

Research Paper

Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and Putrescine Foliar Application on Some Morphophysiological Characteristics and Activity of Antioxidant Enzymes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

Amrollah Bakhshi¹, Mahyar Gerami²  and Mohadeseh Amiri³

1- M.Sc. Graduate of Green Space Engineering, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran,

(Corresponding author: mahyar.gerami@yahoo.com)

3- Assistant Professor, Department of Rane and Watershed Management, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 18 December, 2024

Revised: 17 March, 2025

Accepted: 20 April, 2025

Extended Abstract

Background: Elicitors play an important role in the supply and absorption of nutrients in plants. They are also able to improve growth and increase the quantity and quality of the product through making changes in the main and systemic processes of plants. Biological applications of nanoparticles and polyamines and using them as plant growth regulators and elicitors are a promising tool for realizing sustainable agriculture. Nanoparticles and polyamines may differentially affect plants depending on plant species, concentrations, and application methods. Among the different nanoparticles, titanium dioxide (TiO₂) can improve the efficiency of the photosynthetic apparatus and increase the plant's ability to absorb sunlight, thereby affecting the conversion of solar energy into active electrons and chemical activities and increasing photosynthesis efficiency in plants. Putrescine polyamine is also effective on more physiological processes, such as seed germination, fruit and flower growth, delaying senescence, and plant responses to environmental stresses. So far, however, there are not enough studies about the effect of titanium nanoparticles and putrescine on the morphological, physiological, and biochemical processes of plants, especially in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Rosemary oil is one of the herbal medicines with proven antioxidant and antibacterial properties.

Methods: The effectiveness of different levels of TiO₂ nanoparticles (0, 50, 100, 200, and 400 ppm) and putrescine (0, 0.5, 1 and 1.5 mM) on the growth, physiological and biochemical traits of *R. officinalis* L., was investigated in a factorial experiment with a completely randomized design with three replications in the research greenhouse of the Sana Institute of Higher Education. The plants were sprayed once a week, and growth traits (plant height, the number of leaves, fresh weight and dry weight of aerial parts, and fresh weight and dry weight of root), physiological (the content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and carotenoid), and biochemical (activities of antioxidant enzymes including peroxidase and catalase, and percentage of free radical scavenging) traits were measured in the leaves of seedlings after 8 weeks. Before performing the analysis, the normality of data distribution and the homogeneity of variance of experimental errors were tested using the least significant difference (LSD) test, and the means were compared with Duncan's multi-tailed test at the 5% probability level.

Results: Scanning Electron Microscopy (SEM) confirmed the adsorption and translocation of titanium nanoparticles through plants upon experimental treatments. The analysis of variance was significant for the simple effect of TiO₂ nanoparticles and the simple effect of putrescine on all growth traits, amounts of chlorophyll pigments, phenol, and DPPH of *R. officinalis* ($p < 0.01$). The analysis of variance was also significant for the interaction effect of these two treatments on the number of leaves and fresh and dry weights of aerial parts ($p < 0.01$), fresh weight of root, and amounts of total chlorophyll and flavonoids of *R. officinalis* ($p < 0.05$). The mean comparison of treatments showed that the different concentrations of TiO₂ nanoparticles and putrescine caused an increase in all the growth traits, the content of chlorophyll pigments, and the biochemical characteristics of *R. officinalis*. The highest mean growth traits of *R. officinalis* were obtained at 200 ppm of nanoparticles and 1 mM of putrescine. The maximum chlorophyll and carotenoid contents were also obtained with 200 and 400 ppm of nanoparticles and 1 and 1.5 mM of putrescine. Likewise, the highest means of the biochemical traits of *R. officinalis* were obtained under the highest concentration of nanoparticles and putrescine. In fact, the applied treatments increased both dry matter production and photosynthesis, thereby raising the plant's performance



and its components. Titanium nanoparticles can increase fresh and dry weights of plants by improving light absorption, increasing nitrate absorption, and converting inorganic materials into organic materials. By increasing light absorption, oxidation and reduction reactions are stimulated in plants, after which the photosynthetic capacity of the plant increases and chloroplast aging is prevented. Since TiO_2 nanoparticles lead to more protein absorption, chlorophyll synthesis increases in the plant in this way. The role of putrescine in increasing plant growth is probably due to its antioxidant effect, helping to balance cations and anions, or acting as a nitrogen source. Because ethylene and polyamines have a common precursor for synthesis, as polyamines are made in the plant, the production of ethylene decreases, and as the amount of ethylene decreases, the degradation of photosynthetic pigments also decreases. In addition, the number of polyamines in the terminal meristem of the plant increases with the use of putrescine, resulting in an increase in plant growth. Polyamines start a chain of defense reactions, a result of which is an increase in the activity of antioxidant enzymes.

Conclusion: According to the obtained results in this study, TiO_2 nanoparticles at 200 and 400 ppm and putrescine at 1 and 1.5 mM through foliar application showed strong effects on the improvement of growth traits, antioxidant enzymes, and the content of photosynthetic pigments in *R. officinalis*. Therefore, the use of appropriate concentrations of TiO_2 nanoparticles and putrescine seems to be effective in increasing the content of active secondary metabolites in rosemary. It is suggested to study the effect of these treatments for longer experimental periods or on more species, which could be a suitable approach to find better and more reasonable results.

Keywords: Antioxidant activity, Chlorophyll content, Elicitors, Foliar solution, Titanium dioxide nanoparticles

How to Cite This Article: Bakhshi, A., Gerami, M., & Amiri, M. (2025). Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and Putrescine Foliar Application on Some Morphophysiological Characteristics and Activity of Antioxidant Enzymes in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *J Crop Breed*, 17(3), 74-87. DOI: 10.61882/jcb.2024.1574



مقاله پژوهشی

تأثیر محلول پاشی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و پوترسین بر برخی از خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

امرالله بخشی^۱، مهیار گرامی^۲ و محدثه امیری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی فضای سبز، مؤسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران
 ۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، مؤسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران، (نویسنده مسوول: mahyar.gerami@yahoo.com)
 ۳- استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۸ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱
 صفحه: ۷۴ تا ۸۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: محرک‌های رشد نقش مهمی را در تأمین و جذب عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان ایفا می‌کنند. همچنین، با ایجاد تغییراتی در فرایندهای اصلی و سامانه‌ای گیاهان، قادر به بهبود رشد و افزایش کمیت و کیفیت محصول می‌شوند. کاربردهای زیستی نانوذرات و پلی‌آمین‌ها و استفاده از آنها به‌عنوان تنظیم‌کننده و محرک رشد گیاهان، ابزار نویدبخشی برای تحقق کشاورزی پایدار است. نانوذرات و پلی‌آمین‌ها بسته به گونه گیاهی، غلظت و روش استفاده می‌توانند اثرات مختلفی بر روی گیاهان داشته باشند. در بین انواع مختلف نانوذرات، دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂) می‌تواند کارایی دستگاه فتوسنتزی را بهبود بخشد و توانایی گیاه را برای جذب نور خورشید افزایش دهد که از این طریق، بر تبدیل انرژی نورانی خورشید به الکترون فعال و فعالیت‌های شیمیایی اثر گذاشته، سبب افزایش کارایی فتوسنتز در گیاه می‌شود. پلی‌آمین پوترسین نیز بر بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک مانند جوانه‌زنی بذر، رشد و نمو میوه و گل، به تأخیر انداختن پیری، و پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی مؤثر است. اما تاکنون مطالعات چندانی پیرامون تأثیر توأم نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر فرایندهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان به‌خصوص گیاه دارویی رزماری صورت نگرفته است. عصاره گیاه رزماری یکی از مواد دارویی گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی است که اثرات درمانی آن به اثبات رسیده است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی تأثیر کارایی سطوح مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام) و پوترسین (صفر، ۱/۵ و ۱/۵ میلی‌مولار) بر خصوصیات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه رزماری، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مؤسسه آموزش عالی سنا اجرا شد. محلول پاشی گیاهان هفته‌ای یکبار انجام شد و صفات رشدی (ارتفاع، تعداد برگ، وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی، وزن تر و وزن خشک ریشه)، فیزیولوژیک (محتوای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید) و بیوشیمیایی (فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز و کاتالاز) و درصد مهار رادیکال آزاد) در برگ نهال‌ها پس از هشت هفته مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. پیش از انجام تجزیه و تحلیل، نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس خطاهای آزمایشی، با آزمون تک‌نمونه کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: آنالیز تصاویر میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM)، جذب و انتقال نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم توسط گیاه رزماری در تیمارهای آزمایشی را تأیید نمود. آنالیز واریانس اثر ساده نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم و همچنین اثر ساده پوترسین بر تمام صفات رشدی، مقادیر رنگیزه‌های کلروفیلی، ترکیبات ثانویه فنل و فلاونوئید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و DPPH گیاه رزماری معنی‌دار بود ($p < 0/01$). اما آنالیز واریانس اثر برهمکنشی این دو تیمار بر تعداد برگ و وزن تر و وزن خشک اندام هوایی ($p < 0/01$)، وزن تر ریشه، مقدار کلروفیل کل و فلاونوئید گیاه رزماری ($p < 0/05$) معنی‌دار گزارش شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که به‌کارگیری غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و پوترسین سبب افزایش تمام صفات رشدی، مقادیر رنگیزه‌های کلروفیلی و خصوصیات بیوشیمیایی گیاه رزماری شد. بیشترین میانگین صفات رشدی گیاه رزماری در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات و یک میلی‌مولار پوترسین، و حداکثر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید آن نیز در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات و سطوح یک و ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین حاصل شد. همچنین، صفات بیوشیمیایی گیاه رزماری تحت بالاترین غلظت نانوذرات و پوترسین بیشترین میانگین را به‌خود اختصاص دادند. در واقع، تیمارهای مورد استفاده با افزایش تولید ماده خشک و نیز افزایش فتوسنتز سبب افزایش عملکرد گیاه و اجزای آن می‌شوند. نانوذرات تیتانیوم می‌توانند وزن تر و خشک گیاهان را از طریق بهبود جذب نور، افزایش جذب نیترات و تبدیل مواد غیر آلی به مواد آلی افزایش دهند. با افزایش جذب نور، واکنش اکسایش و کاهش در گیاهان تحریک می‌شود که در نتیجه آن ظرفیت فتوسنتزی گیاه افزایش می‌یابد و از پیری کلروپلاست ممانعت به‌عمل می‌آید. همچنین، از آنجایی که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم منجر به جذب بیشتر پروتئین می‌شوند، سنتز کلروفیل در گیاه از این طریق نیز افزایش می‌یابد. نقش پوترسین در افزایش رشد گیاه نیز احتمالاً به‌دلیل اثر آنتی‌اکسیداتیوی آن، کمک به تعادل کاتیون و آنیون و یا عمل به‌عنوان منبع ازت است. همچنین، با توجه به این که اتیلن و پلی‌آمین‌ها پیش‌ماده مشترکی برای سنتز دارند، با ساخته شدن پلی‌آمین‌ها در گیاه، ساخت اتیلن کاهش می‌یابد و با کم شدن میزان اتیلن، تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی نیز کم می‌شود. علاوه بر این، با کاربرد پوترسین، میزان پلی‌آمین‌ها در مریستم انتهایی گیاه افزایش می‌یابد و در نتیجه رشد گیاه بیشتر می‌شود. پلی‌آمین‌ها زنجیره‌ای از واکنش‌های دفاعی را راه‌اندازی می‌کنند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یکی از نتایج آن است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده، غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و سطوح یک و ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین به‌روش محلول پاشی برگی بیشترین تأثیر را بر بهبود صفات رشدی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه رزماری گذاشت. بنابراین، می‌توان گفت که استفاده از غلظت‌های مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و پوترسین به‌منظور افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه مهم گیاه رزماری مؤثر است. همچنین، مطالعات در مورد تأثیر این تیمارها برای دوره‌های آزمایش طولانی‌تر و نیز سایر گونه‌ها می‌تواند راه مناسبی برای حصول نتایج بهتر و مستدل‌تر باشد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای کلروفیلی، محرک‌های رشد، محلول پاشی، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم

