گیاه و زیست فناوری ایران
Iranian Journal of Plant & Biotechnology (IJPB)

مقاله پژوهشی

اثر کاربرد نانوذرات فلزی بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* L.) در کشت درون شیشه‌ای

فرنام فیروزبخت‌جهرمی (نویسنده مسئول)[1*]، بهنام بهروزنام‌جهرمی[2]، عبدالحسین ابوطالبی‌جهرمی[3]، عبدالکریم اجرایی[4] و سید عبدالحسین محمدی‌جهرمی[5]

۱*- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، Yasserarefzade1@gmail.com

۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، bbehrooznam@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، aboutalebia@gmail.com

٤- دانشیار، گروه علوم باغبانی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، ejraeeabdolkarim@gmail.com

۵- استاد، گروه علوم باغبانی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، mohammadia@gmail.com

تاریخ دریافت: بهمن ۱٤۰۱ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱٤۰۲

The effect of using metal nanoparticles on the antioxidant defense system of lavender plant (*Lavandula angustifolia* L.) at in vitro condition

Farnam Firoozbakht Jahromi (Corresponding author) [1*], Abdolhossein Aboutalebi Jahromi[3], Abdolkarim Ejraee[4] and Seyed abdolhossein Mohammadi Jahromi[5]

1*- Ph.D student, Department of Horticulture, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, Farnamfe817@gmail.com

2- Associate professor, Department of Horticulture, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, bbehrooznam@yahoo.com

3- Associate professor, Department of Horticulture, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, aboutalebia@gmail.com

4- Associate professor, Department of Horticulture, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, ejraeeabdolkarim@gmail.com

5- Professor, Department of Horticulture, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, mohammadia@gmail.com

Received: January 2023 Accepted: May 2023

Abstract

This research was conducted in order to evaluation of the effect of metal nanoparticles on the antioxidant defense system of lavender plant in a completely randomized design with three replications. Treatments include control, nano zinc oxide, nano iron oxide, nano silver nitrate, nano silver nitrate with nano zinc oxide, nano silver nitrate with nano iron oxide, nano silver nitrate and nano zinc oxide and nano iron oxide with a concentration of 30 ppm. The results of the mean comparison showed that some traits increased and others decreased under the influence of application of metal nanoparticles. Metal nanoparticles led to an increase in the content of soluble protein, gallic acid, flavonoid and rosmarinic acid and according to the results, it was found that the treatment of using iron nanoparticles alone led to the maximum amount of soluble protein and flavonoid. The highest amounts of gallic acid and rosmarinic acid were obtained with the amounts of 2.73 and 21.82 $mg.g^{-1}$, respectively, in the treatment of simultaneous application of all three nanoparticles of zinc, iron and silver. The application of metal nanoparticles led to a decrease in the amount of some enzymatic and non-enzymatic antioxidants, so that the highest amount of ascorbic acid, phenylalanine ammonia lyase enzyme activity, polyphenyl oxidase, superoxide dismutase and free radical inhibition rate was obtained in the control treatment. Based on these results, it was found that the use of metal nanoparticles with its antioxidant effect and the purification of reactive oxygen species helped the antioxidant defense system of the plant and led to a lower activity of antioxidant enzymes in the lavender plant.

Keywords: Antioxidant, Free Radicals, Lavender, Metal Nanoparticles

Iranian Journal of Plant & Biotechnology
Summer 2023, Vol 18, No 2, Pp 18-41

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر نانوذرات فلزی بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سطوح شاهد، نانو اکسید روی، نانو اکسید آهن، نانو نیترات نقره، نانو نیترات نقره با نانو اکسید روی، نانو نیترات نقره با نانو اکسید آهن، نانو نیترات نقره و نانو اکسید روی و نانو اکسید آهن با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بودند. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد نانوذرات فلزی منجر به افزایش محتوای پروتئین محلول، گالیک اسید، فلاونوئید و رزمارینیک اسید شد. تیمار نانوذرات آهن به تنهایی منجر به حصول حداکثر میزان پروتئین محلول و فلاونوئید شد. بیشترین میزان گالیک اسید و رزمارینیک اسید به ترتیب با مقادیر ۲/۷۳ و ۲۱/۸۲ میلی‌گرم بر گرم در تیمار کاربرد هم‌زمان هر سه نانوذره روی، آهن و نقره بدست آمد. کاربرد نانوذرات فلزی منجر به کاهش میزان برخی از آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی گردید، به طوری که بیشترین میزان اسید آسکوربیک، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، پلی فنل اکسیداز، سوپر اکسیددیسموتاز و میزان مهار رادیکال‌های آزاد در تیمار شاهد بدست آمد. بر اساس این نتایج مشخص شد که کاربرد نانوذرات فلزی با اثر آنتی‌اکسیدانی خود و پالایش گونه‌های فعال اکسیژن به سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه کمک نموده و منجر به فعالیت کمتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه اسطوخودوس گردید.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، اسطوخودوس، رادیکال‌های آزاد، نانوذرات فلزی

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران
سال۱٤۰۲، دوره۱۸، شماره ۲، صص ٤۱-۱۸

مقدمه و کلیات

اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* L.) یکی از گیاهان دارویی همیشه سبز متعلق به خانواده نعناعیان بوده و از مناطق مدیترانه‌ای جنوب اروپا تا اسپانیا منشأ گرفته است و ٤٨ گونه از این گیاه شناسایی شده است و گیاهی چندساله است که خاص مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد (Jadczak *et al*., 2020). همه اندام‌های گیاه اسطوخودوس حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانت بوده و از این نظر می‌تواند برای کشت بافت، گیاهی بی نظیر باشد و از آن می‌توان ترکیبات آنتی‌اکسیدانت به منظور اهداف دارویی استخراج نمود (Moure *et al*., 2001). تولید پایه‌های گیاهی با روش کشت بافت دارای مزایای زیادی از قبیل تولید بیشتر آنتی‌اکسیدانت‌ها در بافت‌های گیاهی بوده و از این طریق توانایی گیاه در مقابله با تنش‌های اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (Makowczyńska *et al*, 2016). همچنین کنترل بیشتر مسیرهای بیوسنتزی برای دستیابی به ترکیبات شیمیایی از قبیل آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در مقادیر مطلوب از مزایای تولید متابولیت های ثانوی در شرایط کشت درون شیشه است (Jakovljević *et al*., 2015). نانوتکنولوژی علم تولید، شناسایی و دستکاری مواد در مقیاس نانو می‌باشد و دارای طیف وسیعی از کاربردها در زمینه‌های پزشکی، کشاورزی و زیست فناوری می‌باشد (Kim *et al*., 2011). نانوذرات فلزی شامل طیف وسیعی از فلزات از جمله آهن، روی، نقره، پلاتین و هستند و حتی از فلزات پایه‌ای چون نیکل، کبالت و مس قابل سنتز است (Rai *et al*., 2009). استفاده از فلزات مورد نیاز گیاهان در حد و اندازه نانو منجر به تغییر خواص آنها می‌گردد. نانوذرات دارای اثرات مثبت و منفی بر گونه‌های گیاهی مختلف هستند و موجب طیف وسیعی از تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی با توجه به ویژگی‌های نانوذرات و گونه گیاهی می‌شوند نانوذرات که هم از طریق ریشه و هم اندام هوایی جذب گیاه می‌شوند (نوح‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۹). نانوذرات از یک طرف به علت اندازه کوچک، ویژگی ظاهری و نسبت سطح به حجم بیشتر، رشد و تولید محصول را افزایش می‌دهند و از سویی دیگر حفاظت را در مقابل انواع تنش‌های غیرزیستی فراهم می‌کنند (Khan *et al*., 2016). نانو ذرات به دلیل پتانسیل بالقوه‌ای که در تقویت رشد گیاهان و همچنین حفاظت از آنها، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Khot *et al*., 2012). درجه سودمندی نانوذرات توسط ساختار شیمیایی، اندازه، سطح پوشش، واکنش‌پذیری، گونه گیاهی و مهم‌تر از همه غلظت مورد استفاده تعیین می‌شود (Siddiqui *et al*., 2015). افزایش کمی و کیفی و تولید مناسب گیاهان عالی وابسته به تغذیه معدنی آنها بوده و در این بین عناصر ریز مغذی جایگاه ویژه‌ای دارند و باید توجه بیشتری به آنها معطوف گردد. این عناصر در سطح کمی به کار برده شده ولی اعمال حیاتی بسیار مهمی مانند فرآیند فتوسنتز وتنفس را در گیاهان کنترل می‌کنند (اصل محمدی و همکاران، ١٤٠٠). کاربرد الیسیتورها در کشت بافت منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شده و افزایش تولید و فعالیت

