

تاثیر نانو ذرات نقره سنتز شده زیستی بر روی برخی از شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor* L.)

عارفه حسونند^۱، سارا سعادت‌مند^{۱*}، حسین لاری یزدی^۲، علیرضا ایرانبخش^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۲۳

چکیده

استفاده از نانوذرات زیستی نقش مهمی در افزایش بهره‌وری کشاورزی ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات در گیاهان به عنوان آفت‌کش‌ها، عوامل حفاظتی و مواد مغذی مورد توجه قرار گرفته است. بنفشه سه رنگ گیاه دارویی از خانواده ویولاسه است که دارای خواص دارویی ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی است. در این پژوهش نانوذره‌ی نقره به‌وسیله نیترات نقره و عصاره گیاه بنفشه سه رنگ زیست‌سنتز شد و سپس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بنفشه سه رنگ مطالعه گردید. نتایج نشان داد شاخص‌های مختلف رشد از جمله وزن تر ریشه و ساقه، طول ریشه و ساقه به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر نانوذرات نقره افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین میزان این شاخص‌ها به ترتیب در غلظت‌های ۱۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره مشاهده شد. همچنین میزان پرولین و کربوهیدرات تحت تاثیر غلظت‌های نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد که بیشترین مقدار این شاخص‌ها در ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره مشاهده شد. میزان متابولیت‌های ثانوی از جمله فنل و فلاونوئید تحت تاثیر نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بودند که با بیشترین افزایش همراه بود. حداکثر افزایش میزان آنتوسیانین تحت تاثیر غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره بود. نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد، در تمام غلظت‌های نانوذرات نقره، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، گلوکاتیون ردوکتاز) تحت تاثیر نانوذرات نقره منجر به کاهش فعالیت محتوای مالون دی‌آلدئید شد. براساس نتایج این تحقیق، نانوذرات نقره به عنوان محرکی مناسب جهت افزایش رشد و تولید میزان صفات آنتی‌اکسیدانی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، رشد ریشه، کاتالاز، گلوکاتیون ردوکتاز، مالون دی‌آلدئید

مقدمه

زکام و انسداد عروق استفاده شده است. این گیاه دارای مواد موثره مهمی از جمله سالیسیک اسید و اسیدهای فنولی مانند کافئیک اسید و مشتقات حاصل از آن‌ها، موسیلاژ، فلاونوئیدهای هم‌چون روتین، ویولاتین، ویولاگزانتین، ویتگس، گلیکوزیدهای آنتوسیانیدین می‌باشد (Vukics et al., 2008).

بنفشه سه رنگ با نام علمی *Viola tricolor* L. متعلق به خانواده Violaceae است. از بنفشه سه‌رنگ در طب سنتی برای درمان بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های تنفسی مانند برونشیت، آسم، سیاه سرفه،

*نویسنده مسئول s_saadatmand@yahoo.com

(۲۰۲۰) گزارش کردند که نانو ذرات نقره اثر

علم نانو به دستکاری و تغییر مواد در ابعاد کوچک (نانو) گفته می شود. به طور کلی، نانو ذرات فلزی توسط چندین روش شیمیایی سنتز می شوند (Agarwal et al., 2019). امروزه با توجه به استفاده فراوان نانو ذرات و برای به حداقل رساندن استفاده از مواد مضر زیست محیطی، سنتز نانو ذرات با استفاده از روش زیستی پیشنهاد شده است (Chand et al., 2019). بهترین روش سنتز زیستی نانو ذرات توسط عصاره گیاهان می باشد. در بین انواع مختلف نانومواد، نانو ذرات نقره نیز یکی از عواملی است که روی بسیاری از فرایندهای مورفولوژی و فیزیولوژی گیاهان اثر می گذارد مطالعات متعددی نشان می دهند که نانو ذرات نقره ممکن است اثرات منفی یا مثبتی بر رشد گیاهان عالی داشته باشند. صفات فیزیولوژیک اهمیت بسزایی در بقا و سازگاری گیاهان در مقابل تنش های محیطی دارند. سلول گیاهی دو نوع متابولیت متفاوت تولید می کند. متابولیت های اولیه که مستقیماً در رشد طبیعی گیاه و فرآیندهای متابولیکی دخیل هستند. متابولیت های ثانویه که به طور مستقیم در رشد دخیل نیستند. متابولیت های ثانویه گیاهان بیشتر مواقع در زمانی که گیاهان در معرض تنش های گوناگون مانند ایستتورها و یا مولکول های پیام رسان قرار می گیرند، تولید می شوند (Khodakovskaya et al., 2012).

اثر نانو ذرات بر عملکرد گیاهان به خواص فیزیکی و غلظت نانو ذرات بستگی دارد (Khodakovskaya et al., 2012). Yin و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که نانو ذرات نقره، رشد گیاه چمن لولیوم *Lolium perenne* را کاهش داده است. Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۲) اثر نانو ذره نقره سنتز شده زیستی را روی رشد گیاه باکوپا *Bacopa monieri* بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره اثر مثبتی بر جوانه زنی دانه و کربوهیدرات داشته ولی محتوای فنل کل را کاهش داده است. Kruszka و همکاران

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در شرایط کشت گلخانه‌ای در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی خرم‌آباد، لرستان اجرا گردید. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با اعمال تیمار نانوذرات نقره در چهار غلظت (۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد. گلخانه‌ها با مخلوطی ۲:۱:۱ با ماسه بادی و کود دامی پوسیده و خاک زراعی پر شد و در هر گلخانه ۳۰ بذر (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) در عمق ۰/۵ سانتی‌متری کاشته شد. گلخانه‌ها در گلخانه با دمای ثابت ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و روش‌نمایی مورد نیاز گیاهان به وسیله نور طبیعی خورشید تامین شد. آبیاری با آب معمولی انجام گرفت. بعد از سبز شدن گیاه و قبل از اعمال تیمار نانوذرات نقره، عمل تنک کردن گلخانه‌ها در چند مرحله انجام شد و برای هر تیمار در هر گلخانه ۴ گیاه گذاشته شد و سایر گیاهان حذف شد.