مقدمه

انباشته شدن مواد دارویی در بدن جلوگیری می‌کنند. عوارض جانبی کم یا عدم وجود عوارض جانبی داروهای گیاهی در دهه‌های اخیر توجه محققین به گیاهان دارویی را به‌خود جلب

گیاهان دارویی به‌علت وجود مواد مؤثره طبیعی و همراه بودن این مواد مؤثره با مواد دیگر تعادل بیولوژیک ایجاد کنند و از

در تنظیم فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک نقش مهمی ایفا می‌کنند (Chen et al., 2019).

تحقیقات پیرامون اثرات نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و پوترسین بسته به غلظت و اندازه آنها، واکنش‌پذیری، ساختار شیمیایی، سطح و گونه گیاهی رویکردهای مختلفی را نشان می‌دهند. از جمله این تحقیقات، تأثیر محلول پاشی پوترسین و نیترات کلسیم بر برخی صفات فیزیولوژیکی کنجد (*Sesamum indicum* L.) در سطح مختلف رطوبتی (Gholipour et al., 2020)، اثر محلول پاشی پوترسین بر رشد، عملکرد و کیفیت میوه فلفل شیرین تحت تنش کم‌آبی (Alizadeh et al., 2017)، کاربرد پوترسین و کودهای زیستی بر دوره پر شدن دانه، محتوای کلروفیل و عملکرد گندم (Mohseni et al., 2021)، بررسی برخی ویژگی‌های رشدی، زیست‌شیمیایی و پس از برداشتی گل بریدنی رز رقم آوالنچ با کاربرد همزمان سدیم نیتروپروپوساید و پوترسین (Abdi & Jabbarzadeh, 2022)، و اثر محلول پاشی پوترسین بر رشد و تحمل بالنگوی شهری (*Lallemantia iberica*) به تنش سرب (Ansari et al., 2021) هستند.

با توجه به موارد فوق‌الذکر، به منظور بهبود عملکرد کمی و کیفی گیاه رزماری به عنوان یک گیاه دارویی و زینتی مورد استفاده در عرصه‌ها و فضاهای سبز شهری، بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک آن به محرک‌های رشد شامل نانوذرات و پلی‌آمین‌ها ضرورت دارد. در این راستا، تأثیر دو ماده نانوذرات تیتانیوم و پوترسین را بر صفات رویشی، میزان سبزی‌نگی و برخی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری بررسی و مقایسه شد و نیز مناسب‌ترین میزان مصرف این مواد در مطالعه حاضر تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش بر روی گیاه رزماری در گلخانه تحقیقاتی مؤسسه آموزش عالی سنا واقع در شهرستان ساری، استان مازندران، در سال ۱۴۰۲ انجام شد. ابتدا گیاهچه‌های هم‌اندازه گیاه رزماری با ارتفاع متوسط ۲۷ سانتیمتر از شرکت سبزپروان شکوه گلستان تهیه گردیدند و سپس در بستر پیت ماس و پرلیت با نسبت ۶۰:۴۰ قرار گرفتند. ۶۰ گلدان ۱/۵ کیلوگرمی با ارتفاع و قطر ۱۷ سانتیمتر در نظر گرفته شد و در هر گلدان اقدام به کشت یک نشاء شد. گلدان‌های حاوی گیاهچه رزماری به گلخانه با ۱۶ ساعت روشنایی (۸۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ لوکس نور) و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۶۰٪ و میانگین دمایی ۵ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. دو هفته پس از استقرار گیاهچه‌ها، تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح پلی‌آمین پوترسین (غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار) و پنج سطح نانوذرات تیتانیوم (غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام) محلول پاشی برگی شدند. نیاز تغذیه‌ای گیاهچه‌ها از طریق محلول هوکلند تأمین گردید و محلول پاشی گیاهان هفته‌ای یکبار به وسیله آبی‌اش در صبح انجام شد. بعد از هشت هفته، گیاهان جهت سنجش‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

کرده است (Nasri, 2012). با وارد نمودن گیاهان دارویی به فهرست گیاهان مورد استفاده برای فضای سبز، جامعه گیاهان دارویی گسترش قابل توجهی پیدا می‌کند و بخشی از هزینه‌های صرف‌شده قابل بازیافت است. یکی از گیاهان دارویی مهم که علاوه بر کاربرد در طب سنتی و مدرن، برای طراحی فضای سبز نیز مناسب است، رزماری یا اکلیل کوهی با نام علمی *Rosmarinus officinalis* L. است. رزماری گیاهی است بوته‌ای، پایا و همیشه‌سبز متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و بومی مدیترانه، با شاخه‌های افراشته، برخاسته و گهگاه خوابیده بر روی زمین به رنگ سبز و قهوه‌ای. گل‌های آن نوش فراوان با بوی قوی و مطبوع ایجاد می‌کنند و برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار گیاه دارای مصارف دارویی هستند (Salehi Sardoei, 2021). دلیل استفاده از رزماری در زیباسازی فضاهای سبز شهری، تحمل آن به خشکی، شوری و قلیایی بودن خاک است (Ghasemi et al., 2018).