آنتی‌اکسیدانت‌ها را به دنبال دارد (Ramachandra and Srinivasa, 2008). الیسیتورها در حد ذرات نانو در گیاهان دارویی مختلف حاصل از کشت بافت می‌تواند بر توانایی آنتی‌اکسیدانی گیاهان اثرگذار باشد. عنصر ریزمغذی روی نقش اساسی در متابولیسم گیاه و بیوسنتز پروتئین‌ها دارد و برای حفظ پیوستگی ساختار غشای سلول‌های ریشه نیز ضروری است (Marschner, 2011). عنصر روی به عنوان پایدارکننده پروتئین‌ها، غشاها و پروتئین‌های متصل شونده به DNA جز ساختاری آنزیم‌ها است (Solimani *et al*., 2015). به احتمال زیاد عنصر روی در بیوسنتز آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی نقش دارد (Ahmad *et al*., 2017). عنصر آهن نیز عاملی مؤثر در ترکیب ۱٤۰ آنزیم است که واکنش‌های بیوشیمیایی منحصر به فردی را کاتالیز می‌کند (Nair *et al*., 2010). این عنصر در طیف وسیعی از فعالیت‌ها و واکنش‌ها مانند بیوسنتز کلروفیل و رنگدانه‌هایی مانند آنتوسیانین‌ها، انتقال الکترون فتوسنتزی و تنفسی، واکنش‌های اکسید-احیاء و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش دارد و برای رشد طبیعی و رشد زایشی در گیاهان زراعی مورد نیاز می‌باشد (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۵). ترکیبات نانو آهن به علت کوچک بودن و حلالیت بالا سریع‌تر توسط گیاه جذب شده و کمبود مواد غذایی و نیازهای گیاهی را برطرف می‌کند و کاربرد این مواد شرایط بهینه برای رشد گیاه ایجاد می‌شود و از ایجاد هرگونه شرایط تنشی در گیاه جلوگیری به عمل می‌آید (Mohammadipoor *et al*., 2013). فلزاتی همچون نقره در اندازه ذرات نانو دارای توان آنتی‌اکسیدانی بالایی در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن هستند و سلول‌ها را از تنش اکسیداتیو در امان نگه می‌دارند (Bedlovicova *et al*., 2020). کاربرد این عنصر به واسطه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه *Brassica juncea* سبب شده که میزان رشد این گیاه افزایش یابد (Sharma *et al*., 2012). کاهش علائم بیماری در برنج (Jo *et al*., 2015) و همچنین القای خاصیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه *Brassica juncea* با کاربرد نانوذرات فلزی گزارش شده است (Sharma *et al*., 2012). کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با کاربرد نانوذرات فلزی نیز گزارش شده است (Krishnaraj *et al*., 2012). رزمارینیک اسید به عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنلی موجود در اسانس برخی از گیاهان دارویی بوده که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنشی حاکم بر گیاه هستند (کمالی‌زاده و همکاران، ۱۳۹٤). رزمارینیک اسید همچنین تحت تأثیر تیمارهای کاربرد نانوذرات فلزی قرارگرفته و کاربرد نانوذرات منجر به افزایش مقدار رزمارینیک اسید موجود در اسانس این گیاهان شده است (علیرضایی و همکاران، ۱۳۹٦؛ پاریان و همکاران، ۱۳۹۹؛ کمالی‌زاده و همکاران، ۱۳۹٤؛ Radhakrishna *et al*., 2014). رزمارینیک اسید با عمل آنتی‌اکسیدانی خود مانع از وقوع خسارت اکسیداتیو توسط گونه‌های فعال اکسیژن شده و می‌تواند با حذف گونه‌های فعال اکسیژن از سلول بر ثبات وضعیت درونی سلول اثر بگذارد (Perron and Brumaghim, 2009). استفاده از نانوذرات فلزی از قبیل نقره، آهن و روی نیز با تغییر در ویژگی‌هایشان همراه بوده و

اثرات بیشتری بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و سنتز متابولیت‌های ثانوی گیاه دارند. از این رو هدف از اجرای این مطالعه بررسی اثر کاربرد نانوذرات فلزی نقره، آهن و روی بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس و محتوای رزمارینیک اسید موجود در اسانس این گیاه می‌باشد.

فرآیند پژوهش

این مطالعه به منظور بررسی کاربرد عناصر ریزمغذی به صورت نانو ذرات روی، آهن و نقره بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی جداکشت گیاه اسطوخودوس در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم صورت گرفت. این آزمایش ها در قالب طرح کامال تصادفی در سه تکرار انجام شد. بدین منظور از پنج سانتی‌متری انتهایی سرشاخه رأسی گیاه اسطوخودوس قطعات گیاهی جدا گردیده و با مقداری ماده شوینده همراه با آب شستشو داده شده و سپس برگ‌های جوان راسی از ساقه جدا شده و پس از سترون سازی برای کشت بافت مورد استفاده قرارگرفتند. برای حذف گرد و غبار از روی نمونه‌ها آنها را ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شسته و ۳ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند، سپس از الکل خارج و نمونه ها با آب مقطر استریل ۱ مرتبه شست و شو شدند، سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد قرار گرفته شدند و پس از آن ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شست و شو شدند. برای کشت نمونه‌ها از محیط MS (Murashing and Skooge, 1962) با اسیدیته ۵/۷ الی ۵/۸ استفاده شد. محلول مادر عناصر کم مصرف، عناصر پر مصرف، کلات آهن و ویتامین‌ها به صورت جداگانه به ترتیب با غلظت‌های (۲۰۰، ۲۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برابر غلظت پایانی محیط کشت تهیه شدند و برای تهیه ۱ لیتر محیط MS به ترتیب (۵، ۵۰، ۱۰ و ۵ میلی لیتر) از این محلول ها اضافه شد. ساکارز به عنوان منبع کربن ۳۰ گرم بر لیتر و آگار برای جامد کردن محیط کشت به میزان ۸ درصد حجم محیط کشت اضافه شد (Misawa *et al*., 1994). کالوس‌ها در محیط 2N4B کشت داده شدند و در مرحله واکشت در همان محیط به اضافه الیسیتورهای مختلف به عنوان تیمارهای آزمایشی قرارگرفتند. الیسیتورهایی که در این مطالعه مورد استفاده قرارگرفتند، شامل سطوح شاهد، نانو اکسید روی، نانو اکسید آهن، نانو نیترات نقره، نانو نیترات نقره با نانو اکسید روی، نانو نیترات نقره با نانو اکسید آهن، نانو نیترات نقره و نانواکسید روی و نانو اکسید آهن بودند و کاربرد هر کدام از این نانوذرات فلزی با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بود. پس از افزودن الیسیتورها به محیط کشت در مرحله واکشت به مدت ۲ ماه هر هفته کالوس‌ها برداشت شدند.

میزان گالیک اسید: پس از آماده شدن نمونه‌ها در تاریکی، جذب آنها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و به صورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک محاسبه گردید (Marinova *et al*., 2005).

ترکیبات فلاونوئیدی: مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره متانلی به ۰/۲ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد اضافه گردید و مخلوط شد، سپس ۱۰۰ میکرو لیتر اسید استیک ۳۳ درصد اضافه شد و پس از مخلوط کردن، محلول با اتانول۹۰ درصد به حجم ۵ میلی‌لیتر

رسید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه جذب در ٤١٤ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Chang *et al*., 2002).

رزمارینیک اسید: جذب عصاره‌های متانلی در ۳۳۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت رزمارینیک اسید تعیین شد (Lopez-Arnaldos *et al*., 1995).

پروتئین: مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد ورتکس شد و پس از ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Bradford, 1976).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL): فعالیت آنزیم PAL با روش (Ke and Salveit, 1986) انجام و جذب محلول در ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت و به عنوان فعالیت این آنزیم در نظر گرفته شد.

آنزیم پلی فنل اکسیداز: مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH= ٦/٨ به همراه ۰/۲میلی لیتر پیروگالول ۰/۰۲ مولار به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ٤٠ درجه گرم شدند. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره به این محلول اضافه و در طول موج ٤٣٠ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Raymond *et al*., 1993).

فعالیت جاروب کنندگی رادیکال آزاد با ۲و۲ دی فنل پیکریل هیدرازیل (DPPH): پس از آماده نمودند نمونه‌ها برای استفاده در اسپکتروفتومتر، جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد و میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط فرمول زیر محاسبه شد (Molyneux, 2004).

میزان بازداری رادیکال آزاد = $(A_{blank} - A_{sample})/A_{blank} \times 100$

میزان اسید آسکوربیک: قدرت کاهشی پس از جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر به عنوان میکرومول اسید آسکوربیک معادل گرم خالص وزن تر بیان شد (Niciforovica *et al*., 2010).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: برای سنجش رادیکال آنیون سوپراکسید از پیروگالول استفاده شد و جذب آن در ٤٩٠ نانومتر خوانده شد و میزان فعالیت این آنزیم با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Giannotolitis and Ries, 1977).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز = $(A_0-(A_1-A_2)) \times 100/A_0$

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگین نیز با استفاده از آزمون دانکن به کمک نرم افزار SAS انجام شد.

تست KC: در این تست ابتدا از معرف K و سپس بلافاصله از معرف C استفاده می‌گردد. هیدروکسید پتاسیم باندهای استری کپسید و دیسیدون را هیدرولیز کرده و اگر گروه هیدروکسیل آزاد، نسبت به هیدروکسیل‌های دیگر موقعیت مناسبی داشته باشد یک رنگ قرمز تا نارنجی به دست می‌آید (همانند معرف C). همچنین اسنیک اسید رنگ زرد و دی هیدروکسی بنزوفوران‌ها رنگ آبی ایجاد می‌کنند (حاجی منیری، ۱۳۸۸).

تست PD: P یا PD محلول اتانولیک یک تا پنج درصد P- فنیل ان دی آمین است که فقط برای یک

روز پایدار می‌باشد. البته می‌توان این ماده را به صورت محلول استینر تهیه کرد که محلول پایداری است و به مدت سه ماه قابل نگهداری است. واکنش P- فنیل ان دی آمین با آلدهیدهای آروماتیک به صورت زرد، نارنجی تا قرمز رنگ است (ولدبیگی، ۱۳۹۵).