تهیه عصاره برای تولید نانوذرات نقره: برای تهیه عصاره گیاه بنفشه سه رنگ، ابتدا ۱۰ گرم پودر گل بنفشه سه رنگ به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و سپس در دستگاه بن ماری (در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه) قرار داده شد. از عصاره جهت احیا و سنتز نانو ذره استفاده شد. عصاره با کاغذ صافی واتمن (شماره ۱) فیلتر شد سپس ۴۰ میلی‌لیتر از عصاره به بشر حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره با غلظت ۰/۱ مولار (Sulaiman et al., 2013) افزوده شد.

رنگ عصاره از مایل به قرمز به خاکستری تیره که نشان‌دهنده تولید نانو ذرات نقره بود تغییر یافت. رسوب محلول توسط سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه برداشت و دوبار با آب دیونیزه شده شسته و در دمای ۴۵ درجه در آون خشک شد و برای مطالعه ذخیره شد. بررسی مورفولوژی و ریز ساختار نمونه

معنی‌داری بر تولید ترکیبات فنولی و فیتوالکسین در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا *Arabidopsis thaliana* داشته است. Kumar و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند، در غلظت‌های کم نانوذرات نقره میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داد. Nair و Chung (2014) در مطالعه خود بر روی گیاه برنج به این نتیجه رسیدند که اضافه کردن نانو ذره نقره به محیط کشت سلولی گیاه برنج سبب ایجاد تنش و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر APX، POD، SOD و CAT شد. آنزیم SOD با مهار آنیون سوپراکسید، تولید رادیکال هیدروکسیل را کاهش داد، رادیکال هیدروکسیل به‌عنوان یک ترکیب بسیار واکنش پذیر، به ماکرومولکول‌های مهم مانند DNA، غشاها و پروتئین‌ها آسیب می‌رساند (Ghorbani et al., 2018) Karimi & Mohsenzadeh (۲۰۱۷) و Ábrahám و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند، میزان پرولین در گیاهان گندم و آرابیدوپسیس تحت تاثیر نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. در حالی که سبب کاهش سطح MDA در گیاهان گندم تیمار شده با نانوذرات نقره شد. به طور کلی تیمار نانو نقره سبب افزایش رشد گیاه و افزایش برخی متابولیت‌های ثانویه مثل فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و در نهایت افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های پایین نانو نقره می‌شود (Jurca et al., 2019).

جستجو در منابع نشان می‌دهد تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات نانوذرات بر شاخص‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه بنفشه سه رنگ وجود ندارد. لذا هدف از مطالعه حاضر تولید نانوذرات نقره توسط عصاره بنفشه سه رنگ و اثر نانوذره نقره بر صفات فیزیکی و بیوشیمیایی گیاه بنفشه سه رنگ می‌باشد.

آنالیز فیتوشیمیایی در برگ گیاه بنفشه سه رنگ تحت تیمار با نانوذرات نقره

سنجش فنل کل: سنجش فنل کل براساس روش McDonald و همکاران (۲۰۰۱) و با استفاده از معرف فولین سیو کالتو (مرک) اندازه گیری شد. برای استخراج فنل، ۵ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتو با ۴ میلی لیتر از محلول Na_2CO_3 یک مولار مخلوط شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره گیاهی به مخلوط اضافه گردید. سپس مخلوط حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد پس از این مدت میزان جذب نمونه در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید و میزان ترکیبات فنلی تیمارها به صورت میلی گرم اسید گالیک (GAE) بر گرم وزن خشک بیان گردید.

سنجش میزان فلاونوئید: مقادیر فلاونوئیدها در نمونه عصاره های گیاهی به روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) اندازه گیری شدند. ابتدا ۱۰ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد با ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط شد و سپس، ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه گردید. در مرحله بعد ۰/۵ میلی لیتر از محلول هر عصاره که با ۱/۵ میلی لیتر اتانول مخلوط شده بود، به مخلوط حاوی کلرید آلومینیوم، استات پتاسیم و آب اضافه شد. مخلوط نهایی حاصل برای هر عصاره (با حجم ۵ میلی لیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل Lambda 45 UV/Visible اندازه گیری شد. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در بالا بود اما به جای عصاره، همان حجم متانول ۸۰ درصد به آن اضافه شده بود. مقدار فلاونوئید کل به صورت معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه و بیان شد.

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با ولتاژ شتاب دهنده ۱ تا ۵ کیلووات انجام شد (Frough and Farhadi, 2011).

اعمال تیمار: بعد از تهیه نانوذرات نقره، برای خالص سازی نانوذرات، پودر نانوذرات ۳ بار با آب مقطر شستشو سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد و در نهایت ماده ته نشین شده در دمای اتاق خشک شد. نانوذرات نقره سنتز شده، در چهار غلظت ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر مرحله ۶ تا ۸ برگی گیاه به مدت ۲۱ روز به صورت اسپری برگی اعمال شد. در آخرین مرحله بعد از ۲۴ ساعت، اندام های رویشی گیاه جهت اندازه گیری پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت (Shavalibor et al., 2019).