در چند دهه اخیر، استفاده از انواع کودهای جدید مانند نانوکودها به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد و افزایش تولید مواد مؤثره توجه طیف وسیعی از دانشمندان علوم گیاهی را به خود جلب نموده است. تأثیر نانوذرات به ترکیب، اندازه، غلظت، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها و نیز به گونه گیاهی، مرحله رشدی آن، روش و مدت زمان قرارگیری در معرض آن بستگی دارد (Paryan et al., 2020). نانوذرات با سلول‌های گیاهان برهمکنش دارند و بسته به خواص‌شان، تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی زیادی را در گیاه به وجود می‌آورند. در واقع، نانوذرات به دلیل دارا بودن سطح ویژه زیاد می‌توانند سبب جذب و انتقال بیشتر آب و مواد معدنی در گیاهان شوند و همچنین، به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان برای واکنش‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی عمل کنند (Hatami et al., 2016). ترکیبات نانو به دلیل کوچک بودن و حلالیت بالا به سرعت توسط گیاهان جذب می‌شوند، بنا بر این، با کاربرد آنها شرایط بهینه برای رشد گیاه ایجاد و از ایجاد شرایط تنش‌زا در گیاه جلوگیری می‌شود (Mahdi Nezhad et al., 2019). در بین انواع مختلف نانوذرات، دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂) می‌تواند کارایی دستگاه فتوسنتزی را بهبود بخشد و توانایی گیاه را برای جذب نور خورشید افزایش دهد که از این طریق، بر تبدیل انرژی نورانی خورشید به الکترون فعال و فعالیت‌های شیمیایی اثر می‌گذارد و سبب افزایش کارایی فتوسنتز در گیاه می‌شود. تیتانیوم به‌عنوان یک عنصر سودمند سبب افزایش و تحریک رشد می‌گردد و می‌تواند جذب عناصری نظیر فسفر، کلسیم، منیزیم، نیتروژن، منگنز، روی و آهن و در نتیجه محصول دهی گیاهان را افزایش دهد (Rasouli et al., 2016).

پلی‌آمین‌ها نیز بر بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند جوانه‌زنی بذر، رشد و نمو میوه و گل، به تأخیر انداختن پیری، و پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده مؤثرند (Alcázar et al., 2010). پلی‌آمین‌ها دسته‌ای از ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم و دارای دو یا چند گروه آمینه هستند که تقریباً در تمام موجودات زنده یافت می‌شوند. پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین از عمده ترکیبات در گیاهان هستند که

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک

ابتدا تعداد برگ‌های اولیه برای هر گلدان حاوی رزماری شمارش گردید و سپس ارتفاع گیاهان توسط خط‌کش بر حسب سانتیمتر اندازه‌گیری شد. وزن تر اندام‌های هوایی و وزن تر ریشه با ترازو مورد سنجش قرار گرفت. به‌منظور تعیین وزن خشک (بیوماس) اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان، نمونه‌های تر اندام‌های هوایی گیاه و ریشه به‌طور جداگانه به‌مدت ۴۸ ساعت یا بیشتر (تا زمان تثبیت وزن خشک نهایی) در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از خشک شدن، وزن خشک آنها با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شد.

بررسی صفات فیزیولوژیک**سنجش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید**

جهت سنجش میزان کلروفیل از روش آرنون (Arnon, 1949) استفاده شد. بدین ترتیب که ۰/۵ گرم از هر نمونه برگ در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به‌خوبی توسط هاون چینی همگن گردید و پس از انجام سانتریفیوژ با ۱۳۰۰۰ rpm و ۴ دما درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، فاز بالایی نمونه‌ها برداشت و حجم آن به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس میزان جذب نور محلول حاصله با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV 180) در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر قرئت گردید و مقادیر کلروفیل a، b و مجموع آنها و کاروتنوئید برحسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر با استفاده از روابط (۱) تا (۴) بدست آمدند:

$$a \text{ کلروفیل} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V/100W \quad (1)$$

$$b \text{ کلروفیل} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V/100W \quad (2)$$

$$a + b \text{ کلروفیل کل} \quad (3)$$

$$(4) \text{ کاروتنوئید} = (1000A_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b)/198$$

در روابط فوق، V حجم نمونه، W وزن تر نمونه و A جذب نوری عصاره هستند.

بررسی صفات بیوشیمیایی**استخراج عصاره**

استخراج ترکیبات فنلی از بافت‌های مختلف گیاه بر اساس روش تیجسن و همکاران (Thygesen et al., 2007) با کمی تغییر انجام شد. به این منظور، ابتدا نمونه‌های خشک اندام‌های مختلف گیاه (برگ، گل، ساقه و ریشه) توسط دستگاه آسیاب پودر و از الک ۴۰ مش عبور داده شدند. سپس، ده میلی‌لیتر متانول: آب (به حجم ۷۰:۳۰) به ۰/۱۱ گرم از پودر لک‌شده اضافه شد. نمونه‌ها پس از ورتکس کوتاه، به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک با بسامد ۴۰ کیلوهرتز قرار داده شدند و پس از آن به‌مدت دو ساعت تکان داده شدند. عصاره‌های متانولی به‌دست آمده در دور ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و فازهای رویی آن‌ها جدا شدند. عمل سانتریفیوژ دو بار انجام شد. نمونه‌های به‌دست آمده تا زمان تجزیه شیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش مقدار فلاونوئیدها

جهت سنجش مقدار فلاونوئیدها از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. ابتدا به ۱۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده، به‌ترتیب ۱۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۳۰ درصد، ۱۵۰

میکرولیتر نیتريت سدیم ۰/۵ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۰/۳ میلی‌مولار اضافه و بلافاصله به هم زده شد. پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک میلی‌مولار اضافه شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر ثبت شد. سپس میزان فلاونوئید کل با استفاده از رسم منحنی استاندارد کوئرستین بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره محاسبه و بیان شد (Chang et al., 2002).

سنجش فنل کل

جهت سنجش مقدار فنل کل از معرف فولن-سیکالتو و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد (Singleton et al., 1999). ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم اسید گالیک با متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلول ۱۰ درصد فولین (۱۰ میلی‌لیتر فولین با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد) و ۷/۵ درصد کربنات سدیم (۷/۵ گرم کربنات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد) تهیه شد. به‌علت بالا بودن غلظت ترکیبات فنلی، ابتدا نمونه‌ها ۱۰ بار رقیق شدند. سپس ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره متانولی استخراج شده با ۳۷۵ میکرولیتر آب و ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد شدند. پس از ۶ دقیقه، به مخلوط حاصل ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. میزان جذب مخلوط واکنش پس از ۹۰ دقیقه نگهداری در شرایط بدون نور در طول موج ۷۶۰ نانومتر، به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، مقدار فنل کل با استفاده از رسم منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم اکی‌والان اسید گالیک در یک گرم ماده خشک محاسبه و بیان شد. درصد رقیق کردن نیز در محاسبات منظور گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی**استخراج محلول آنزیمی**

جهت استخراج محلول‌های آنزیمی کاتالاز و پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه برگی در هاون چینی سائیده شد و سپس به آن ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=7) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه گردید. محلول‌های به‌دست آمده پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. به‌منظور جلوگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، محلول آنزیمی تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Sairam & Saxena, 2000). آنزیم آسکوربات پراکسیداز در محیط خارج از سلول دوام کمی دارد، به‌گونه‌ای که برخی ایزوزیم‌های آن، نیمه‌عمر کمتر از دو دقیقه در محیط‌های با غلظت کم آسکوربات دارند. از این‌رو، جهت حفظ ساختار و پایداری آن به محلول استخراج آنزیم پلی وینیل پیرولیدین (۵٪) و آسکوربات دو میلی‌مولار اضافه گشت و در موارد دیگر، آنزیم آسکوربات پراکسیداز مشابه آنزیم‌های فوق استخراج شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، ابتدا ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۹۸۰ میکرولیتر بافر فسفات حاوی آب اکسیژنه دو میلی‌مولار مخلوط شدند و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر بر حسب

$$\%I = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100 \quad (5)$$

طرح آزمایشی و آنالیز آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار طراحی گردید. پیش از انجام تجزیه و تحلیل، نرمال بودن توزیع داده‌ها و همگنی واریانس خطاهای آزمایشی، با آزمون تک‌نمونه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS V9.2 انجام شد و میانگین‌ها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

آنالیز نتایج عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات مشخص شده در سطح برگ، جذب و انتقال نانوذرات تیتانیوم توسط گیاه در تیمارهای آزمایشی را تأیید نمود. طبق تصاویر بدست آمده، نانوذرات تیتانیوم به شکل کروی بودند (شکل ۱).

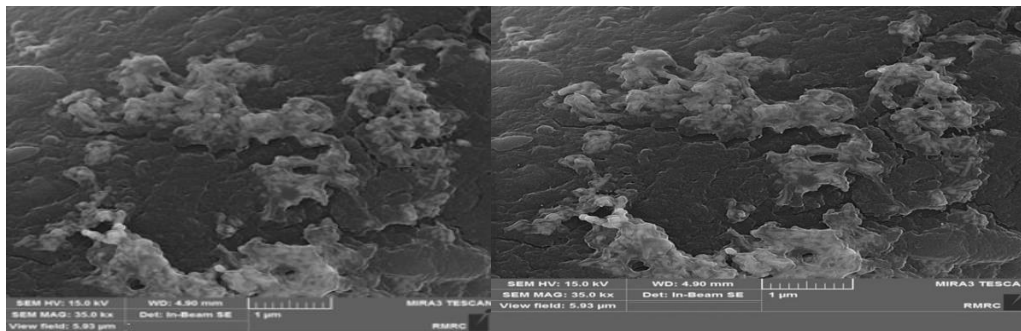
میکروگرم پروتئین در دقیقه قرائت شد (Cacmak & Horst, 1991).