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش مشخص شد که اثر تیمار کاربرد نانوذرات فلزی بر صفاتی از قبیل مقدار گالیک اسید، ترکیبات فلاونوئیدی، رزمارینیک اسید، پروتئین، DPPH، اسید آسکوربیک و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، ولی بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز دارای اثر معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس خصوصیات آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس تحت تأثیر کاربرد تیمار نانوذرات فلزی

Table 1- Analysis of variance for antioxidant properties of Lavender plant under application of mental nano element

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	گالیک اسید	فلاونوئید	اسید آسکوربیک	فنیل آلانین آمونیالیاز	پلی فنل اکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	DPPH	رزمارینیک اسید
تیمار	٦	١/٥١**	٠/٧٦٢**	٠/١٤**	٠/٠٠٠٢**	٠/٨٤**	١٩٣٢٧١/٢ *	٠/١٢**	٩/٤٧**	٦/٥١**
خطا	١٤	٠/٠١٧	٠/٠٠٨٣	٠/٠٠٢	٠/٠٠٠٠٠٧٨	٠/٠٤	٧٣٢٥/٨٧	٠/٠١٦	٠/١٦	٠/٧٢
CV (%)	-	٢/٤٧	٥/٠١	١٠/٨٥	١٥/٨٢	٦/٣٥	٢١/١٤	٣/٧٤	١/٢٨٢	٤/٣٠٨

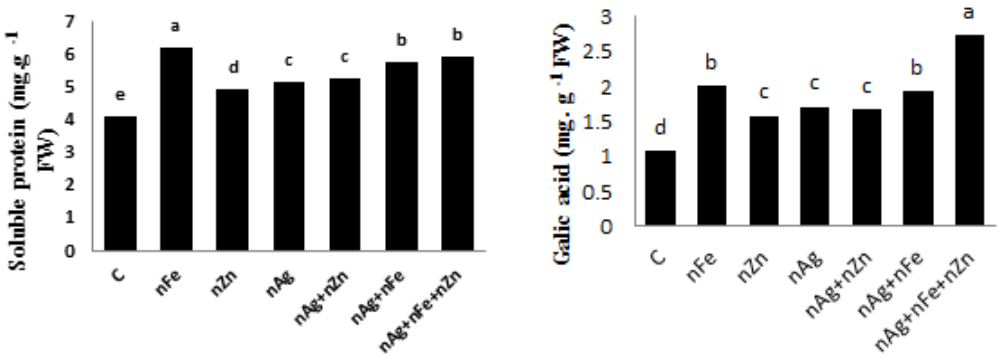
ns و ** به ترتیب یعنی، بدون معنی و معنی دار با سطح اطمینان ۹۹ درصد.

ns and ** non significant and significant at 1% level respectively

میزان پروتئین اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمار کاربرد نانوذرات فلزی قرارگرفت و بر طبق این نتایج مشخص شد که کاربرد نانوذرات فلزی منجر به افزایش محتوای پروتئین در گیاه اسطوخودوس گردید. هر چند که کاربرد همزمان نانوذرات آهن، روی و نقره محتوای پروتئین را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد، ولی بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که کاربرد تنهای نانوذرات آهن سبب شد که محتوای پروتئین در گیاه اسطوخودوس نسبت به کاربرد سایر نانوذرات بیشتر بوده و مقدار آن در این تیمار برابر با ٦/٢٢ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود و با سایر تیمارهای آزمایش نیز دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود. عدم کاربرد نانوذرات آهن سبب شد که محتوای پروتئینی در گیاه اسطوخودوس به کمترین میزان خود رسیده و مقدار آن برابر با ٤/١٢ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود و از نظر آماری با سایر تیمارهای آزمایش دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود (شکل ۱). کاربرد هم‌زمان نانوذرات فلزی روی، آهن و نقره اثر مثبت بر محتوای پروتئین گیاه اسطوخودوس داشته و سبب میزان آن نسبت به تیمار شاهد شد. به علاوه نتایج نشان داد که کاربرد تنهای نانوذرات فلزی به خصوص نانواکسید آهن محتوای پروتئینی گیاه اسطوخودوس را نسبت به کاربرد هم‌زمان آنها به

میزان بیشتری افزایش داد. نتایج برخی دیگر از مطالعات نیز بیانگر اثر منفی برهم‌کنش کاربرد نانوذرات روی و آهن بر محتوای پروتئین گیاه نسبت به کاربرد تنهای آنها می‌باشد (عسگری و همکاران، ۱۳۹۳). پروتئین‌ها محصولات نهایی مسیرهای اطلاعاتی سلول هستند که در پاسخ به نیازهای سلول در شرایط مختلف ساخته می‌شوند و در صورت نیاز تخریب می‌گردند و یا میزان بیان آنها تغییر می‌یابد. افزایش محتوای پروتئین در اثر کاربرد نانوذرات فلزی نسبت به تیمار شاهد در گزارش برخی دیگر از محققین عنوان شده است و بیان نمودند که آهن یکی از عناصر ضروری در مسیر بیوسنتزی پروتئین بوده که نسبت به کاربرد نانوذرات فلزی واکنش مثبت نشان می‌دهد (Armin *et al*., 2014). در این مطالعه علاوه بر آهن، کاربرد نانوذرات روی و نقره محتوای پروتئین گیاه اسطوخودوس را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. نیترات نقره توانایی تغییر در میزان پروتئین‌های گیاهی را دارد (Kaveh *et al*., 2013). همچنین عنوان شده است که افزایش محتوای پروتئینی با کاربرد عنصر روی بدین دلیل است که عنصر روی در سنتز کربوهیدرات و سوخت و ساز پروتئین و در نتیجه آن افزایش پروتئین محلول در گیاه نقش اساسی دارد (Kobraee *et al*., 2011). در مطالعه رستمی و همکاران (۱۳۹۹) نیز گزارش شد که کاربرد نانوذرات آهن و روی منجر به افزایش محتوای پروتئین محلول در گیاه گندم شد که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. عنصر روی در ساختار آنزیم RNA پلی‌مراز نقش اساسی ایفا نموده و از این طریق بر سنتز پروتئین‌ها نقش دارد، از این رو در گیاهانی که با کمبود روی مواجه هستند، RNA تجزیه شده که در نتیجه آن محتوای پروتئین نیز کاهش می‌یابد و فراهمی روی سبب افزایش سنتز پروتئین محلول می‌گردد (رستمی و همکاران، ۱۳۹۹). با کاهش میزان روی در گیاه به دلیل افزایش میزان RNAase میزان پروتئین محلول نیز کاهش می‌یابد (Gutierrez Rodriguez, 2016). تیمار شاهد دارای کمترین میزان پروتئین‌های محلول نسبت به سایر تیمارهای کاربرد نانوذرات فلزی بود و این می‌تواند به علت افزایش در فعالیت آنزیم پروتئاز و پراکسیداسیون پروتئین‌ها تحت تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن باشد (Pasandi pour *et al*., 2014). حضور نانوذرات در سلول‌های گیاهی مشابه رفتار یون‌های فلزی با گروه‌های سولفیدریل و کربوکسیل بوده و در نتیجه، محتوای پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Shukla *et al*., 2018). همچنین کاربرد نانوذرات فلزی ممکن است با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود منجر به افزایش سنتز پروتئین‌های محلول گردند. اثر کاربرد نانوذرات فلزی در کاهش سمیت گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو به دلیل اثر آن در جذب کده‌بندی عناصر تغذیه‌ای مهم، افزایش تولید اکسین و در نتیجه فعال کردن تقسیم و توسعه سلولی، حفظ تمامیت غشا، ذخیره فسفولیپیدها، بهبود سنتز پروتئین عنوان شده است (Ahmad *et al*., 2017). افزایش محتوای پروتئین‌های محلول در گیاه گوار در اثر کاربرد نانوذرات فلزی در تحقیق برخی دیگر از محققین نیز به اثبات رسیده است (Siddiqui *et al*., 2015). عنصر آهن نیز به دلیل نقش اساسی که در ساختمان پروتئین‌ها دارد (هم پروتئین) بر

تولید و متابولیسم پروتئین‌ها اثر داشته و در نتیجه کمبود آهن، میزان پروتئین نیز کاهش می‌یابد (Marschner, 2011). کاربرد نانوذرات نقره نیز در گیاه گوجه فرنگی منجر به افزایش محتوای پروتئین‌های محلول گردید (رضوی‌زاده، ۱۳۹۸)، که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. افزایش محتوای پروتئین‌های محلول در گیاه گلرنگ با کاربرد نانوذرات نقره گزارش شده است (محمدی سنجانی و همکاران، ۱۳۹۹). رضوی زاده (۱۳۹۸) نیز در مطالعه خود روی گیاه گوجه فرنگی تحت تیمار نانو نقره نشان داد که پروتئین کل محلول گیاه با افزایش غلظت نانو ذره در اندام هوایی افزایش نشان داد که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. افزایش محتوای پروتئین در شرایط کاربرد نانوذرات فلزی می‌تواند به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در سنتز پروتئین و یا کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌ای همانند پروتئاز باشد (John *et al.*, 2009). بر طبق نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که میزان گالیک اسید اندازه‌گیری شده در جداکشت‌های گیاه اسطوخودوس تحت تأثیر تیمار کاربرد نانوذرات فلزی قرار گرفت به طوری که کاربرد هم‌زمان هر سه فلز نقره، روی و آهن در حد ذرات نانو سبب شد که بالاترین میزان گالیک اسید به میزان ۲/۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک حاصل گردد. عدم کاربرد نانوذرات فلزی آهن، روی و نقره سبب شد که میزان گالیک اسید تولیدی اسطوخودوس کاهش یافته به طوری که کمترین میزان گالیک اسید به میزان ۱/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در تیمار عدم کاربرد هر سه نانوفلز حاصل گردید (شکل ۱). آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی نظیر گالیک اسید، فلاونوئیدها و اسید آسکوربیک نیز تحت تأثیر تیمارهای کاربرد نانوذرات فلزی قرار گرفتند. گالیک اسید یا تری هیدروکسی بنزوئیک اسید یک نوع ترکیب فنلی در گیاه می‌باشد که نقش آنتی‌اکسیدانی در گیاه بازی می‌نماید. افزایش میزان گالیک اسید در تیمار کاربرد هم‌زمان نانو اکسید آهن، روی و نقره به دلیل اثر سینرژیستی کاربرد همزمان هر سه نانوذره بوده که روی افزایش میزان گالیک اسید اثر مثبت داشته است. گالیک اسیدها به عنوان یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی می‌تواند منجر به بهبود شرایط رشدی در گیاه شود (عسگری و همکاران، ۱۳۹۷). کاربرد تنهای نانوذرات آهن نسبت به کاربرد تنهای نانوذرات روی و نقره بر افزایش میزان گالیک اسید گیاه اسطوخودوس اثر مثبت بیشتری داشت (۲/۰۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نمونه). عدم کاربرد نانوذرات فلزی سبب شد که میزان گالیک اسید در گیاه اسطوخودوس به کمترین میزان خود رسیده و در نتیجه کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار شاهد حاصل شد.



