2 and MDA) attributes. Among the chlorophyll fluorescence parameters, Fv/Fm and Fv/Fo exhibit a strong correlation with SG values, which demonstrates that chlorophyll fluorescence techniques have great potential in elucidating the physiological mechanism of ZnONPs stress in lemon balm.

Keywords: Chlorophyll fluorescence; Correlation; Lemon balm; Malondialdehyde; Nitric oxide; Seed germination percentage; Zinc oxide nanoparticles

How to cite this article

Habibi, Gh. 2025 Zinc oxide nanoparticles priming modulate correlation between antioxidative responses, growth and photosynthetic function in lemon balm plantlets. Iranian Journal of Seed Science and Research, 12(1): 45-64. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2025.8928

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

*Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. ghabibi@pnu.ac.ir