سنجش آنزیم پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (دو میلی‌لیتر) حاوی ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH = 7)، ۱ میلی‌لیتر پراکسیداز ۱۵ میلی‌مولار، ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شد. واکنش با اضافه نمودن محلول آنزیمی شروع شد و تغییرات جذب بلافاصله در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی بر اساس میزان تترآگایاکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی $1/33 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Tang & Newton, 2005) به دست آمد.

سنجش فعالیت درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH)

جهت سنجش درصد مهار رادیکال آزاد، ۲ میلی‌لیتر از عصاره با ۲ میلی‌لیتر از محلول متانولی ۰/۰۰۰۴ درصد DPPH مخلوط شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد متانول قرائت شد و درصد مهار رادیکال آزاد (%I) هر عصاره به کمک فرمول ذیل محاسبه گردید (Miliauskas et al., 2004):



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات تیتانیوم بر روی برگ گیاه رزماری

Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of titanium nanoparticles on the rosemary leaf

همچنین، آنالیز واریانس اثر برهمکنشی این دو تیمار بر تعداد برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر ریشه گیاه معنی‌دار شد (جدول ۱).

آنالیز واریانس اثر ساده نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر ارتفاع، تعداد برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و همچنین وزن تر و خشک ریشه گیاه رزماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر برخی صفات رشدی گیاه رزماری

Table 1. ANOVA of titanium nanoparticles and putrescine effects on some growth traits of rosemary							
میانگین مربعات وزن خشک ریشه	میانگین مربعات وزن تر ریشه	میانگین مربعات وزن خشک اندام هوایی	میانگین مربعات وزن تر اندام هوایی	میانگین مربعات تعداد برگ	میانگین مربعات ارتفاع	درجه آزادی	تیمارها
Mean square of dry weight of root	Mean square of wet weight of root	Mean square of dry weight of arial parts	Mean square of wet weight of arial parts	Mean square of the number of leaves	Mean square of height	df	Treatments
1.604**	9.703**	9.933**	78.715**	4656.875**	75.108**	4	نانوذره تیتانیوم
0.705**	3.993**	4.637**	49.89**	26301.244**	87.244**	3	Titanium nanoparticles
0.117 ^{ns}	0.846 [*]	0.612**	4.88**	2166.508**	7.286 ^{ns}	12	پوترسین
0.077	0.403	0.164	1.418	728.95	8.083	40	نانوذره تیتانیوم × پوترسین
9.224	6.490	4.889	4.264	7.662	6.694		Titanium nanoparticles × Putrescine
							خطا
							Error
							ضریب تغییرات (درصد)
							CV (%)

*، ** به ترتیب اثرات معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.
*، ** indicate significant effects and ns shows no significance effect at probability levels of 5% and 1%.

شد که این امر از طریق افزایش طول میانگره‌ها سبب افزایش ارتفاع بوته گردید (Faraji-Mehmany *et al.*, 2016). همچنین، با افزایش سطوح پلی‌آمین پوترسین، وزن خشک ریشه روند افزایشی نسبت به نمونه شاهد نشان داد. به‌گونه‌ای که غلظت یک میلی‌مولار از پوترسین بیشترین مقدار وزن خشک ریشه را با ۳/۳۱ گرم ثبت نمود که نسبت به نمونه شاهد با ۱۸/۶ درصد افزایش گزارش شد (جدول ۲). نتایج مشابهی نیز مبنی بر این که کاربرد پوترسین سبب افزایش وزن خشک ریشه می‌شود، گزارش شده‌اند (Ansari *et al.*, 2021; Mohseni Mohammadjanlou *et al.*, 2021). در واقع، با توجه به این که اتیلن و پلی‌آمین‌ها پیش‌ماده مشترکی برای سنتز دارند، با ساخته‌شدن پلی‌آمین‌ها در گیاه، ساخت اتیلن کاهش می‌یابد و با کم‌شدن میزان اتیلن، تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی نیز کم می‌شود (Alcázar *et al.*, 2006). علاوه بر این، با کاربرد پوترسین، میزان پلی‌آمین‌ها در مرستم انتهایی گیاه افزایش یافته، در نتیجه رشد گیاه بیشتر می‌شود (Farooq *et al.*, 2009).

مقایسه میانگین اثر نانوذرات تیتانیوم بر ارتفاع گیاه رزماری حاکی از این بود که با افزایش غلظت نانوذرات (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام)، ارتفاع گیاه افزایش یافت، به‌گونه‌ای که در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام، ارتفاع با ۴۵/۳۳ سانتی‌متر بیشترین میزان را به‌خود اختصاص داد، اما در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام از نانوذرات تیتانیوم، مقدار ارتفاع نسبت به نمونه شاهد روند کاهشی نشان داد. مقایسه میانگین اثر ساده پوترسین بر ارتفاع گیاه رزماری نشان داد که به‌کارگیری غلظت‌های مختلف این محرک منجر به روند افزایشی در ارتفاع گیاهان مورد مطالعه گردید، به‌گونه‌ای که در غلظت یک میلی‌مولار پوترسین با ۴۵/۶۶ سانتی‌متر ارتفاع، بیشترین مقدار را نشان داد که نسبت به نمونه شاهد ۱۳/۷ درصد افزایش داشت (جدول ۲). افزایش ارتفاع به واسطه استفاده از پوترسین مربوط به نقش این تیمار در افزایش تقسیم سلولی و طول شدن سلول است که در نهایت رشد گیاه را بهبود می‌بخشد (Ansari *et al.*, 2021). مشابه با نتایج این پژوهش، در بررسی اثر تیمار پوترسین بر گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) گزارش شده است که محلول‌پاشی با پوترسین از طریق تولید آنزیم‌های بیوسنتزکننده باعث بهبود رشد رویشی

جدول ۲- مقایسه میانگین ارتفاع و وزن خشک ریشه گیاه رزماری تحت سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم و پوترسین

Table 2. Mean comparisons of the height and dry weight of roots under different levels of titanium nanoparticles and putrescin

وزن خشک ریشه Dry weight of root	ارتفاع Height	تیمار Treatment
2.48±0.42 c	41±3.83 ^{bc}	NTi0
2.80±0.40 b	42.66±3.11 ^{ab}	NTi1
3.29±0.27 a	44.25±3.30 ^{ab}	NTi2
3.34±0.28 a	45.33±3.82 ^a	NTi3
3.16±0.32 a	39.08±3.34 ^c	NTi4
0.324	3.315	LSD
2.79±0.54 ^b	40.13±3.15 ^b	Pu0
3.02±0.49 ^b	42.86±4.76 ^b	Pu1
3.31±0.39 ^a	45.66±3.47 ^a	Pu2
2.94±0.29 ^b	41.2±2.45 ^b	Pu3
0.272	2.782	LSD

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Each column of means with at least one letter in common are not significantly different.

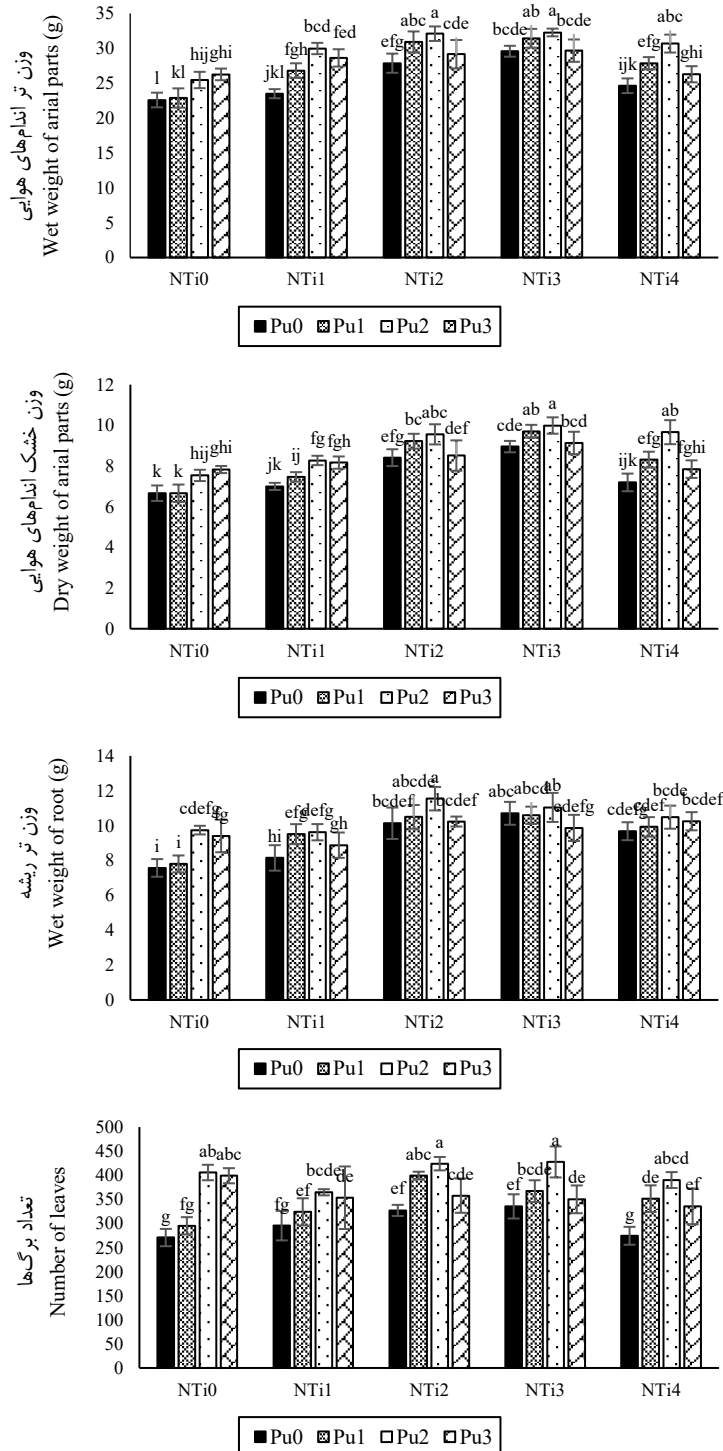
NTi0: 0, NTi1: 50, NTi2: 100, NTi3: 200 and NTi4: 400 ppm; Pu0: 0, Pu1: 0.5, Pu2: 1 and Pu3: 1.5 mM.