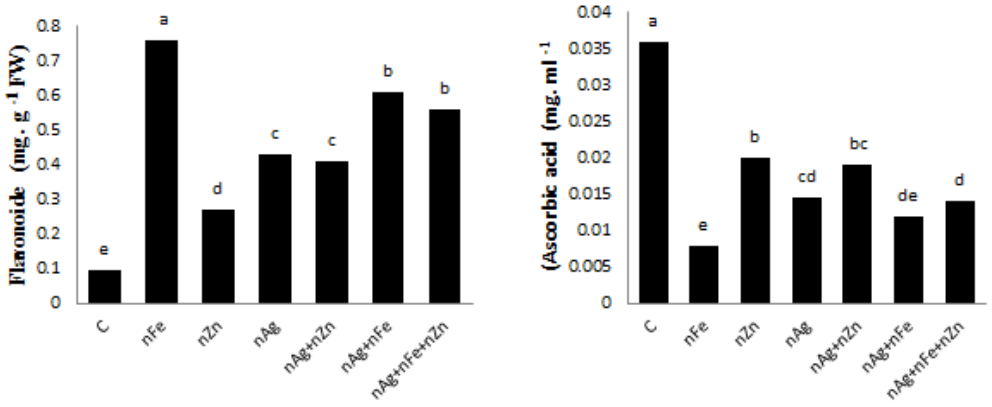
شکل ۱- میزان پروتئین و گالیک اسید در کالوس اسطوخودوس تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات فلزی
(ستونهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند)
C: شاهد بدون کاربرد نانو کود، **nFe**: نانو اکسید آهن، **nZn**: نانو اکسید روی و **nAg**: نانو اکسید نقره

Fig 1- Amount of protein and Galic acid in Lavender callus under application of mental nano element (Collumns with at least 1 same letter had no significant difference based on Duncan test)
C= Control, nFe= Iron nano oxide, nZn= Zinc nano oxide and nAg= silver nano oxide

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که میزان فلاونوئید نمونه‌های اسطوخودوس تحت تأثیر تیمار نانوذرات فلزی قرار گرفته و کاربرد نانوذرات فلزی سبب شد که میزان فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر باشد. برطبق نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که کاربرد تنهای نانوذرات آهن اثر مثبت بیشتری بر میزان فلاونوئید جداکشت‌های اسطوخودوس داشت و بالاترین میزان فلاونوئید به مقدار ۰/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در این سطح از تیمار حاصل گردید که نسبت به سایر سطوح تیمار مذکور دارای اختلاف معنی‌دار بود. عدم کاربرد نانوذرات فلزی نیز سبب شد که کمترین محتوای فلاونوئید در جداکشت‌های اسطوخودوس به میزان ۰/۰۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک حاصل گردد و اختلاف این تیمار نیز با سایر تیمارهای آزمایش از نظر آماری معنی‌دار بود. در بین سطوح کاربرد تنهای نانوذرات فلزی نیز کمترین محتوای فلاونوئیدی به میزان ۰/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در تیمار کاربرد تنهای نانوذرات روی حاصل گردید و بین کاربرد تنهای هر سه فلز روی، آهن و نقره نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود داشت (شکل ۲). علاوه بر گالیک اسید مشاهده شد که کاربرد نانوذرات فلزی نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش فلاونوئید در گیاه اسطوخودوس گردید. کاربرد الیسیتورهایی مانند نیترات نقره منجر به افزایش ترکیبات فلاونوئیدی شد (علیرضایی و همکاران، ۱۳۹۶) که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. در این مطالعه نیز کاربرد نانوذرات نقره، روی و آهن به عنوان الیسیتورهای غیرزیستی سبب شد که ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه اسطوخودوس حاصل از کشت بافت نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته و در بین این الیسیتورها، کاربرد نانواکسید آهن توانست اثر مثبت بیشتری بر افزایش ترکیبات فلاونوئیدی ریزجدایه‌های گیاه اسطوخودوس داشته باشد. آزمایشات یوسفی و همکاران (۱۳۹٤) نشان داد که افزایش تولید

فلاونوئیدها در زیره سیاه به دلیل افزایش فعالیت آنزیم فلاون سینتاز ۲ بوده است، که پاسخی برای کاهش اثرات تنش یونی است. افزایش محتوای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها که در یک مسیر آبشاری و توسط تعداد زیادی آنزیم کاتالیز می‌شوند، می‌تواند با افزایش تولید آنزیم‌های این مسیر مرتبط باشد (یوسفی و همکاران، ۱۳۹٤). در این رابطه می‌توان به افزایش معنی‌دار بیان ژن FNS I در گیاهچه‌های تحت تیمار این الیسیتور اشاره نمود. البته تاکنون افزایش بیان برخی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها از قبیل تیروزین آمینو ترانسفراز (نصیری و همکاران، ۱۳۹۰) در گیاه بادرنجبویه تحت تیمار با این الیسیتور گزارش شده است. همچنین نتایج تحقیقات نشان داد که استفاده از نانوذرات نیترات نقره منجر به افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها شده و همچنین منجر به کاهش قدرت کاهشی، مهار رادیکال‌های آزاد و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در کالوس‌های حاصل از جداکشت گیاه اسطوخودوس شد (Radhakrishna *et al*., 2014)، که با نتایج آزمایش حاضر مطابقت دارد. رضوی‌زاده (۱۳۹۸) در مطالعه خود عنوان داشتند که ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه گوجه در شرایط کاربرد نانوذرات فلزی از قبیل نقره افزایش یافت که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. برخی از محققین علت افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در اثر کاربرد نانوذرات فلزی را ایجاد شرایط تنش در گیاه عنوان نمودند که در نهایت گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش داده و در نتیجه آن میزان ترکیبات فلاونوئیدی نیز افزایش یافته است (Qian *et al*., 2013). در مطالعه Yan و همکاران (1996) افزایش میزان ترکیبات فلاونوئیدی با کاربرد نیترات نقره در غلظت‌های متوسط گزارش شده است. همچنین Ghokhale و Bansal (2010) در مطالعه خود افزایش ترکیبات فلاونوئیدی را با کاربرد این فلزات گزارش نمودند. همچنین کاربرد نانوذرات فلزی همانند نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش محتوای ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه شنبلیله شد (نوح‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۹). اسید آسکوربیک به عنوان یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی تحت تأثیر تیمار کاربرد نانوذرات فلزی قرار گرفت و مشخص شد که کاربرد نانوذرات فلزی دارای اثر منفی بر میزان اسید آسکوربیک بودند و تیمار شاهد که هیچ کدام از این عناصر به کار برده نشدند دارای بیشترین مقدار اسید آسکوربیک به میزان ۰/۰۳٦ میلی‌گرم بر لیتر بود در حالی که با کاربرد تنهای نانو اکسید آهن کمترین مقدار اسید آسکوربیک به میزان ۰/۰۰۷۸ میلی گرم بر لیتر ثبت گردید (شکل ۲). بر خلاف گالیک اسید و ترکیبات فلاونوئیدی کاربرد نانوذرات فلزی محتوای اسید آسکوربیک را کاهش داد. اسید آسکوربیک یکی از آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی پالاینده رادیکال‌های آزاد برای حفاظت سلول‌ها در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد (Beltagi, 2008). پاسخ‌های آنتی‌اکسیداتیو در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن به نوع نانوذره فلزی به کار برده شده، گونه گیاهی و شرایط تیمار بستگی دارد (نوح پیشه و همکاران، ۱۳۹۹). در این مطالعه نیز کاربرد نانوذرات فلزی منجر به کاهش میزان اسید آسکوربیک تولیدی در گیاه اسطوخودوس شد و در تیمار شاهد بیشترین میزان اسید آسکوربیک حاصل

گردید. هر چند که افزایش در محتوای آنتی‌اکسیدانت‌ها کارایی پالایش گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهد (Ahmad *et al.*, 2017)، ولی در این مطالعه مشاهده شد که در شرایط کاربرد نانوذرات فلزی محتوای آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی مانند اسیدآسکوربیک کاهش یافت که به احتمال زیاد یا به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات فلزی در غلظت کاربرد ۳۰ پی‌پی‌ام بوده و یا به دلیل سمیت بالای نانوذرات در این غلظت بوده که منجر به عدم کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. کاهش میزان آنتی‌اکسیدانت‌های غیرآنزیمی در ریشه گیاه گلرنگ با کاربرد نانوذرات نقره گزارش شده است (محمدی سنجانی و همکاران، ۱۳۹۹)، که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت.



شکل ۲- میزان فلاونوئید و اسید آسکوربیک در کالوس اسطوخودوس تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات فلزی

(ستونهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند)

C: شاهد بدون کاربرد نانو کود، **nFe**: نانو اکسید آهن، **nZn**: نانو اکسید روی و **nAg**: نانو اکسید نقره

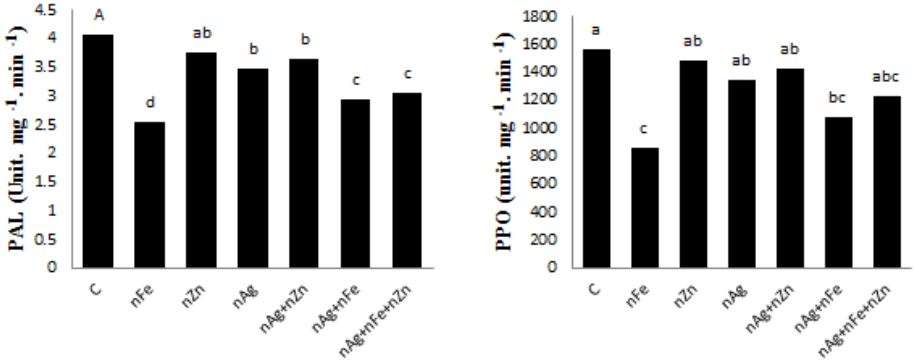
Fig 2- Amount of flavonoide and ascorbic acid in Lavender callus under application of mental nano element
(Collumns with at least 1 same letter had no significant difference based on Duncan test)
C= Control, nFe= Iron nano oxide, nZn= Zinc nano oxide and nAg= silver nano oxide