اندازه گیری پارامترها

اندازه گیری طول ریشه: پس از هر مرحله برداشت طول ریشه از ناحیه یقه تا نوک ریشه با استفاده از خط کش اندازه گیری شد.

اندازه گیری قطر ساقه و ریشه گیاهان و وزن تر اندام های هوایی و ریشه های گیاهان: به ترتیب باکولیس و ترازوی دیجیتال اندازه گیری شدند.

تهیه عصاره گیاه بنفشه سه رنگ برای آنالیز فیتوشیمیایی: ۳۰۰ میلی گرم نمونه پیکررویشی برای آنالیز فیتوشیمیایی استفاده شد. پودر خرد شده برگ گیاه در ۱۰ میلی لیتر متانول ۵۰ درصد مخلوط شد، سپس مخلوط سانتریفوژ شد. پس از آن، مایع رویی جمع آوری و فیلتر شد. عصاره به دست آمده به غلظت نهایی ۱۰ (میلی گرم در میلی لیتر) برای یکنواخت شدن رقیق شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (Shavalibor et al., 2019).

سنجش میزان کربوهیدرات: سنجش قندهای محلول و نامحلول با استفاده از روش فنل-اسیدسولفوریک و با استفاده از روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان پرولین و مالون دی‌آلدئید: برای سنجش میزان پرولین آزاد و مالون دی‌آلدئید به ترتیب از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) و Packer و Heath (۱۹۶۸) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز، به ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH=۷/۵) و ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه اضافه شد و بلافاصله در دستگاه طیف سنج نوری با طول موج ۲۴۰ نانومتر میزان جذب آن ثبت گردید (Beers and Sizer, 1952).

سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز: برای سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز از روش Arora و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵)، ۵۰۰ میکرومولار گلوکاتایون اکسیدشده، ۵۰ میکرومولار NADPH، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی‌مولار Na₂EDTA و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده بود. کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا گردید. واکاوی آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج

سنتر زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه بنفشه سه رنگ انجام شد و ویژگی‌های آن مورد بررسی قرار گرفت. اولین مرحله در تایید بیوستنز

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH): سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) به روش Bhakya و همکاران (۲۰۱۶) اندازه‌گیری شد. ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH مخلوط گردید و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تحت شرایط تاریکی قرار داده شد. پس از این مدت میزان جذب در طول موج ۷۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از اسید اسکوربیک به عنوان یک کنترل مثبت و اتانول به عنوان یک بلانک در این روش استفاده گردید. میزان مهار توسط معادله زیر تعیین شده است:

معادله (۱)

$$A\% = 100 - \frac{\text{sampel}(OD) - \text{ethanol}(OD)}{\text{DPPH}(OD)} \times 100$$

سنجش FRAP: بدین منظور غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره برگ گیاه به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر محلول FRAP که حاوی TPTZ ۱۰ میلی‌مولار، کلرید آهن ۲۰ میلی‌مولار و بافراسات ۳۰۰ میلی‌مولار با pH=۳/۶ است، اضافه شد. شدت رنگ حاصل در طول موج ۵۹۳ nm قرائت شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس مقیاس میکرومول Fe²⁺ بیان شد (Iris et al., 1999).

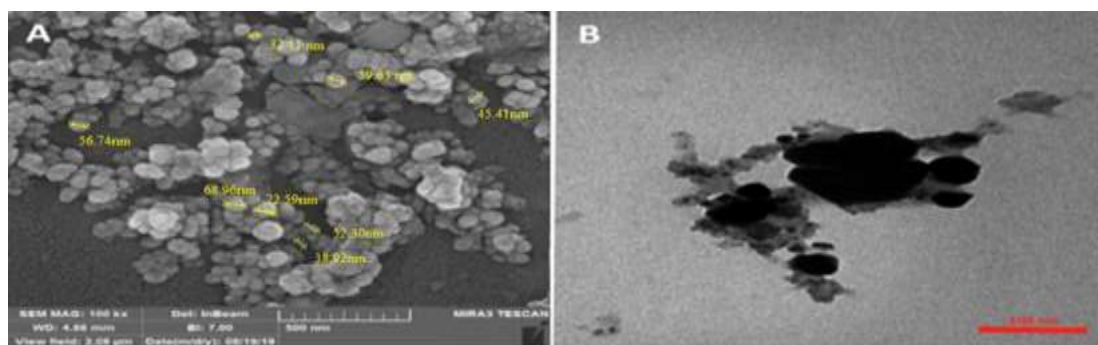
سنجش آنتوسیانین: مقادیر آنتوسیانین برگ در نمونه عصاره‌های گیاهی به روش Rapisarda و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شدند. ابتدا نمونه‌های برگ در هواون چینی حاوی محلول متانول اسیدی کاملاً ساییده شد و عصاره به دست آمده برای مدت ۲۳ ساعت در دمای اتاق و تحت شرایط تاریکی قرار داده شد. سپس جذب محلول رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Lambda 45-UV/Visible) در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای محاسبه‌ی غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی (99000 μmol/cm) استفاده شد.

بیانگر سنتز نانو ذرات با ساختار کروی و سطحی صاف می باشد. اندازه نانو ذرات ساخته شده در محدوده ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر مشاهده می شود نانو ذرات نقره در تصویر تیره تر هستند و اطراف نانو ذرات زمینه ای روشن مشاهده می گردد که مربوط به حلال است (شکل ۲).