همچنین، در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات، با افزایش مقدار پوترسین، وزن تر ریشه روند افزایشی نسبت به نمونه شاهد داشت و بیشترین مقدار وزن تر ریشه مربوط به تیمار NTi2Pu2 (غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات تیتانیوم و غلظت ۱ میلی‌مولار پوترسین) بود. مقایسه میانگین اثر تیمارها بر تعداد برگ گیاه رزماری نیز نشان داد که در سطوح مختلف نانوذرات، با افزایش مقادیر پوترسین، تعداد برگ روند افزایشی نسبت به نمونه شاهد داشت. سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات و غلظت ۱ میلی‌مولار پوترسین به ترتیب با ۴۲۴ و ۴۲۷ عدد برگ، بیشترین مقادیر را در این صفت به‌خود اختصاص دادند (شکل ۲). نتایج پژوهش قبلی نشان دادند که محلول‌پاشی با پوترسین بر گیاه فلفل شیرین (*Capsicum annum* cv. Dimaz) منجر به افزایش تعداد برگ و ارتفاع بوته گردید (Alizadeh *et al.*, 2017). نقش پوترسین در افزایش رشد گیاه احتمالاً به دلیل اثر آنتی‌اکسیداتیوی آن، کمک به تعادل کاتیون و آنیون و یا عمل به‌عنوان منبع ازت است (Hajiboland & Ebrahimi, 2011).

مقایسه میانگین اثر برهمکنشی نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر مقادیر وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه رزماری حاکی از آن بود که در سطوح مختلف پوترسین با افزایش مقادیر نانوذرات تیتانیوم، مقدار این صفت روند افزایشی داشت. همچنین، سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات و ۱ میلی‌مولار پوترسین بیشترین مقادیر وزن تر اندام هوایی را به ترتیب با ۳۲/۰۹ گرم و ۳۲/۲۶ گرم نشان دادند (شکل ۲). در پژوهشی (Gupta & Tripathi, 2011) مشخص شد که محلول‌پاشی نانوذرات تیتانیوم منجر به افزایش وزن تر و خشک گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea*)، محتوای کلروفیل، میزان فتوسنتز و افزایش فعالیت آنزیم‌های رایبوسکو گردید. تحقیقات (Nair *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010) نشان می‌دهند که نانوذرات تیتانیوم می‌توانند وزن تر و خشک گیاهان را از طریق بهبود جذب نور، افزایش جذب نیترات و تبدیل مواد غیر آلی به مواد آلی افزایش دهند. این نانوذرات سبب تحریک تقسیم سلولی، افزایش اندازه سلول و تحریک القای کالوس در شرایط تاریک می‌شوند و ممکن است بر هورمون‌های گیاهی از قبیل سیتوکینین و جیبرلین تأثیر بگذارند (Mandeh *et al.*, 2012).

فلفل شیرین (Alizadeh *et al.*, 2017) و ریحان (Farsari *et al.*, 2019) شد.

برخی گزارش‌ها نشان دادند که پوترسین موجب افزایش ارتفاع گیاه، تعداد برگ، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی در برخی گیاهان مانند توت فرنگی (Akbari *et al.*, 2017).



شکل ۲- اثر متقابل سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، وزن تر ریشه و تعداد برگ‌های گیاه رزماری (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند).

Figure 2. The interaction effects of different levels of titanium nanoparticles and putrescine on wet weight and dry weight of aerial parts, wet weight of roots, and the number of leaves in rosemary (in each treatment, common letter(s) indicate non-significant differences at the 5% level)

وارپانس اثر برهمکنشی نانوذرات تیتانیوم و پوترسین فقط بر کلروفیل کل در سطح پنج درصد معنی دار شد (جدول ۳).

آنالیز واریانس اثرات ساده نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر مقادیر رنگیزه‌های کلروفیلی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) در سطح یک درصد معنی دار بود، ولی آنالیز

جدول ۳- آنالیز واریانس اثر نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه رزماری
Table 3. ANOVA of titanium nanoparticles and putrescine effects on photosynthetic pigments of rosemary

میانگین مربعات کاروتنوئید Mean square of carotenoids	میانگین مربعات کلروفیل کل Mean square of total chlorophyll	میانگین مربعات کلروفیل b Mean square of chlorophyll b	میانگین مربعات کلروفیل a Mean square of chlorophyll a	درجه آزادی df	تیمار Treatment
0.0047**	0.289**	0.053**	0.102**	4	نانوذره تیتانیوم Titanium nanoparticle
0.006**	0.468**	0.161**	0.082**	3	پوترسین Putrescine
0.0001 ^{ns}	0.012*	0.009 ^{ns}	0.005 ^{ns}	12	نانوذره تیتانیوم × پوترسین Titanium nanoparticle × Putrescine
0.0001	0.0064	0.0048	0.0034	40	خطا Error
9.155	3.487	8.174	4.031		ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

ns، **، *** به ترتیب اثر معنی دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهند.

ns، **، *** indicate significant effects and ns shows no significant effect at probability levels of 5% and 1%.

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثبات شد. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با افزایش جذب فوتون موجب تحریک واکنش اکسایش و کاهش در گیاهان می‌شوند که در نتیجه منجر به افزایش ظرفیت فتوسنتزی گیاه و ممانعت از پیری کلروپلاست می‌شود (Ma et al., 2010). همچنین، از آنجایی که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم منجر به جذب بیشتر پروتئین می‌شوند، میزان سنتز کلروفیل در گیاه از این طریق نیز افزایش می‌یابد (Yang et al., 2006). چنانچه در مورد مشابهی نیز گزارش شد که این نانوذرات از طریق تسریع فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز، موجب افزایش سنتز اسیدهای آمینه و کلروفیل و متعاقب آن افزایش فتوسنتز شدند (Saber et al., 2019).

مقایسه میانگین اثر ساده نانوذرات تیتانیوم بر مقادیر رنگیزه‌های کلروفیلی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) گیاه رزماری حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانوذره، مقادیر این صفات روند افزایشی نسبت به نمونه شاهد نشان دادند، به گونه‌ای که در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام از این نانوذرات، مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل به ترتیب با ۱/۵۶، ۰/۹۲ و ۲/۴۹ میلی‌گرم بر گرم بافت تر بیشترین مقادیر را نسبت به تیمارهای مورد مطالعه نشان دادند که نسبت به نمونه شاهد به ترتیب ۱۶/۳۵، ۱۵ و ۱۶/۴۱ درصد افزایش داشتند (جدول ۴). در مطالعات مختلفی (Gholami et al., 2020; Rasouli et al., 2016) تجمع کلروفیل و افزایش محتوای کاروتنوئیدها (Akhavan hezaveh, 2023) به دنبال محلول‌پاشی برگی

جدول ۴- مقایسه میانگین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه رزماری تحت سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم و پوترسین
Table 4. Mean comparisons of photosynthetic pigments of rosemary under different levels of titanium nanoparticles and putrescin

کاروتنوئید Carotenoids	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	تیمار Treatment
0.10±0.01 ^c	2.14±0.19 ^c	0.80±0.14 ^{bc}	1.34±0.08 ^c	NTi0
0.12±0.02 ^b	2.14±0.18 ^c	0.77±0.13 ^c	1.37±0.07 ^c	NTi1
0.12±0.02 ^b	2.38±0.14 ^b	0.90±0.12 ^a	1.48±0.06 ^b	NTi2
0.14±0.02 ^a	2.49±0.18 ^a	0.92±0.10 ^a	1.56±0.09 ^a	NTi3
0.15±0.02 ^a	2.35±0.19 ^b	0.85±0.10 ^{ab}	1.49±0.12 ^b	NTi4
0.013	0.093	0.081	0.068	LSD
0.11±0.02 ^c	2.07±0.15 ^c	0.71±0.09 ^c	1.36±0.09 ^c	Pu0
0.11±0.02 ^c	2.25±0.21 ^b	0.82±0.12 ^b	1.43±0.10 ^b	Pu1
0.14±0.03 ^b	2.44±0.15 ^a	0.91±0.09 ^a	1.52±0.09 ^a	Pu2
0.15±0.02 ^a	2.44±0.15 ^a	0.94±0.06 ^a	1.49±0.12 ^a	Pu3
0.011	0.078	0.068	0.057	LSD

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی داری با هم ندارند.