اثر معنی‌دار تیمار کاربرد نانوذرات فلزی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز نشان داد که کاربرد این عناصر منجر به کاهش میزان فعالیت این آنزیم در کالوس حاصل از جداکشت گیاه اسطوخودوس شد. براساس این نتایج مشخص شد که تیمار عدم کاربرد نانوذرات فلزی سبب شد که بالاترین میزان فعالیت این آنزیم به میزان ٤/۰۸ میکرومول سینامیک اسید بر میلی گرم پروتئین در دقیقه حاصل گردد و از این نظر با سایر سطوح این تیمار دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود. در بین تیمارهای کاربرد نانوذرات فلزی نیز مشخص شد که کاربرد تنهای نانوذرات آهن دارای اثر منفی بیشتری بر میزان فعالیت این آنزیم بود و فعالیت این آنزیم با کاربرد این نانوفلز ۲/۵۵ میکرومول سینامیک اسید در دقیقه بود که نسبت به سایر تیمارهای آزمایش کمترین مقدار بود و پس از این تیمار کمترین مقدار فعالیت این آنزیم در تیمار

کاربرد همزمان نانوذرات آهن و نقره به مقدار ۲/۹۵ میکرومول سینامیک اسید در دقیقه حاصل گردید و این دو تیمار به هم دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند. کاربرد تنهای نانوذرات نیترات نقره و اکسید روی سبب شد که میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز به ترتیب ۳/٤۸ و ۳/۷۵ میکرومول سینامیک اسید بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه باشد (شکل ۳). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با کاربرد نانوذرات فلزی نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. کاربرد نانوذرات فلزی به احتمال زیاد خود دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و با کاربرد آنها در گیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه افزایش یافته و در نتیجه نیاز به فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درونی گیاه کمتر بوده و از میزان فعالیت آنها در درون گیاه کاسته شده است و در نتیجه در تیمار کاربرد نانوذرات فلزی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت درونی گیاه از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، فنیل آلانین آمونیالیاز، پلی فنل اکسیداز و همچنین مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد کاهش یافته که در مقایسه تیمار شاهد دارای تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاه بوده که تحت تأثیر کاربرد نانوذرات فلزی از فعالیت آن کاسته شد و این کاهش فعالیت بدین دلیل است که کاربرد نانوذرات فلزی ممکن است همانند شرایط وقوع تنش در گیاه عمل نموده و منجر به تغییراتی در میزان فعالیت این آنزیم گردند و واکنش گیاه به کاربرد این نانوذرات فلزی بستگی به غلظت کاربرد آن دارد که در نهایت ممکن است منجر به افزایش و یا کاهش میزان فعالیت آن گردد (علیرضایی و همکاران، ۱۳۹٦). کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت شرایط کاربرد نانوذرات فلزی به عنوان الیسیتورهای فلزی در برخی دیگر از مطالعات نیز گزارش شده است (Jadczak *et al*., 2020) که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. این محققین همچنین در این مطالعه عنوان داشتند که برخی گونه‌های گیاهی در غلظت‌های بالای نانوذرات نقره بدون هیچ اثر ممانعتی بـه رشـد و تولیـد ترکیبات ثانوی ادامه می‌دهند اما برخی گونه‌ها در غلظت‌های بالا آسـیب می‌بینند و تولید متابولیت‌های ثانوی و فعالیت آنتی‌اکسـیدانی در آن‌ها کاهش می‌یابد (Jadczak *et al*., 2020). رضوی زاده (۱۳۹۸) در مطالعه خود روی گیاه گوجه عنوان داشت که کاربرد نانوذرات نقره منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ریشه گوجه شده که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. کاربرد نانوذرات نقره منجر به کاهش میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه آرتمیزیا گردید و در توجیه این مطلب عنوان شد که نانوذرات نقره در حذف گونه‌های فعال اکسیژن با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت همکاری نموده و حضور آنها دلیلی برای شروع زودتر دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاه بوده که در نتیجه آن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در جهت پالایش گونه‌های فعال اکسیژن کاهش می‌یابد (شبانی و صغیرزاده، ۱۳۹٦). بر طبق نتایج مشخص شد که کاربرد نانوذرات فلزی بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز دارای اثر منفی بودند و در بین این سه عنصر کاربرد نانوذرات آهن دارای بیشترین اثر منفی بر فعالیت این آنزیم

بودند به طورزی که کمترین میزان فعالیت این آنزیم به مقدار ۸۵۳/۹ واحد بر دقیقه بر گرم وزن تر در تیمار کاربرد تنهای نانوذرات آهن به دست آمد و پس از آن تیمارهای تلفیقی که در آنها عنصر آهن به کار برده شد دارای میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز کمتری نسبت به سایر تیمارها بودند. عدم کاربرد نانوذرات فلزی سبب شد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز به میزان ۱۵۶۱/۷ واحد بر دقیقه بر گرم وزن تر حاصل گردد (شکل ۳). جبران کاهش میزان فعالیت آنزیمی در گیاه اسطوخودوس با کاربرد نانوذرات نقره، آهن و روی صورت گرفته و سبب شده که گیاه به فعالیت آنزیم‌های خود از قبیل پلی فنل اکسیداز نیاز کمتری داشته و در نتیجه کاربرد این نانوذرات منجر به کاهش میزان فعالیت این آنزیم شده است. کاربرد نانوذرات فلزی بر روی میزان بیان ژن‌های دخیل در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اثر داشته و منجر به تغییر در میزان فعالیت آنها شده و این تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط کاربرد الیسیتورهای فلزی در گیاه آرابیدوپسیس گزارش شده است (Kaveh *et al*., 2013). کاربرد نانو کود کلات آهن سبب شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در گیاهان کاهش دهد (Peyvandi *et al*., 2011). صالحی و همکاران (۱۳۹۸) در مطالعه خود روی گیاه لوبیا عنوان داشتند که نانوذرات فلزی مانند نانوذرات روی منجر به کاهش و یا افزایش جزئی در فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است و علت کاهش در میزان فعالیت این آنزیم را تا حدودی به خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات فلزی نسبت دادند که منجر به کاهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت می‌گردد. البته بایستی در نظر داشت که کاربرد نانوذرات فلزی که منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است می‌تواند به طور غیر مستقیم نیز به دلیل کاهش سطح گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل و حتی رادیکال اکسیژن باشد که ممکن است به خاطر افزایش در جذب مغذی‌های کلیدی مانند نیتروژن باشد که نقش مهمی را در سنتز پروتئین، مسیرهای متابولیسمی و هوموستاز یون‌ها دارد که این کاهش خود منجر به نیاز کمتر به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و در نتیجه فعالیت کمتر این آنزیم‌ها در تیمار کاربرد نانوذرات فلزی نسبت به تیمار شاهد می‌باشد (Alharby *et al*., 2016). همچنین عنوان شده است که نانوذرات اکسید روی باعث القای ژن‌های AtKC1 و AtCHX17 در ریشه و بخش هوایی گیاه آرابیدوپسیس شد، که این ژن‌ها مسئول حفظ هومئوستازی مواد معدنی و یون‌ها هستند و این نشان می‌دهد که کاربرد نانوذرات فلزی در گیاهان تنش اکسیداتیو را با افزایش سنتز برخی پروتئین‌ها و تنظیم فرایندهای بیوشیمایی کلیدی در متابولیسم خنثی می‌کنند و به طور غیرمستقیم دارای خواص آنتی‌اکسیدانی برای گیاه هستند (Nair and Chung, 2015). تغییرات القا شده در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندازه‌گیری شده در گیاه اسطوخودوس مشابه بوده و با کاربرد تنهای نانواکسید آهن کمترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها به دست آمد و بر طبق این نتایج مشخص شد که

بالاترین میزان فعالیت همه‌ی آنزیم‌های مختلف آنتی‌اکسیدانت در تیمار شاهد حاصل گردید.



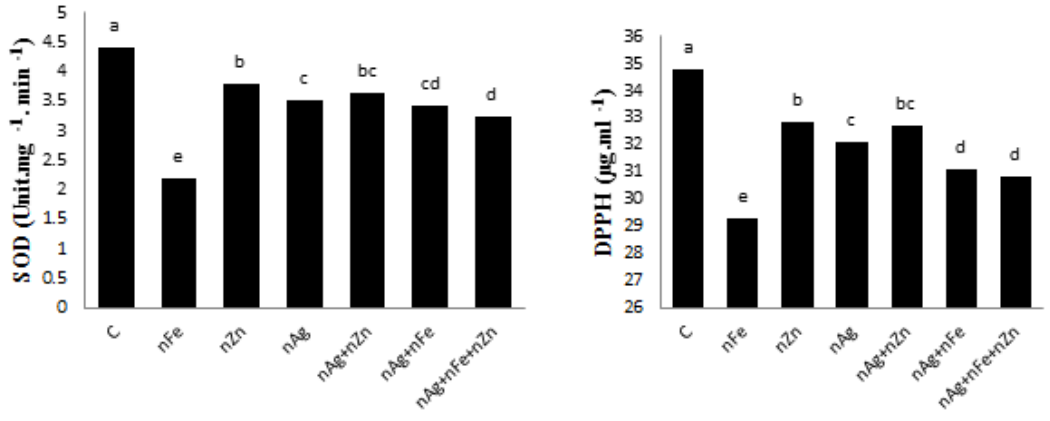
شکل ۳- فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز و پلی فنل اکسیداز در کالوس اسطوخودوس تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات فلزی
(ستونهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند)
C: شاهد بدون کاربرد نانو کود، **nFe**: نانو اکسید آهن، **nZn**: نانو اکسید روی و **nAg**: نانو اکسید نقره

Fig 3- Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenyl oxidase (PPO) activities in Lavender callus (Collumns with at least 1 same letter had no significant under application of mental nano element difference based on Duncan test)
C= Control, nFe= Iron nano oxide, nZn= Zinc nano oxide and nAg= silver nano oxide