نانو ذرات تغییر رنگ تدریجی محلول می باشد. تغییر رنگ محلول با افزودن عصاره گیاهی بنفشه سه رنگ به محلول نیترات نقره رنگ مایل به قرمز عصاره تغییر و به خاکستری تیره تغییر یافت. اولین نشانه احیای نیترات نقره و تشکیل نانو ذرات نقره در محلول همین تغییر رنگ است (شکل ۱). تصاویر SEM و TEM،



شکل ۱: (۱) محلول حاوی عصاره گیاه بنفشه سه رنگ، (۲) محلول نیترات نقره شماره، (۳) محلول حاوی نانو ذرات نقره



شکل ۲: تصویر نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ SEM (A) و TEM (B).

غلظت های نانو ذرات نقره به طور معناداری نسبت به شاهد بیشتر بود. بیشترین افزایش طول ساقه نسبت به شاهد مربوط به غلظت ۱۰ پی پی ام با اندازه (۵/۶۷ cm) بیشترین میزان افزایش قطر ساقه و ریشه به ترتیب مربوط به غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره بود.

وزن تراندام هوایی تحت تاثیر غلظت های مختلف نانو ذرات نقره (۱۰۰ و ۵۰ و ۱۰ پی پی ام) نسبت به شاهد بیشتر بود که این افزایش از لحاظ آماری معنادار

اثر نانو ذرات نقره زیستی بر رشد و نمو گیاه بنفشه سه رنگ: نتایج جدول تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر تیمار نانو ذرات نقره بر پارامترهای مورد مطالعه در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۱).

طول ریشه گیاه بنفشه سه رنگ تحت تاثیر غلظت های مختلف نانو ذرات نقره بودند، به طوری که بیشترین میزان افزایش طول ریشه در غلظت ۵۰ پی پی ام نانو ذرات نقره مشاهده شد (جدول ۲). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که طول ساقه تحت تاثیر تمام

بوده، به طوری که بیشترین افزایش وزن اندام هوایی مربوط به غلظت ۱۰ ppm نانو ذرات نقره بود. وزن تر ریشه گیاه بنفشه سه رنگ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره بودند، به طوری که بیشترین میزان افزایش وزن تر ریشه در غلظت ۱۰ پی پی ام نانو ذرات نقره مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس پارامترهای رشد گیاه بنفشه سه رنگ تحت تاثیر نانو ذرات نقره

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه (سانتی متر)	طول ساقه (سانتی متر)	قطر ریشه (میلی متر)	قطر ساقه (میلی متر)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)
نانو ذرات نقره	۳	۱۸/۹۰**	۳/۲۵**	۱/۹۳**	۲/۴۱**	۱۶/۰۹**	۱/۹۹**
تکرار	۱۲	۰/۰۳۷	۰/۱۹	۰/۷۸	۰/۴۳	۰/۳۳	۰/۱۹
کل	۱۵	-	-	-	-	-	-

ns: عدم اختلاف معنی دار؛ * معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد

مقایسه با شاهد بیشتر بود.

اثر نانو ذرات نقره بر میزان کربوهیدرات گیاه بنفشه سه رنگ: بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها میزان کربوهیدرات تحت تیمار نانو ذرات نقره نسبت به شاهد بیشتر بود. بیشترین اثر نانو ذرات نقره بر میزان کربوهیدرات تحت تاثیر غلظت ۱۰۰ پی پی ام مشاهده گردید (جدول ۲).

اثر نانو ذرات نقره بر میزان پرولین گیاه بنفشه سه رنگ: تجزیه وریانس داده‌ها نشان داد میزان پرولین گیاه بنفشه سه رنگ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره بودند ($P \leq 0/01$) (جدول ۳). همان‌طور که در جدول (۲) نشان داده شده است، میزان پرولین تحت تاثیر نانو ذرات نقره به‌طور معنی داری در غلظت ۱۰۰ پی پی ام نانو ذرات نقره در

جدول ۲: اثر نانو ذرات نقره بر برخی از پارامترهای فیزیوشیمیایی گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor* L.).

مقایسه میانگین نانو ذرات نقره (میلی گرم در لیتر)				ویژگی‌ها
۱۰۰	۵۰	۱۰	۰	Traits
۷/۴۱b	۹/۸۷a	۷/۳۲b	۴/۵۵c	طول ریشه (سانتی متر)
۴/۴۶c	۵/۰۷b	۵/۶۷a	۳/۷۱d	طول ساقه (سانتی متر)
۳/۳۶b	۴/۳۵a	۳/۰۷bc	۲/۷۴c	قطر ریشه (میلی متر)
۳/۵۳a	۳/۹۹b	۴/۴۷a	۲/۶۶d	قطر ساقه (میلی متر)
۹/۵۶c	۱۱/۱۳b	۱۳/۶۸a	۹/۳۱c	وزن تر اندام هوایی (گرم)
۴/۷۰b	۴/۹۹ab	۵/۴۷a	۳/۷۹c	وزن تر ریشه (گرم)
۰/۲۶a	۰/۲۲b	۰/۲۱b	۰/۱۶c	کربوهیدرات (گرم / وزن خشک)
۵/۴۷a	۴/۹۹ab	۴/۷۰b	۳/۷۹c	پرولین (میلی گرم / گرم وزن تازه)