Each column of means with at least one letter in common are not significantly different.

NTi0: 0, NTi1: 50, NTi2: 100, NTi3: 200 and NTi4: 400 ppm; Pu0: 0, Pu1: 0.5, Pu2: 1 and Pu3: 1.5 mM.

افزایش محتوای کلروفیل پس از کاربرد پوترسین که در مطالعات مختلفی (Akbari et al., 2017; Alizadeh et al., 2017; Baniyadi et al., 2015; Mohseni Mohammadjanlou et al., 2021) ثابت شده است، به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی آنها است که از تخریب ساختار غشای کلروپلاست جلوگیری می‌کنند و در نتیجه منجر به دریافت نور بیشتر برای بهبود فتوسنتز می‌شوند (Rezaiean et al., 2023). در مطالعه‌ای بر روی گیاه استویا (Stevia rebaudiana B.) مشخص شد که به‌کارگیری پوترسین با

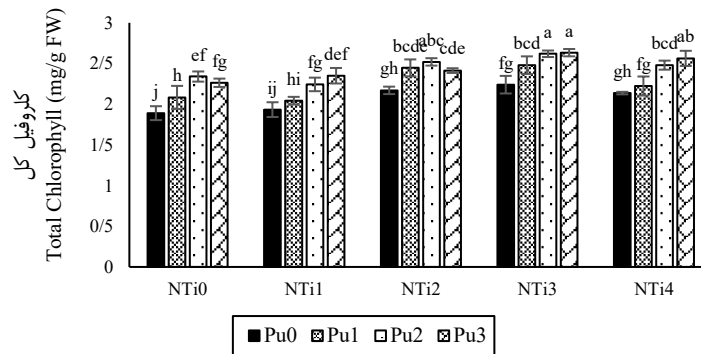
مقایسه میانگین اثر ساده پوترسین بر مقادیر رنگیزه‌های کلروفیلی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) نشان داد که با افزایش سطوح پوترسین مقادیر این صفات روند افزایشی داشتند، به گونه‌ای که در سطوح ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین، کلروفیل کل بیشترین میزان را به خود اختصاص داد. در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین نیز بیشترین مقدار کاروتنوئید با ۰/۱۵ میلی‌گرم بر گرم بافت تر گزارش شد که نسبت به نمونه شاهد ۳۶/۳ درصد افزایش داشت (جدول ۴).

می‌شود که در نتیجه آن کمپلکس برداشت کننده نوری فعال می‌گردد، این فعال شدن، ظرفیت فتوسنتزی را افزایش می‌دهد. نانوذرات تیتانیوم به دو روش سبب افزایش فتوسنتز می‌شوند، یکی از طریق ایجاد تغییر در فعالیت پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز شامل فروکتوز ۱ و ۶ دی فسفاتاز مؤثر در چرخه کالوین و تغییر چرخه پنتوز فسفات مؤثر در متابولیسم کربوهیدرات، و دیگری از طریق افزایش کلروفیل که موجب تحریک فتوسنتز می‌شود (Kiss et al., 1985).

با بررسی مقایسه میانگین اثرات برهمکنشی دو تیمار بر مقدار کلروفیل کل گیاه رزماری مشاهده شد که در سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم، با افزایش غلظت‌های پوترسین مقدار این صفت روند افزایشی نسبت به نمونه شاهد داشت، به نحوی که بیشترین مقدار این صفت مربوط به تیمارهای NTi3Pu2 (غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات تیتانیوم و غلظت ۱ میلی‌مولار پوترسین) و NTi3Pu3 (غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات تیتانیوم و غلظت ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین) به ترتیب با ۲/۶۳ و ۲/۶۳ میلی‌گرم بر گرم بافت تر بود (شکل ۳).

بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد سبب کاهش نشت یونی و در نهایت افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید گردید (Gerami et al., 2019). کلروفیل در ساختار خود دارای منیزیم و نیتروژن است که کمبود این عناصر مانع از تشکیل کلروفیل می‌شود. از آنجایی که پلی‌آمین‌ها حاوی نیتروژن هستند، می‌توانند مقدار کلروفیل را تحت تأثیر قرار دهند.

مقایسه میانگین اثر ساده نانوذرات تیتانیوم بر مقدار کاروتنوئید گیاه رزماری نشان داد که با افزایش سطوح نانوذرات، مقدار کاروتنوئید روند افزایشی داشت. غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام از نانوذرات با ۰/۱۵ میلی‌گرم بر گرم بافت تر، بیشترین میزان این صفت را به خود اختصاص داد که نسبت به نمونه شاهد ۵۰ درصد افزایش داشت (جدول ۴). اثر مطلوب استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر میزان کاروتنوئیدها در گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.) گزارش شده است (Talebi et al., 2022). در پژوهشی (Ze et al., 2011) مشخص شد که نانوذرات تیتانیوم باعث افزایش جذب نور توسط کلروپلاست‌ها



شکل ۳- اثر متقابل سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر مقدار کلروفیل کل در گیاه رزماری (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند).

Figure 3. The interaction effects of different levels of titanium nanoparticles and putrescine on total chlorophyll content in rosemary (in each treatment, common letter(s) indicate non-significant differences at the 5% level).

اثر برهمکنشی نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر مقدار فلاونوئید گیاه رزماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نشان داده شدند (جدول ۵).

نتایج آنالیز واریانس اثر ساده نانوذرات تیتانیوم و اثر ساده پوترسین بر برخی صفات بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری (فلاونوئید، فنل کل، پراکسیداز، کاتالاز و DPPH) در سطح یک درصد معنی‌دار گزارش شدند. نتایج آنالیز واریانس

جدول ۵- آنالیز واریانس اثر تیمارهای نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر صفات بیوشیمیایی ارزیابی شده در گیاه رزماری

میانگین مربعات درصد مهار رادیکال آزاد Mean square of DPPH	میانگین مربعات کاتالاز Mean square of catalase	میانگین مربعات پراکسیداز Mean square of peroxidase	میانگین مربعات فنل کل Mean square of total phenol	میانگین مربعات فلاونوئید Mean square of flavonoids	تیمار Treatment
1300.849**	22.809**	2.073**	33.594**	171.619**	نانوذره تیتانیوم Titanium nanoparticles
1043.684**	19.524**	1.850**	16.280**	92.917**	پوترسین Putrescine
34.565 ^{ns}	1.345 ^{ns}	0.100 ^{ns}	0.317 ^{ns}	2.259*	نانوذرات تیتانیوم × پوترسین × Titanium nanoparticle Putrescine
35.060	0.932	0.1242	0.463	0.963	خطا Error
8.808	7.107	11.129	4.003	4.335	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

*, ** indicate significant effects and ns shows no significance effect at probability levels of 5% and 1%.

*** به ترتیب اثرات معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز و کاتالاز) در گیاه رزماری به این صورت بود که با افزایش سطوح پلی‌آمین، مقادیر این صفات روند افزایشی داشتند، یعنی غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار بیشترین مقادیر این صفات را به‌خود اختصاص دادند (جدول ۶). پلی‌آمین‌ها، زنجیره‌ای از واکنش‌های دفاعی را راه‌اندازی می‌کنند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یکی از نتایج آن است (Toumi *et al.*, 2010).

در واقع، پوترسین می‌تواند با از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولیدشده در گیاه و جلوگیری از آسیب احتمالی آن بر سلول، باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گردد (Mahros *et al.*, 2011). در پژوهشی که بر روی گلچه‌های کلم انجام شد، افزایش درصد مهار رادیکال آزاد، فنل و فلاونوئید تحت غلظت‌های مختلف پوترسین گزارش شد (Jafarpour *et al.*, 2014).