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سلول‌های گیاهی بوده که تحت تأثیر کاربرد نانوذرات فلزی قرار گرفت و مشخص شد که کاربرد نانوذرات روی، نقره و به خصوص آهن سبب شد که میزان فعالیت این آنزیم کاهش یابد. تیمار شاهد بالاترین مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به میزان ٤/٤٢ واحد بر گرم وزن تر را دارا بود و مشاهده شد که با کاربرد نانوذرات فلزی میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافت به طوری که در تیمار کاربرد تنهای نانواکسید آهن کمترین میزان فعالیت آنزیم به مقدار ۲/۱۸ واحد بر گرم وزن تر حاصل شد (شکل ٤). کمتر بودن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت همانند سوپراکسیددیسموتاز به احتمال زیاد بدین دلیل است که فراهمی نانوذرات فلزی روی، آهن و نقره گیاه را از شرایط تنش اکسیداتیو تا حدودی خارج نموده و نیاز کمتری به انجام فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کمتر بوده و این وضعیت با کاربرد تنهای نانوذرات آهن پررنگ‌تر می‌گردد. اثر کاهنده کاربرد نانوذرات فلزی در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند سوپراکسید دیسموتاز در مطالعه برخی دیگر از محققین نیز مشاهده شد (رضوی زاده، ۱۳۹۸)، که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. در این زمینه Mittler (2002) عنوان نمود که تفاوت در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به مثابه سیگنالی است که مکانیسم پالایش گونه‌های فعال اکسیژن را تنظیم می‌کند. تیمار بدون کاربرد آهن دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز بودند (عسکری و همکاران، ۱۳۹۷، Peyvandi *et al.*, 2011). در برخی دیگر از مطالعات عنوان شده است که کاربرد نانوذرات فلزی مانند نانوذرات آهن و روی منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شد و کاربرد این نانوذرات در غلظت‌های بالاتر منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است (Solimani *et al.*, 2015). در این مطالعه نیز مشاهده شد که در تیمار شاهد بالاترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و پلی‌فنل اکسیداز حاصل شد و کاربرد هم‌زمان هر سه نانوذره فلزی آهن، روی و نقره سبب شد که میزان فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به کاربرد تنها این سه نانوذره‌ی فلزی به میزان بیشتری افت نموده و به احتمال زیاد می‌تواند یا به دلیل اثر افزاینده آنتی‌اکسیدانی آنها بر پالایش گونه‌های فعال اکسیژن باشد و یا به دلیل اثر سمیت بیش آنها بوده که سبب کاهش میزان فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانت شده است. کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت با کاربرد نانوذرات فلزی در مطالعه Krishnaraj و همکاران (2012) نیز گزارش شده است که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد (DPPH) تحت تأثیر تیمار کاربرد نانوذرات فلزی قرار گرفت و مشخص شد که بالاترین مقدار مهار فعالیت رادیکال های آزاد به میزان ۳٤/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در تیمار شاهد حاصل شد و کاربرد نانوذرات فلزی منجر به کاهش مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد گردید به طوری که کمترین میزان مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد به مقدار ۲۹/۸ میکرو گرم بر میلی‌لیتر در تیمار کاربرد تنهای نانو اکسید آهن حاصل شد. پس از تیمار کاربرد تنهای نانوذرات آهن، تیمار کاربرد همزمان سه نانوفلز آهن، روی و نقره سبب شد که کمترین میزان مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد به مقدار ۳۰/۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل گردد (شکل ٤). در این مطالعه میزان مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) با کاربرد نانوذرات فلزی کمتر از تیمار شاهد بود. کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با کاربرد نانوذرات فلزی روی، آهن و نقره از یک جهت دیگر می‌تواند نتیجه کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه باشد که سبب کاهش فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است و این می‌تواند به دلیل کاربرد آنها در مقادیر بالا باشد، زیرا کاربرد نانوذرات روی آهن و نقره در مقادیر بالا می‌تواند در گیاه منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن را بالا برده و گیاه توانایی مقابله با آن را نداشته و در نتیجه طرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز کاهش می‌یابد (Jiravova *et al.*, 2016). نتایج تحقیق علیرضایی و همکاران (۱۳۹٦) نیز بیانگر کاهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقادیر بالای کاربرد نیترات نقره به دلیل کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاه اسطوخودوس می‌باشد ولی در مقادیر کمتر از کاربرد این فلز میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس افزایش یافته است. نوح‌پیشه و همکاران (۱۳۹۹) نیز در مطالعه خود روی گیاه سنبلیله عنوان داشتند که کاربرد نانوذرات اکسید روی دارای اثر معنی‌داری بر DPPH این گیاه بوده و میزان

اثر آن بستگی به غلظت کاربرد آن و برهم‌کنش آن با موادی از قبیل Nacl دارد. در مطالعه‌ای دیگر عنوان شده است که کاربرد نانوذرات آهن و روی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل اثر داشته و افزایش غلظت آن تا حدودی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده و در غلظت‌های بالاتر از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا حدودی کاسته شده است (Solimani *et al.*, 2015). به هر حال به نظر می‌رسد که کاهش میزان فعالیت کلی آنتی‌اکسیدانی در گیاه اسطوخودوس بدین دلیل است که کاربرد همزمان نانوذرات فلزی خود منجر به ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه شده و اثرات تنش اکسیداتیو را تخفیف داده و در نتیجه نیاز درونی گیاه برای پالایش این گونه‌های فعال اکسیژن کمتر شده و در نتیجه میزان DPPH نیز نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است. نانوذرات موجب به راه انداختن جریان کلسیم یا مولکولهای سیگنال در سیتوزول می‌شوند که توسط پروتئین‌های اتصالی به کلسیم یا سایر پروتئین‌های ویژه نانوذرات دریافت می‌شوند و بیان ژن و تحمل گیاه به تنش اکسیداتیو را افزایش می‌دهند (Khan *et al.*, 2016). البته ممکن است کاربرد نادرست نانوذرات منجر به اثرات منفی روی گیاه باشد که اثرات سمی نانوذرات بر گیاهان به اندازه ذرات، غلظت، ساختار و ویژگی شیمیایی جایگاه استقرارآنها بستگی دارد (نوح‌پیشه و همکاران، ۱۳۹۹). تحقیقات نشان داد در گیاهانی که از نانو اکسید آهن استفاده نشد، میزان مهار رادیکال‌های آزاد به شدت افزایش یافت زیرا استفاده از آهن در گیاه سبب ایجاد شرایط مناسب رشدی در محیط‌های کشت شده و در نتیجه منجر به کاهش میزان مهار رادیکال‌های آزاد شد (عسکری و همکاران ۱۳۹۳). در مطالعه اصل محمدی و همکاران (۱٤۰۰) مشخص شد که بین فعالیت اکسندگی آنتی‌اکسیدانت‌ها با کاربرد عناصر ریزمغذی از قبیل روی و آهن ارتباط وجود داشته که تأیید کننده نتایج حاصل از این مطالعه می‌باشد. در برخی دیگر از مطالعات نیز مشخص شد که در گیاه اسطوخودوس کاربرد الیسیتورهایی نظیر نیترات نقره در غلظت‌های بالا منجر به کاهش مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد گردید (علیرضایی و همکاران، ۱۳۹٦)، که با یافته‌های حاصل از این مطالعه تطابق داشت. تغییر در مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد به تغییر در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نسبت داده شده است (Soobratte *et al.*, 2005). در این مطالعه نیز چون بالاترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تیمار شاهد حاصل شد مشاهده شد که این تیمار دارای بالاترین مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد بود و کاربرد نانوذرات فلزی منجر به کاهش آن شد. ذرات نقره توانایی تغییر مسیر متابولیسمی سنتز ترکیبات ثانویه را دارند و می‌توانند ترکیبات ثانوی را کاهش داده و از این طریق بر ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی اثر بگذارند (Ghanati *et al.*, 2014).



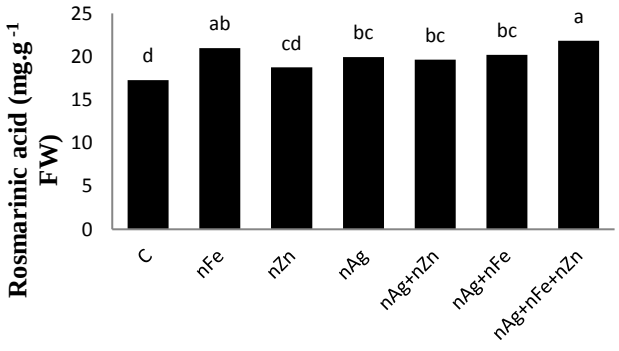
شکل ٤- فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و مهار رادیکال‌ها در کالوس اسطوخودوس تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات فلزی (ستونهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند)

C: شاهد بدون کاربرد نانو کود، nFe: نانو اکسید آهن، nZn: نانو اکسید روی و nAg: نانو اکسید نقره

Fig 4- Super oxide dismutase (SOD) and DPPH activities in Lavender callus under application of mental nano element (Collumns with at least 1 same letter had no significant difference based on Duncan test)
C= Control, nFe= Iron nano oxide, nZn= Zinc nano oxide and nAg= silver nano oxide

براساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که کاربرد سه نانوذره روی، آهن و نقره دارای اثر مثبتی بر افزایش میزان رزمارینیک اسید در گیاه اسطوخودوس گردید و در بین سطوح مختلف این تیمار نیز با توجه به وجود اختلاف معنی‌دار، بالاترین میزان رزمارینیک اسید به میزان ۲۱/۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در تیمار کاربرد هم‌زمان نانوذرات آهن، روی و نقره به دست آمد و این تیمار با سایر تیمارهای آزمایش به جز تیمار کاربرد تنهای نانوذرات آهن (۲۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود. عدم کاربرد نانوذرات فلزی منجر به کاهش میزان تولید رزمارینیک اسید شد به طوری که در سطح تیمار شاهد که هیچ کدام از نانوذرات فلزی به کار نرفتند کمترین میزان رزمارینیک اسید به میزان ۱۷/۲۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک حاصل گردید و با سایر تیمارهای آزمایش به جز تیمار کاربرد نانوذرات روی (۱۸/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) دارای تفاوت آماری معنی‌دار بود. بر طبق نتایج مشخص شد که میزان رزمارینیک اسید در سطوح کاربرد نانو اکسید آهن، نانو نیترات نقره و نانو اکسید روی به ترتیب ۲۰/۹۸ و ۱۹/۹۵ و ۱۸/۷۶میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود (شکل ۵). در این مطالعه کاربرد همزمان نانوذرات آهن، روی و نقره با اثر سینرژیستی خود منجر به افزایش بیشتر محتوای رزمارینیک اسید به عنوان ترکیب اصلی اسانس گیاه اسطوخودوس شدند که بالاتر از کاربرد تنهای هر یک از این نانوذرات بود. در این زمینه رستمی و همکاران (۱۳۹۹) عنوان داشتند که کاربرد نانوذرات روی و آهن منجر به افزایش ترکیبات اصلی اسانس گیاه نعناع فلفلی از قبیل منتول و منتون شد، که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. افزایش میزان رزمارینیک