وجود حداقل یک حرف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

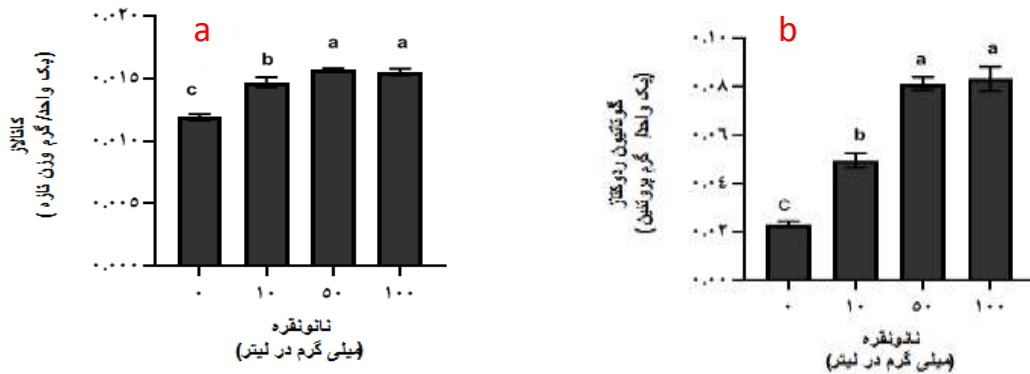
جدول ۳: تجزیه واریانس برخی از صفات شیمیایی بنفشه سه رنگ تحت تاثیر نانو ذرات نقره

منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین (میلی گرم / گرم وزن تازه)	کربوهیدرات (گرم / وزن خشک)	گلوتاتینون ردوکتاز (یک واحد / میلی گرم پروتئین)	کاتالاز (واحد / گرم وزن خشک)	مالون دی آلدئید (میکرومول / گرم وزن خشک)
نانو ذرات نقره	۳	۱۳/۵۵**	۰/۰۰۷**	۰/۰۱۲**	۰/۰۰۱**	۰/۱۴۲**
تکرار	۱۲	۰/۱۸۸	۰/۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۱۳۶
کل	۱۵	-	-	-	-	-

ns: عدم اختلاف معنی دار؛ * معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد

گلوکاتیون ردواکتاز در غلظت ۱۰۰ پی پی ام نانوذرات نقره مشاهده گردید. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (شکل ۳ a, b). تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره از نظر فعالیت آنزیم گلوکاتیون ردواکتاز وجود نداشت (شکل ۳b).

اثر نانوذرات نقره بر میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی: بررسی‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در تمام غلظت‌ها نانوذرات نقره (۱۰۰ ppm و ۵۰ و ۱۰) در مقایسه با شاهد بیشتر بود که این افزایش در سطح ($p \leq 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۳). حداکثر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیم گلیاکول ردواکتاز (a)

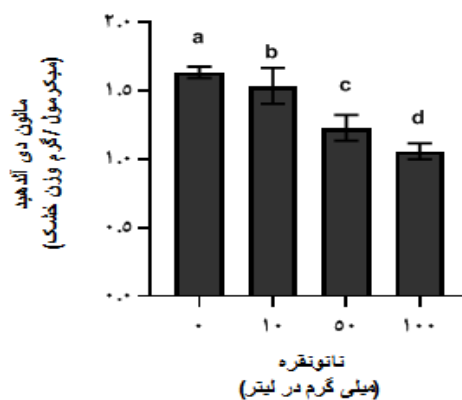
و آنزیم کاتالاز (b) گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor L.*)

مقادیر نشان داده شده میانگین ۴ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای

حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($p \leq 0.05$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

معنی‌داری کمتر بود به طوری که حداکثر و حداقل میزان مالون دی‌آلدئید به ترتیب در شاهد و غلظت ۱۰۰ پی پی ام نانوذرات نقره مشاهده شد (شکل ۴).

اثر نانوذرات نقره بر میزان پراکسید شدن لیپیدها: نتایج تحقیق حاضر میزان مالون دی‌آلدئید تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نسبت به شاهد به‌طور



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان محتوای مالون دی‌آلدئید گیاه بنفشه سه رنگ (*Vtricolor L.*)

مقادیر نشان داده شده میانگین ۴ تکرار و $\pm SE$ (انحراف معیار) می‌باشد.

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($p \leq 0.05$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

غلظت‌ها نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد بیشتر بود که حداکثر این افزایش در شاخص فعالیت آنتی‌اکسیدان و FRAP به ترتیب مربوط به غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره بود (جدول ۵) همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، میزان آنتوسیانین در برگ تحت تاثیر نانوذرات نقره به‌طور معنی‌داری در تمام غلظت‌های نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد بیشتر بود.

اثر نانوذرات نقره بر میزان صفات فیتوشیمایی برگ گیاه بنفشه سه رنگ (*Viola tricolor L.*): نانوذرات نقره منجر به افزایش میزان فنل و فلاونوئید در تمام غلظت‌ها نانوذرات نقره (۱۰۰ و ۵۰ و ۱۰ پی پی ام) نسبت به گروه شاهد شده که از نظر آماری این افزایش در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). بیشترین میزان فنل و فلاونوئید بر غلظت ۱۰۰ پی پی ام نانوذرات نقره مشاهده گردید (جدول ۵). میزان فعالیت سنجش DPPH و FRAP در تمام

جدول ۴: تجزیه واریانس میزان صفات فیتوشیمایی برگ گیاه بنفشه سه رنگ تحت تاثیر نانوذرات نقره

منابع تغییرات	درجه آزادی	فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	FRAP (میکرومول آهن بر هر گرم عصاره)	سنجش DPPH (%)	آنتوسیانین (میکرومول در گرم وزن تر)
نانو ذرات نقره	۳	۲۵۶/۱۶۲**	۳۵۴۱/۴۱۷**	۲۳۲/۲۴۸**	۲۴۸/۵۹۶**	۰/۰۰۷**
تکرار	۱۲	۴/۷۴۲	۲۶۷/۶۲۵	۲/۸۸۰	۲/۶۰۴	۰/۰۰۰
کل	۱۵	-	-	-	-	-

ns عدم اختلاف معنی‌دار؛ * معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۵: مقایسه میانگین اثرات نانوذرات نقره بر صفات آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه بنفشه سه رنگ.