مقایسه میانگین اثر ساده نانوذرات تیتانیوم بر مقادیر فنل کل و فلاونوئید در گیاه رزماری حاکی از آن بود که با افزایش غلظت این نانوذرات، مقادیر صفات مورد مطالعه روند افزایشی داشتند. طبق نتایج، در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات، بیشترین مقادیر این صفات گزارش شدند، به این ترتیب که در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام، مقدار فنل کل به ترتیب با ۱۸/۴۵ و ۱۸/۶۹ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم نسبت به نمونه شاهد با ۱۵/۲۳ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم به ترتیب ۲۱/۱ و ۲۲/۷ درصد افزایش نشان داد. گزارش شده است که کاربرد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (Gholami *et al.*, 2020; Mazarie *et al.*, 2019; Talebi *et al.*, 2022) و اکسید مس (Oloumi *et al.*, 2015) سبب افزایش محتوای فنل و فلاونوئید در گیاه شد. اثر ساده پلی‌آمین پوترسین بر برخی صفات بیوشیمیایی (فلاونوئید و فنل کل) و آنزیم‌های

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی ارزیابی‌شده در گیاه رزماری تحت سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم و پوترسین

Table 6. Mean comparisons of biochemical traits evaluated in rosemary under different levels of titanium nanoparticles and putrescine

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH	کاتالاز Catalase	پراکسیداز Peroxidase	فنل کل Total phenol	فلاونوئید Flavonoids	تیماژ Treatment
55.07±9.41 ^c	11.63±1.74 ^b	2.69±0.48 ^c	15.23±1.08 ^c	18.66±2.43 ^d	NTi0
58.47±10.58 ^c	12.74±1.54 ^b	2.82±0.49 ^c	15.29±1.24 ^c	20.33±3.54 ^c	NTi1
68.05±8.08 ^b	14.01±1.53 ^a	3.28±0.49 ^b	17.37±1.07 ^b	21.08±1.80 ^c	NTi2
75.41±7.51 ^a	14.58±0.98 ^a	3.29±0.37 ^b	18.45±1.07 ^a	25.37±2.05 ^b	NTi3
79.12±10.90 ^a	14.97±1.21 ^a	3.73±0.46 ^a	18.69±1.19 ^a	27.76±2.33 ^a	NTi4
6.904	1.126	0.411	0.793	1.144	LSD
58.49±11.58 ^c	12.44±1.85 ^c	2.81±0.54 ^b	15.88±1.54 ^b	20.49±3.64 ^c	Pu0
62.67±11.02 ^c	13.11±1.52 ^{bc}	2.94±0.57 ^b	16.43±1.86 ^b	20.80±4.02 ^c	Pu1
70.45±12.03 ^b	13.68±1.72 ^b	3.34±0.47 ^a	17.55±1.78 ^a	23.48±3.54 ^b	Pu2
77.28±10.06 ^a	15.12±1.29 ^a	3.57±0.43 ^a	18.17±1.48 ^a	25.78±3.43 ^a	Pu3
5.795	0.945	0.345	0.666	0.961	LSD

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Each column of means with at least one letter in common are not significantly different.
NTi0: 0, NTi1: 50, NTi2: 100, NTi3: 200 and NTi4: 400 ppm; Pu0: 0, Pu1: 0.5, Pu2: 1 and Pu3: 1.5 mM.

کلروپلاست‌ها، از زوال آنها جلوگیری کند (Hatami *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2016). بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد نیز به غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام از نانوذره با ۷۵/۴ و ۷۹/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختصاص داشت. افزایش درصد مهار رادیکال آزاد در گیاه رزماری تحت استفاده از تیمار نانوذرات تیتانیوم در مطالعات پیشین (Gholami *et al.*, 2020) نیز نشان داده شد.

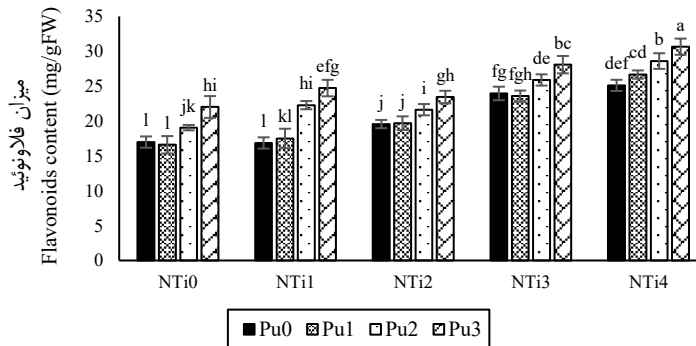
طبق نتایج، بیشترین مقدار فلاونوئید مربوط به غلظت ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین با ۲۵/۷۸ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر بود که نسبت به نمونه شاهد ۲۵/۸ درصد افزایش نشان داد. همچنین، بیشترین مقدار فنل کل با ۱۸/۱۷ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم به تیمار ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین اختصاص داشت (جدول ۶). در خصوص آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز و کاتالاز نیز بیشترین مقادیر به ترتیب با ۳/۵۷ و ۱۵/۱۲ واحد آنزیمی در میکروگرم پروتئین در دقیقه به تیمار ۱/۵ میلی‌مولار پوترسین اختصاص داشتند.

مقایسه میانگین اثر متقابل نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر مقدار فلاونوئید در گیاه رزماری حاکی از آن بود که در سطوح مختلف نانوذرات، با افزایش مقادیر پوترسین میزان این صفت روند افزایشی نشان داد، به گونه‌ای که بیشترین مقدار فلاونوئید مربوط به تیمارهای NTi4Pu3 (غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام از

مقایسه میانگین اثر ساده نانوذرات تیتانیوم بر مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز و کاتالاز) و درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات تیتانیوم مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و درصد مهار رادیکال آزاد روند افزایشی داشتند، در غلظت‌های بالای نانوذره (۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام)، مقدار پراکسیداز به ترتیب با ۳/۲۹ و ۳/۷۳ واحد آنزیمی بر میکروگرم پروتئین در دقیقه و مقدار کاتالاز با ۱۴/۵۸ و ۱۴/۹۷ تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین در دقیقه بیشترین مقادیر را به‌خود اختصاص دادند (جدول ۶). در مطالعه نوری و همکاران (Nouri *et al.*, 2017) نیز گزارش شد که محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر گیاه عدس (*Lens culinaris Medik*) منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردید. در همین راستا، بررسی اثر نانوذرات تیتانیوم بر فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis L.*) نشان داد که غلظت‌های مختلف نانوذرات تیتانیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گاپاکول اکسیداز و پراکسیداز شد (Mazarie *et al.*, 2019). به علاوه، کاربرد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند سبب تحریک تقسیم سلولی و افزایش اندازه سلول گردد. این محرک می‌تواند با افزایش جذب نور، انتقال و تبدیل انرژی نورانی را تسریع و با افزایش طول دوره فتوسنتزی

کوئرتستین بر گرم وزن تر نسبت به نمونه شاهد با ۱۶/۹۸ میلی گرم کوئرتستین بر گرم وزن تر به ترتیب ۸۰/۵ و ۶۸/۳ درصد افزایش نشان داد (شکل ۴).

نانوذرات تیتانیوم و غلظت ۱/۵ میلی مولار پوترسین) و NTi4Pu2 (غلظت ۴۰۰ پی پی ام از نانوذرات تیتانیوم و غلظت ۱ میلی مولار پوترسین) به ترتیب با ۳۰/۶۶ و ۲۸/۵۹ میلی گرم



شکل ۴- اثر متقابل سطوح مختلف نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر میزان فلاونوئید در گیاه رزماری (در هر تیمار حرف یا حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد هستند).

Figure 4. The interaction effects of different levels of titanium nanoparticles and putrescine on flavonoid content in rosemary (in each treatment, common letter(s) indicate non-significant differences at the 5% level)

رنگیزه های فتوسنتزی شود و مقادیر آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز را افزایش دهد. اثر برهمکنشی نانوذرات تیتانیوم و پوترسین بر اکثر صفات رشدی در گیاه رزماری معنی دار بود، ولی در خصوص صفات فیزیولوژیکی، فقط بر مقدار کلروفیل کل و فلاونوئید معنی دار بود. از این رو، به نظر می رسد که کاربرد نانوذرات تیتانیوم و پوترسین می تواند به دلیل بهبود صفات رشدی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، عملکرد گیاه رزماری را افزایش دهد.

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان دادند که به کارگیری نانوذرات تیتانیوم منجر به افزایش خصوصیات رشدی گیاه رزماری گردید. همچنین نانوذرات تیتانیوم توانست ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه رزماری و مقادیر متابولیت های ثانویه ای مانند ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را افزایش دهد. سطوح مختلف پوترسین نیز توانست منجر به افزایش خصوصیات رشدی و افزایش

References

- Abdi, R., & Jabbarzadeh, Z. (2022). Investigation of some growth and biochemical and post-harvest characteristics of *Rosa hybrida* cv. Avalanche cut flower using combined application of sodium nitroprusside and putrescine. *Plant Process and Function*, 11(50), 37-56. [In Persian]
- Akbari, A., Khademi, O., Sharafi, Y., & Tabatabaei, S. J. (2017). Effects of Putrescine treatment on strawberry fruit cv. 'Camarosa' under NaCl salinity stress. *Journal of Crops Improvement*, 19(1), 147-161. [In Persian] <https://doi.org/10.22059/jci.2017.60405>
- Akhavan hezaveh, T. (2023). The effect of UV stress and titanium dioxide nanoparticles foliar spraying on some physiological and biochemical aspects of sage (*Salvia officinalis* L.). *Ecophysiology and Phytochemistry of Medicinal and Aromatic Plants*, 9(2), 1-15. [In Persian]
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., & Tiburcio, A. F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6), 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1130-0>
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., & Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*, 28(23), 1867-1876. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9179-3>
- Alizadeh, B., Ghahremani, Z., Barzegar, T., & Nikbakht, J. (2017). Effect of foliar application of putrescine on growth, yield and fruit quality of sweet pepper (*Capsicum annum* cv. Dimaz) under water stress. *Journal of Crops Improvement*, 19(2), 431-444. [In Persian] <https://doi.org/10.22059/jci.2017.60425>
- Ansari, A., Andalibi, B., Zarei, M., & Shekari, F. (2021). Effect of putrescine foliar application on growth and tolerance of iberica dragon's head (*Lallemantia iberica*) to lead stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 14(3), 861-871. <https://doi.org/10.22077/escs.2020.3018.1779> [In Persian]
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Baniasadi, F., Saffari, V. R., & Maghsoudi moud, A. A. (2015). Effect of putrescine on some physiological and morphological characteristics of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 8(1), 73-82. <https://doi.org/10.22077/escs.2015.202> [In Persian]