اسید با کاربرد نانوذرات فلزی به دلیل افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در سنتز رزمارینیک اسید تحت اثر کاربرد نانوذرات نقره و روی می‌باشد (Yan *et al*., 2006). یکی از تأثیرات مهمی که یون نقره بر واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه دارد، اثر بر بیان ژن‌های آنزیم‌ها بوده و با تغییر بیان ژن‌ها منجر به افزایش میزان فعالیت آنها و در نتیجه افزایش تولید متابولیت‌هایی از قبیل رزمارینیک اسید می‌گردد (Elumali *et al*., 2010). رزمارینیک اسید از مشتقات ترکیبات فنلی بوده و یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در اسانس گیاه اسطوخودوس بوده که از مسیر فنل پروپانوئید سنتز شده و به طور ویژه در واکوئل‌ها انباشته می‌گردد (Gonçalves and Romano, 2013). بخش مهمی از سیستم دفاعی گیاه به رزمارینیک اسید مربوط می‌باشد(Peterson and Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید در گیاه دارای نقش آنتی‌اکسیدانی بوده و در مقابل تنش‌ها از گیاه محافظت می نماید. استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی در تحریک گیاه برای تولید رزمارینیک اسید نقش موثر و مثبت داشته‌اند (ریاحی مدوار و همکاران ۱۳۹۷). استفاده از نانوذرات نیترات نقره منجر به افزایش رزمارینیک اسید در کالوس‌های حاصل از جداکشت گیاه اسطوخودوس شد (Radhakrishna *et al*., 2014، علیرضایی و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین کمالی‌زاده و همکاران (۱۳۹٤) در تحقیق خود روی گیاه بادرشبو عنوان داشتند که کاربرد نانوذرات فلزی تا غلظت ۳۰ پی‌پی‌ام اثر مثبت بر افزایش میزان رزمارینیک اسید موجود در اسانس این گیاه داشت. پاریان و همکاران (۱۳۹۹) افزایش میزان رزمارینیک اسید در اسانس گیاه مریم گلی قرمز را در اثر کاربرد نانوذرات فلزی گزارش نمودند.



شکل ۵- میزان رزمارینیک اسید در کالوس اسطوخودوس تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانوذرات فلزی
(ستونهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار براساس آزمون دانکن می‌باشند)
C: شاهد بدون کاربرد نانو کود، **nFe**: نانو اکسید آهن، **nZn**: نانو اکسید روی و **nAg**: نانو اکسید نقره

Fig 5- Amount of rosmarinic acid in Lavender callus under application of mental nano element
(Collumns with at least 1 same letter had no significant difference based on Duncan test)
C= Control, nFe= Iron nano oxide, nZn= Zinc nano oxide and nAg= silver nano oxide

نتیجه‌گیری کلی

نانوذرات فلزی به دلیل تغییر در ساختار و اندازه کوچکشان دارای خواص متغیری نسبت به ذرات غیر نانو بوده و اثربخشی آنها نیز بر رشد و خصوصیات بیوشیمیایی گیاه متفاوت می‌باشد. در این مطالعه مشاهده شد که کاربرد نانوذرات روی، آهن و نقره روی سیستم آنتی‌اکسیدانی جداکشت‌های گیاه دارویی اسطوخودوس اثر گذاشته و کاربرد آنها منجر به افزایش میزان پروتئین محلول، گالیک اسید، فلاونوئید و رزمارینیک اسید شد. بر طبق نتایج مشخص شد که حداکثر میزان پروتئین محلول به مقدار ٦/٢٢ میلی‌گرم بر گرم و فلاونوئید به میزان ۰/٧٦ میلی‌گرم بر گرم شد. بیشترین میزان گالیک اسید و رزمارینیک اسید نیز در تیمار کاربرد هم‌زمان هر سه نانوذره روی، آهن و نقره حاصل گردید. کاربرد نانوذرات فلزی منجر به کاهش میزان برخی از آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی گردید، به طوری که بیشترین میزان اسید آسکوربیک (۰/۰۳٦ میلی‌گرم بر گرم)، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (٤/۰۸ میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)، پلی فنل اکسیداز (١٥٦١/٧ واحد بر دقیقه بر گرم)، سوپر اکسید دیسموتاز (٤/٤٢ واحد بر دقیقه بر گرم) و میزان مهار رادیکال‌های آزاد (٣٤/٨ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در تیمار شاهد به دست آمد. بر طبق این نتایج مشخص شد که پالایش گونه‌های فعال اکسیژن توسط سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه اسطوخودوس تحت تأثیر کاربرد نانوذرات فلزی قرارگرفت و این نانوذرات به دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی خود منجر به کاهش میزان اسید آسکوربیک، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و مهار رادیکال‌های آزاد شد.

منابع

۱) اصل محمدی، ز.، محمدخانی، ن و. م، ثروتی. ١٤٠٠. اثر محلولپاشی آهن و روی بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه آویشن باغی تحت کمبود نیتروژن. مجله پژوهشهای گیاهی، ٣٤(٣): ١-١٧.

۲) پاریان، س.، قربانپور، م و. ج، هادیان. ۱۳۹۹. تأثیر نانوذرات اکسید سریم بر شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و محتوای تانشینون ریشه مریم گلی قرمز در دو روش محلول‌پاشی برگی و تغذیه خاکی. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۹(۷۵): ١٦٨-١٨٧.

۳) رستمی، ق.، مقدم، م.، قاسمی پیربلوطی، ع و. ع، تهرانی فر. ۱۳۹۹. اثر سولفات و نانو ذرات آهن و روی بر زیست توده، مقدار و ترکیبات روغن‌های اسانسی نعناع فلفلی تحت تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۳(۳): ٥٩-٤٤.

٤) رستمی، م.، جوادی، ا و. س م، حسینی‌زاده. ۱۳۹۹. القای مقاومت به تنش شوری در بذرهای بدست آمده از بوته‌های گندم محلولپاشی شده با نانواکسید روی و آهن. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۳(۳): ۲۸-٤۲.

٥) رضوی‌زاده، ر. ۱۳۹۸. اثر نانو ذرات نقره بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان و الگوی پروتئین محلول کل در گیاهچه‌های گوجه در در شرایط In vitro . مجله علمی - پژوهشی دانشگاه الزهرا)س(. زیست شناسی کاربردی، ۳۱(۳): ۲۲-۳۸.

٦) ریاحی مدوار، ع.، نصیری بزنجانی، م.، رضائی، ف و. ا، باقی زاده. ۱۳۹۷. تجمع رزمارینیک اسید و بیان ژن آنزیم تیروزین آمینو ترانسفراز در گیاهچه‌های بادرنجبویه تیمار شده با نانو ذره اکسید مس. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۳۱(۱): ٤٥-٣٦.

۷) شبانی، ل. و. ب، صغیرزاده. ١٣٩٦. بررسی پاسخهای دفاع آنتی اکسیدانی در کشت ساقه

Artemisia annua L تحت تنش نیترات نقره. مجله پژوهشهای گیاهی، ۳۰(۱): ۱۱۹-۱۳۱.

۸) صالحی. ه.، چهرگانی راد، ع.، مجد، ا. و. م، غلامی. ۱۳۹۸. تأثیر نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم بر میزان انباشت عناصر روی و سریم، برخی پارامترهای رشد و بیوشیمیایی در گیاه لوبیا. مجله پژوهشهای گیاهی، ۳۲(۲): ۳۹۰-۴۰۵.

۹) عسگری، م.، امینی، ف.، طالبی، س م و. م، شفیعی گواری. ۱۳۹۷. اثرات کلات آهن و نانو ذرات اکسید اهن بر برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی گیاه یونجه. تنشهای محیطی در علوم زراعی، ۱۱(۲):۴۵۸-۴۴۹.

۱۰) علیرضایی، ف.، کیارستمی، خ و. م، حسین زاده نمین. ۱۳۹۶. بررسی اثرات نیترات نقره بر ترکیبات و فعالیتهای آنتی اکسیدانی کالوسهای حاصل از جداکشت برگ گیاه اسطو خودوس. زیست شناسی کاربردی، ۳۰(۱): ۱۵۷-۱۳۷.

۱۱) قاسمی، ر.، ناصری، پ و. ح، نوروزی. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ایزوزیمهای سوپراکسید دیسموتاز تحت شرایط تغذیه با منابع مختلف آهن در گیاه آلوئه‌ورا. فرایند و کارکردهای گیاهی، ۱۷(۵): ۴۰- ۲۹.

۱۲) کمالی‌زاده، م.، بی همتا، م ر.، پیغمبری، س ع و. ج، هادیان. ۱۳۹٤. اثر سطوح مختلف نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر دو ترکیب فنلی مهم در گیاه دارویی بادرشبو. دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۱(۳): ٤۲۸-٤۳۵.

۱۳) محمدی سنجانی، ع.، حسین‌زاده نمین،م و. م، صراحی نوبر. ۱۳۹۹. تاثیر تیمار نانو ذرات نقره بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه گلرنگ. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه الزهرا، ۳۳(٤): ۱٤۹-۱٦٤.

۱٤) نصیری بزنجانی، م.، ریاحی مدوار، ع و. ا، باقی زاده. ۱۳۹۰. القای تولید ماده موثر رزمارینیک اسید در گیاه بادرنجبویه در مرحله گیاهچه‌ایی و بررسی بیان آنزیم تیروزین آمینو ترانسفراز. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته.