ویژگی‌ها Traits	۰	۱۰	۵۰	۱۰۰
فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	۲۰/۶۲±۰/۴۳c	۳۳/۳۰±۰/۶۴b	۳۴/۰۲±۱/۲۱b	۳۹/۵۵±۱/۶۴a
فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)	۱۵۲/۵۰±۹/۸c	۱۸۵/۲۵±۴/۵۱b	۲۱۳/۵۰±۴/۵۵a	۲۱۶/۲۵±۱۱/۴۴a
سنجش DPPH (%)	۲۲/۷۵±۰/۸۵d	۲۵/۷۵±۰/۸۵c	۴۰/۲۵±۰/۸۵a	۳۳/۵۰±۰/۶۴b
FRAP (میکرومول آهن بر هر گرم عصاره)	۲۱/۲۵±۰/۵۸c	۲۴/۱۰±۱/۱۱b	۳۴/۹۲±۰/۸۴b	۳۶/۴۲±۰/۷۶a
آنتوسیانین (میکرومول در گرم وزن تر)	۰/۱۰±۰/۰۰۲d	۰/۲±۰/۰۱a	۰/۱۶±۰/۰۲b	۰/۱۲±۰/۰۱c

وجود حداقل یک حرف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

بحث

و ریشه داشت. علت افزایش پارامترهای رشد در مطالعه حاضر را می‌توان به افزایش قدرت جذب آب گیاه در حضور نانو ذرات نقره (Lee et al., 2010) و بلوکه کردن مسیر سیگنالینگ اتیلن توسط نانوذرات نقره (Rezvani et al., 2012) نسبت داد. همچنین نانو ذره نقره در گیاهان از طریق افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز و گلوتامات دهیدروژناز بر متابولیسم نیتروژن

امروزه سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از روش‌های زیستی جایگاه ویژه‌ای در پژوهش‌ها پیدا کرده است. در مطالعه حاضر تاثیر نانوذرات نقره که به روش زیستی سنتز شده، بر رشد گیاه بنفشه سه رنگ بررسی شد. غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به ترتیب بیشترین تاثیر را بر طول ساقه

(Mehrian and Karimi, 2017) و افزایش فعالیت

اثر گذاشته و باعث افزایش رشد و میزان فتوسنتز می‌شود (Rezvani, Salachna et al., 2019). همکاران (۲۰۱۲) اظهار داشتند که نانوذرات نقره بدلیل بلوکه کردن مسیر سیگنالینگ اتیلن رشد گیاه زعفران را افزایش داده است. Lee و همکاران (۲۰۱۰) درنتایج خود نشان دادند، گیاهان آرابیدوپسیس تالیانا تیمار شده با نانواکسید آلومینیوم، طول ریشه بیشتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند، این محققین دلیل این افزایش، را به افزایش قدرت جذب آب در حضور نانو ذرات نسبت دادند.

میزان متابولیت‌های ثانویه (فنل فلاونوئید و آنتوسیانین) و همچنین فعالیت آنتی‌کسیدانی (سنجش DPPH و FRAP) در گیاهان بنفشه سه رنگ تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد بیشتر بود (جدول ۲). در شرایط تنش به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد، سیستم دفاعی گیاهان محتوای پلی‌فنولیک (فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین) را به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی آزاد می‌کنند (Karuppusamy, 2009). از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گیاه می‌توان فنل فلاونوئید و آنتوسیانین را نام برد که در شرایط تنش از گیاه در برابر رایکال‌های آزاد مراقبت می‌کنند. ترکیبات فنلی از طریق گروه‌های هیدروکسیلی موجود در مولکول‌شان و علاوه بر آن به عنوان عامل‌های فلز زدا باعث کاهش ROS (گونه‌های اکسیژن فعال) و رادیکال‌های لیپیدی می‌شوند (Isah, 2019) و از این طریق از اکسید شدن لیپدها ممانعت می‌نمایند و سبب کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید در گیاه می‌شود. آنتوسیانین‌ها نیز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند که از سلول‌ها در برابر ROS (گونه‌های اکسیژن فعال) محافظت می‌کند. نانوذرات نقره از طریق بلوکه کردن مسیر سیگنالینگ اتیلن (Rezvani et al., 2012) سبب کاهش و حذف رادیکال‌های آزاد (Isah, 2019) و حفظ ترکیبات فنلی

اسمزی می‌شود. این مواد شامل تجمع قندها، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، پرولین و گلايسین-بتائین است که به‌عنوان حفاظت و پایدار کننده‌های غشاء و ساختارهای آنزیمی و از بین بردگی رادیکال‌های آزاد در محیط تنش عمل می‌کنند (Krishnaraj et al., 2012).