- Cacmak, I., & Horst, W. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip soybean. *Plant Physiology*, 83, 463-468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chen, D., Shao, Q., Yin, L., Younis, A., & Zheng, B. (2019). Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Faraji-mehmany, A., Esmailpour, B., Sefidkon, F., & Khorramdel, S. (2016). Effects of foliar spraying with salicylic acid and putrescine on growth characteristics and yield of summer savory (*Satureja hortensis* L.). *Field Crops Research*, 14(1), 73-85. <https://doi.org/10.22067/gsc.v14i1.33631> [In Persian]
- Farooq, M., Wahid, A., & Lee, D. J. (2009). Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(5), 937-945. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0307-2>
- Farsari, S., Mehdizadeh, L., Moghaddam, L., & Ebrahimi, H. (2019). Effect of foliar application of putrescine on biomass, water relative content and mineral elements of sweet basil (*Ocimum basilicum* L. cv. Genove) under salinity stress. *Plant Process and Function*, 8(33), 399-411. [In Persian]
- Gerami, M., Mohammadian, A., & Akbarpour, V. (2019). The effect of putrescine and salicylic acid on physiological characteristics and antioxidant in *Stevia rebaudiana* B. under salinity stress. *Crop Breeding*, 11(29), 40-54. <https://doi.org/10.29252/jcb.11.29.40> [In Persian]
- Ghasemi, Z., Karimian, A. A., Azimzadeh, H., & Sodaiezadeh, H. (2018). Effect of irrigation with wastewater on some physiological and morphological characteristics of *Rosmarinus officinalis* (Case Study: Yazd City Wastewater). *Water and Wastewater Science and Engineering*, 3(3), 29-38. <https://doi.org/10.22112/jwwse.2018.130237.1088> [In Persian]
- Gholami, A., Abbaspour, H., Gerami, M., & Hashemi-Moghaddam, H. (2020). Investigation of effect of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) on photosynthetic pigments and some biochemical and antioxidant properties of the *Rosmarinus officinalis* L. *Food Science and Technology*, 17(105), 123-134. <https://doi.org/10.52547/fsct.17.105.123> [In Persian]
- Gholipour, S., Zamani, G. R., & JamialAhmadi, M. (2020). Effect of putrescine and calcium nitrate foliar application on some physiological traits of sesame (*Sesamum indicum* L.) under different contents. *Plant Process and Function*, 9(36), 439-451. <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-1310-en.html> [In Persian]
- Gupta, S. M., & Tripathi, M. (2011). A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin*, 56(16), 1639-1657. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4476-1>
- Hajiboland, R., & Ebrahimi, N. (2011). Growth, photosynthesis and phenolics metabolism in tobacco plants under salinity and application of polyamines. *Journal of Plant Biological Sciences*, 3(8), 13-26. https://ijpb.ui.ac.ir/article_18810.html [In Persian]
- Hatami, M., Kariman, K., & Ghorbanpour, M. (2016). Engineered nanomaterial -mediated changes in the metabolism of terrestrial plants. *Science of the Total Environment*, 571, 275-291.
- Hong, F., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L., & Yang, P. (2005). Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*, 105(1-3), 269-279. <https://doi.org/10.1385/bter:105:1-3:269>
- Jafarpour, F., Bakhshi, D., Ghasemnejad, M., & Hassan Sajedi, R. (2014). Effect of putrescine on postharvest quality, and phenolic compounds and antioxidant capacity of broccoli (*Brassica oleracea* L. cv. Italica) florets. *Journal of Horticultural Science*, 28(3), 303-311. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.42741> [In Persian]
- Kiss, F., Deak, G., Feher, M., Balough, A., Szabolcsi, L., & Pais, I. (1985). The effect of titanium and gallium in photosynthetic rate of algae. *Journal of Plant Nutrition*, 8, 825-832.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408(16), 3053-3061. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>
- Mahdi Nezhad, N., Mousavi, H., Fakheri, B., & Heidari, F. (2019). The assessment of the effects of the nanoparticles on some physiological traits changes, photosynthetic pigments and the prthenolide of chamomile plant (*Tanacetum parthenium*) under water deficit stress. *Plant Process and Function*, 8(29), 219-227. <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-603-en.html> [In Persian]
- Mahros, K. M., Badawy, E. M., Mahgoub, M. H., Habib, A. M., & El-Sayed, I. M. (2011). putrescine and uniconazole treatments on flower characters and photosynthetic pigments of (*Chrysanthemum indicum* L.) plant. *Journal of South American Earth Sciences*, 7, 399-408.
- Mandeh, M., Omid, M., & Rahaie, M. (2012). In vitro influences of TiO₂ nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue culture. *Biological Trace Element Research*, 150(1), 376-380. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9480-z>
- Mazarie, A., Mousavi-nik, S. M., Ghanbari, A., & Fahmideh, L. (2019). Effect of different spraying concentrations of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on some physiological traits and

- antioxidant system activity of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Plant Biological Sciences*, 11(1), 1-22. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2018.110510.1092> [In Persian]
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>
- Mohseni Mohammadjanlou, A., Seyedsharifi, R., & Khomari, S. (2021). Effects of holding irrigation at reproductive stages and putrescine and bio fertilizers application on grain filling period, chlorophyll content and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 19(2), 153-167. <https://doi.org/10.22067/jcsc.2021.67402.1000> [In Persian]
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., & Kumar, D. S. (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179(3), 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.012>
- Nasri, S. (2012). A review of the antinociceptive use of medicinal plants in Iran. *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine*, 3(3), 293-310. <http://jiitm.ir/article-1-153-en.html> [In Persian]
- Nouri, H., Soltanieh, M., & Moaveni, P. (2017). Study of nano particle TiO₂ spraying on chlorophyll, yield and yield components of lentil (*Lens culinaris* Medik). *Iranian Journal Pulses Research*, 8(2), 57-68. [In Persian] <https://doi.org/10.22067/ijpr.v8i2.25752>
- Oloumi, H., Soltaninejad, R., & Baghizadeh, A. (2015). The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(2), 157-161. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0143-x> [In Persian]
- Paryan, S., Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2020). 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*, 19(75), 168-187. <https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.168> [In Persian]
- Rasouli, F., Abedini, F., & Zahedi, S. M. (2016). The effect of Titanium nano dioxide on physiological particular and chlorophyll fluorescence parameters in Eggplant (*Solanum melongena* L.) under water deficit stress. *Journal of Vegetables Sciences*, 2(2), 37-51. <https://doi.org/10.22034/iuvs.2016.32796> [In Persian]
- Rezaiean, N., Gerami, M., Majidian, P., & Ghorbani, H. (2023). Evaluation of pigments content and functional traits of camelina (*Camelina sativa*) under the influence of growth stimulants. *Plant Production*, 13(1), 1-14. [In Persian]
- Saber, A. T., Mortensen, A., Szarek, J., Jacobsen, N. R., Levin, M., Koponen, I. K., Jensen, K. A., Vogel, U., & Wallin, H. (2019). Toxicity of pristine and paint-embedded TiO₂ nanomaterials. *Human & Experimental Toxicology*, 38(1), 11-24. <https://doi.org/10.1177/0960327118774910>
- Sairam, R. K., & Saxena, D. C. (2000). Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 184, 55-61.
- Salehi Sardoei, A. (2021). Rosemary: a review of botany, phytochemicals, bioactivities and industrial applications. *Plant and Biotechnology*, 16(3), 13-26. [In Persian]
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Methods in Enzymology*, 299, 152-178. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Talebi, F., Akbarpour, V., & Chalavi, V. (2022). Effect of methanol and titanium dioxide nanoparticles on phytochemical properties of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Crop Breeding*, 14(43), 84-94. <https://doi.org/10.52547/jcb.14.43.84> [In Persian]
- Tang, W., & Newton, R. J. (2005). Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation*, 46(1), 31-43. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-6395-0>
- Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H., & Molgaard, P. (2007). Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. *Food Chemistry*, 101(1), 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.048>
- Toumi, I., Moschou, P. N., Paschalidis, K. A., Bouamama, B., Ben Salem-fnayou, A., Ghorbel, A. W., Mliki, A., & Roubelakis-Angelakis, K. A. (2010). Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. *Journal of Plant Physiology*, 167(7), 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.10.022>
- Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C., & Yang, P. (2006). Influences of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110(2), 179-190. <https://doi.org/10.1385/bter:110:2:179>
- Ze, Y., Liu, C., Wang, L., Hong, M., & Hong, F. (2011). The regulation of TiO₂ nanoparticles on the expression of light-harvesting complex II and photosynthesis of chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Biological Trace Element Research*, 143(2), 1131-1141. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8901-0>