۱۵) نوح‌پیشه، ز.، امیری، ح.، محمدی غلامی، ع و. س، فرهادی. ۱۳۹۹. بررسی کاربرد نانوذره اکسید روی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی دو رقم از شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تنش شوری. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۹(۳۵): ٤۲۲-٤۳۷.

۱٦) یوسفی، ک.، ریاحی مدوار، ع و. ا، باقی زاده. ۱۳۹٤. بررسی تاثیر الیسیتورهای نقره و مس بر بیان ژن فلاون سینتاز ۱ و برخی پارامترهای بیوشیمیایی در گیاهچه های زیره سبز بومی ایران، ۲۸(۱): ۲۱۰- ۲۲۳.

17) Ahmad, P., Ahanger, M. A., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Egamberdieva, D., Bhardwaj, R. and M, Ashraf. 2017. Zinc application mitigates the adverse effects of NaCl stress on mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern and Coss] through modulating compatible organic solutes, antioxidant enzymes, and flavonoid content. *Journal of Plant Interactions*, 12: 429-437.

18) Alharby, H.F, Metwali, E.M.R, Fuller, M.P. and A.Y, Aldhebiani. 2016. The alteration of mRNA expression of SOD and GPX genes, and proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill) under stress of NaCl and/or ZnO nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(6): 773–781.

19) Armin, M., Akbari, S. and S, Mashhadi. 2014. Effect of time and concentration of nano-Fe foliar application on yield components of wheat. *International Journal of Biosciences*, 4(9): 69-75.

20) Bedlovicova, Z., Strapac, I., Balaz, M. and A, Salayova. 2020. A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. *Molecules*, 25: 3091.

21) Beltagi M.S. 2008. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) induced anabolic changes for salt

31) Jakovljević, D.Z.; Vasić, S.M.; Stanković, M.S.; Čomić, L.R. and M. D, Topuzović. 2015. Secondary metabolite content and in vitro biological effects of *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb subsp. chamaepitys. *Archive of Biological Science*, 67: 1195–1202.
32) Jiravova. J., Tomankova, K.B., Harvanova, M., Malina, L., Malohlava, M., Luhova, L., Panacek, A., Manisova, B. and H, Kolarova. 2016. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food and chemical toxicology*, 96:50-61.
33) Jo, Y-K, Cromwell, W., Jeong, H-K., Thorkelson, J., Roh, J-H. and D.B, Shin. 2015. "Use of silver nanoparticles for managing Gibberella fujikuroi on rice seedlings". *Crop Protection*, 74:65-69.
34) John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and S, Sharma. 2009. "Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L". *Archives of Agronomy and Soil Science*, 55:395- 405.
35) Kaveh R., Li, YS., Ranjbar, S., Tehrani. R., Brueck, C.L. and B, Van Aken. 2013. Changes in Arabidopsis thaliana Gene Expression in Response to Sil-ver Nanoparticles and Silver Ions. *Environmental Science and Technology*, 47(18): 10637-10644.
36) Ke D and M.E, Saltveit. 1986. Effect of calcium and auxin on russet spotting and phenyl alanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. *HortScience*, 21: 1169-1171.
37) Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A. and Z. H, Siddiqui. 2016. Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110: 194-209.
38) Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J.M., Ehsani, R. and E.W, Schuster. 2012. "Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection": a review. *Crop protection*, 35:64-70.
39) Kim PS, Djazayeri S. and R, Zeineldin. 2011. Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*; 120:393-403.
40) Kobraee S, Shamsi K. and B, Rasekhi. 2011. Effect of micronutrients application on yield tolerance in chick pea (*Cicer arietinum* L.) plants. *African Journal of Plant Science*, 2(10): 118-123.
22) 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), PP: 248-254.
23) Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and J.C, Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 178-182.
24) Elumalai, E.K., Prasad, T.N., Kambala, V., Nagajyothi, P.C. and E, David. 2010. Green synthesis of silver nanoparticle using Euphorbia hirta L. and their antifungal activities. *Applied Science Research*, 2(6): 76-81.
25) Ghanati, F., Bakhtiarian, S., Mohammadparast, B. and M, Keyhani. 2014. Production of New Active Phytocompounds by (*Achillea millefolium* L.) after Elicitation with Silver Nanoparticles and Methyl Jasmonate. *Journal of Bioscience Biotechnology Research Asia*, 11(2):391-399.
26) Giannopolitis, C.N. and S.K, Ries. 1977. Superoxide dismutase: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
27) Gokhale, M. and Y.K.S, Bansal. 2010. Assessment of Secondary Metabolites in In vitro Regenerated Plantlets of Oroxylum indicum L. Vent. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 20(1): 21-28.
28) Gonçalves, S. and A, Romano. 2013. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 31: 166–174.
29) Gutierrez Rodriguez, M.N. 2016. Evaluation o secondary and micronutrients in Kansas (Doctoral dissertation, Kansas State University). 235p.
30) Jadczak, P., Danuta K., Radosław D., Włodzimierz P. and P, Agnieszka. 2020. "Effect of AuNPs and AgNPs on the Antioxidant System and Antioxidant Activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from In Vitro Cultures" *Molecules*, 25: 23: 5511.

European Journal of Experimental Biology, 3: 232-240.

50) Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakrin Journal of Science and Technology*, 26: 211–219.
51) Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., José, Núñez, M. and J.C, Parajó. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2): 145-171.
52) Murashige, T. and F, Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473–497.
53) Nair, P.M.G. and I.M, Chung. 2015. Changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2):350-61
54) Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y. and D, Sakthi Kumar. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants: Review. *Plant Science*, 179: 154-163.
55) Niciforovic, N., Mihailovic, V., Maskovic, P., Solujic, S., Stojkovic, A. and D, Pavlovic-Muratspahic. 2010. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 48:3125-30.
56) Nobre, J. 1996. In vitro cloning ad micropropagationof Lavandula stoechas from feld grown plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 46: 151- 155.
57) Pasandi Pour, A., Farahbakhsh, H. and M, Saffari. 2014. Response of fenugreek to short-term salinity stress in relation to lipid peroxidation, antioxidant activity and protein content. *Ethno-Pharmaceutical Products*, 1: 45-52.
58) Perron, N. and J.A, Brumaghim. 2009. Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53:75-100.
59) Petersen, M. and M.S.J, Simmonds. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2): 121-5.

and yield components of soybean. *Annals of Biological Research*, 2 (2), 476-482.
41) Krishnaraj, C., Jagan, E., Ramachandran, R., Abirami, S., Mohan, N. and P, Kalaichelvan. 2012. "Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst". *Plant Growth Metabolism Process Biochemistry*, 47:651-658.
42) Kulisic, T., Dragovic-Uzelac, V. and M, Milos. 2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology Biotechnology*, 44: 485-492.
43) Lopez-Arnaldos, T., Lopez-Serrano, M., Ros., Barcelo, A., Calderon, A.A. and J.M, Zapata. 1995. Spectropho-ometric determination of rosmarinic acid in plant cell cultures by complexation with Fe2+ ions Fresenius› *Journal of Analytical Chemistry*, 351: 311-314.
44) Makowczyńska, J., Sliwinska, E., Kalemba, D., Piątczak, E. and H. Wysokińska. 2016. In vitro propagation, DNA content and essential oil composition of Teucrium scorodonia L. ssp. scorodonia. *Plant Cell Tissue*. 127: 1–13.
45) Marinova, D., Ribarova, F. and M, Atanassova. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40: 255-260.
46) Marschner, H. 2011. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Third Edition. Academic press. 568p.
47) Misawa, N., Truesdale, M.R., Sandmann, G., Fraser, P.D., Bird, C., Schuch, W. and P.M, Bramley. 1994. Expression of a tomato cDNA coding for phytoene synthase in Escherichia coli, phytoen formation in vivo and in vitro and functional analysis of the various truncated gene products. *The Journal of Biochemistry*, 116:980-985.
48) Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 7: 405–410.
49) Mohamadipoor, R., Sedaghathoor, S. and A, MahboubKhomami. 2013. Effect of application of iron fertilizers in two methods 'foliar and soil application' on growth characteristics of Spathyphyllum illusion.

60) Peyvandi, M., Parande, H. and M, Mirza. 2011. Comparison of nano Fe chelate with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of *Ocimum basilicum*. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 4: 89-99.
61) Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L. and Z, Fu. 2013. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model Arabidopsis thaliana. *Journal of Environmental Sciences*, 25: 1947–1955
62) Radhakrishnan, T. O., Jithesh, A. and J.R, Dobaria. 2014. Hight Fequency re-generation protocol for callus culture of peanut leaves using ethylene mod-ulator as culture medium Aaditive. *The Bioscan*, 9(2): 599-604.
63) Rai M, Yadav A, and A, Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Advances*, 27:76-83.
64) Ramachandra, C.T. and P, SrinivasaRao. 2008. Processing of Aloe vera leaf gel. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(2):502-510.
65) Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G.H., Saradhi, P.P., Khanna, P.K. and S, Arora. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of Brassica juncea. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167: 2225-2233.
66) Shukla, P.K., Shukla, S., Rajoriya, P. and P, Misra. 2018. Enhancing crop productivity in saline environment using nanobiotechnology. *Springer International Publishing AG*, part of Springer Nature, 2: 289-302.
67) Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., Firoz, M. and M.Y, Al-Khaishany. 2015. Role of nanoparticles in plants. In: Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and their Impact on Plants. (eds. Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H. and Firoz, M.) Pp. 19-35. Springer International Publishing, Switzerland.
68) Soliman, A.S., EL-feky, S.A. and E, Darwish. 2015. Alleviation of salt stress on Moringa peregrina using foliar application of nanofertilizers. *Journal of Horticulture and Forestry*, 7: 36-47.
69) Soobrattee, M., Neergheen, V., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. and T, Bahorun. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.
70) Yan, Q., Shi, M., Neg, J. and J, Wu. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in Salvia miltiorrhiza hairy roots. *Plant Science*, 170: 853–858.