در پژوهش حاضر غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانو ذرات نقره سبب افزایش سطح پرولین نسبت به نمونه‌های شاهد شد. پرولین از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدان، و با حذف رادیکال آزاد، باعث حفظ فعالیت ردوکس و مقاومت گیاه به استرس اکسیداتیو می‌شود (Abraham et al., 2003). در تحقیق حاضر نیز نانو ذرات نقره زیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های ذکر شده سبب افزایش میزان کربوهیدرات و پرولین در گیاهان بنفشه سه رنگ می‌شود. از این رو می‌توان گفت، پرولین در گیاه به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند و با افزایش غلظت نانو ذرات نقره افزایش می‌یابد (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). مالون دی‌آلدئید تحت شرایط تنش و از اکسایش چربی‌ها بدست می‌آید، رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث تحریک کردن واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لپید می‌شود و از این طریق منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند (Abraham et al., 2003). علت کاهش مالون دی‌آلدئید در مطالعه حاضر را می‌توان به نقش نانو ذرات نقره در حذف رادیکال‌های آزاد، جلوگیری از نشت یونی، کاهش اکسید شدن لیپدها و حفظ تمامیت غشاء نسبت داد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Sharma و همکاران (۲۰۱۲) و Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۲) هم‌خوانی داشت. این محققین در پژوهش خود نشان دادند که نانو ذره نقره مشخصات رشدی گیاه (طول ساقه و ریشه و سطح برگ) و ویژگی‌های بیوشیمیایی و

آنتی‌اکسیدانی گیاه (Isah, 2019) می‌شود. بنابراین در مطالعه حاضر علت بیشتر بودن متابولیت‌های ثانویه (فنل فلاونوئید و آنتوسیانین) و همچنین فعالیت آنتی‌کسیدانی (سنجش DPPH و FRAP) در گیاهان بنفشه سه رنگ تیمار شده با نانو ذرات نقره در مقایسه با شاهد را می‌توان به عمل نانو ذرات نقره در بلوک کردن مسیر اتیلن، حذف رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه و افزایش تولید ترکیبات فنلی، فلاونوئید و آنتوسیانین نسبت داد. نتایج این تحقیق با نتایج Begum و همکاران (۲۰۲۰) روی کشت کالوس گیاه *Fagonia indica* و Chung و همکاران (۲۰۱۸) روی کشت ریشه موئین *Cucumis anguria* مطابقت دارد. در شرایط تنش به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد، سیستم دفاعی گیاهان محتوای پلی‌فنولیک (فنل و فلاونوئید) را به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی آزاد می‌کنند (Karuppusamy, Mehrian, Karimi, 2009). اثر نانو ذرات را بر گیاه ذرت مطالعه کردند و گزارش کردند که نانو ذرات اثر افزایشی بر محتوای فنل داشته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد مقدار کربوهیدرات در تمام غلظت نانو ذرات نقره استفاده شده در مقایسه با شاهد بیشتر بود. در شرایط تنش گیاهان جهت سازگاری با تنش، فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی نظیر تنظیمات اسمزی توسط تجمع مواد محلول سازگار مانند پرولین و پلی‌ساکاریدهای محلول، افزایش سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها جهت جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن و تغییرات در مکانیسم تنظیمی برای انتقال یون انجام می‌دهند (Rajaei et al., 2009). استفاده از نانو ذرات نقره سبب فعال شدن مکانیسم‌های سازگاری گیاهان از قبیل تنظیم اسمزی یا افزایش مواد قابل انحلال برای کاهش پتانسیل

مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیاء شده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSH به GSSG است. گلوتاتیون نقش مؤثری در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و حفظ GSH ایفاء می‌کند. GSH همانند یک آنتی‌اکسیدان (غیرآنزیمی) اکسیژن منفرد را به‌طور مستقیم جاروب می‌کند (Khanna-Chopra and Selote, Sairam et al., 2003). علت افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول ردوکتاز ر مطالعه حاضر را می‌توان به نقش حفاظتی نانو نقره به‌عنوان بازدارنده تولید اتیلن و جاروب کنندگی رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Kumar و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت. این محققین گزارش کردند که نانوذرات نقره باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و کاهش ROS شده است.

نتیجه‌گیری نهایی

در مطالعه حاضر، شاخص‌های رشد و پاسخ‌های مختلف بیوشیمیایی گیاه بنفشه سه رنگ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بررسی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سنتز نانوذرات نقره به روش زیستی باعث افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گردید. در غلظت ۱۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره به ترتیب بیشترین میزان شاخص رشد از جمله طول ساقه و ریشه مشاهده گردید. همچنین بیشترین میزان افزایش قطر ساقه و ریشه به ترتیب مربوط به غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره بود. افزایش مقدار پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مطالعه حاضر، نشان‌دهنده فعال شدن سیستم دفاعی گیاه برای کاهش پراکسیداسیون لیپید تحت تاثیر نانوذرات نقره بود. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان پیشنهاد

محتویات کلروفیل، کربوهیدرات و پروتئین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در کلزا و ریشه گیاه *Bacopa monnieri* افزایش داده است. Lu و همکاران (۲۰۰۲) به این نتیجه رسیدند که تیمار گیاهان با نانو نقره از نشت الکترون جلوگیری و تولید ROS و سطح مالون دی‌آلدئید را کاهش می‌دهد.

در مطالعه حاضر اثر آنتی‌اکسیدانی نانوذره سنتز شده به روش سبز از گیاه بنفشه سه رنگ با استفاده از سنجش میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و FARP بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان مهار رادیکال‌های آزاد با افزایش غلظت نانوذرات نقره افزایش می‌یابد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت احیاء کنندگی مربوط به بخش قطبی عصاره است. با توجه به اینکه بخش قطبی گیاه حاوی ترکیبات فنولی است، میتوان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه را به این ساختارها نسبت داد (Naznin et al., 2009). نتایج پژوهش حاضر با نتایج Shin و همکاران (۲۰۱۶) و Jacob و همکاران (۲۰۱۲) هم‌خوانی داشت. این محققین در نتایج خود بیان کردند که میزان مهار رادیکال‌های وابسته به غلظت نانوذرات می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تمام غلظت‌ها نانو ذرات نقره (۱۰۰ و ۵۰ و ۱۰ پی‌پی‌ام) در مقایسه با شاهد بیشتر بود که این افزایش در سطح ($p \leq 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۳). حداکثر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول ردوکتاز در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نقره مشاهده گردید. کاتالاز، یکی از انواع پراکسیدازهاست که نقش مهمی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد خصوصاً تولید پراکسید هیدروژن در طول تنفس نوری و شرایط تنش دارد (Kumar et al., 2019). گلوتاتیون ردوکتاز نیز نقش مهمی در سازگاری با تنش اکسیداتیو بازی می‌کند. این آنزیم

استفاده کرد.

کرد، از نانوذرات نقره به عنوان محرکی مناسب جهت افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان

References

- Abraham, E., Rigo, G., Sze'kely, G., Nagy, R., Koncz, C. and Szabados, L. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*. 51: 363-372.
- Agarwal, H., Kumar, S.V. and Rajeshkumar, S. (2018). Antidiabetic effect of silver nanoparticles synthesized using lemongrass (*Cymbopogon Citratus*) through conventional heating and microwave irradiation approach. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 9(6): 371-376.
- Aghajani, Z., pourmeidan, A. and Ekhtiyari, R. (2013). Effect of nano-silver on stages of plant growth and yield and composition of essential oil of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. *African Journal of Agricultural Research*. 8: 707-710
- Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Plant Physiology*. 82: 1227-1237.
- Beers, G.R. and Sizer, I.V. (1952). Aspectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Biological Chemistry*. 195:133-140.
- Bates, L.S., Waldron, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-208.
- Begum, S., Zahid, A., Khan, T., Zaman Khan, N. and Waqar, A. (2020). Comparative analysis of the effects of chemically and biologically synthesized silver nanoparticles on biomass accumulation and secondary metabolism in callus cultures of *Fagonia indica*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 26:1379-1750.
- Bhakya, S., Muthukrishnan, S., Sukumaran, M. and Muthukumar, M. (2016). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. *Applied Nanoscience*. 6: 755-766.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. and Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*, 7: 1099-1111.
- Chand, K., Abro, M.I., Aftab, U., Shah, A.H., Lakhan, M.N., Cao, D. and Mehdi, G. (2019). Green synthesis characterization and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* of silver nanoparticles using extracts of neem, onion and tomato. *Royal Society of Chemistry Advances*. 9: 17002-17015.
- Chang, C-C., Yang, M-H., and Wen, H-M. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*. 10: 178-182.
- Chung, I-M., Rajakumar, G., and Thiruvengadam, M. (2018). Effect of silver nanoparticles on phenolic compounds production and biological activities in hairy root cultures of *Cucumis anguria*. *Acta Biologica Hungarica*. 69:97-109
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S.M., Nabavi S.F., Bahramian, F. and Bekhradnia, A.R. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak J Pharm Sci*. 23(1): 29-34.
- Forough, M., and Farhadi, K. (2011). Biological and green synthesis of silver nanoparticles. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*. 34(4): 281-287.
- Ghorbani, A., Razavi, S.M., Omran, V.O.G., and Pirdashti, H. (2018). *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and

- antioxidative potential of tomato. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(6): 898-907.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968).** Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1): 189-198
- Iris, F., Benzi, F. and Strain, S. (1999).** Ferric reducing antioxidant Assay. *Methods in Enzymology*. 292: 15-27.
- Isah, T. (2019).** Stress and defense responses in plant secondary metabolites production *Biological Research*. 52: 39.
- Jacob, S.J.P., Finub, J. and Narayanan, A. (2012).** Synthesis of silver nanoparticles using piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line.
- Jurca, T., Pallag, A., Marian, E. and Eugenia, M. (2019).** The histo-anatomical investigation and the polyphenolic profile of antioxidant complex active ingredients from three viola species. *FARMACIA*, 67(4): 634-640.
- Kamal Kumar, V., Muthukrishnan, S. and Rajalakshmi, R. (2020).** Phytostimulatory effect of phytochemical fabricated nanosilver (AgNPs) on *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. seed germination: An insight from antioxidative enzyme activities and genetic similarity studies. *Current Plant Biology*, 23:100158.
- Karimi, J. and Mohsenzadeh, S. (2017).** Physiological Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Toxicity in *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 41: 111-120.
- Karuppusamy, S. (2009).** A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3:1222-1239.
- Khanna-Chopra, R. and Selote, DS. (2007).** Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 60: 276-283
- Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012).** Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *American Chemical Society Nano*. 6:2128-2135.
- Krishnaraj, C., Jagan, E.G., Ramachandran, R., Abirami, S.M., Mohan, N. and Kalaichelvan, P.T. (2012).** Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. *Plant growth metabolism. Process Biochemistry*. 47: 651-658.
- Kruszka, D., Sawikowska, A. and Selvakesavan, R. (2020).** Silver nanoparticles affect phenolic and phytoalexin composition of *Arabidopsis thaliana* *Science of the Total Environment*. 70(16):135-361.
- Kumar, V., Muthukrishnan, S. and Rajalakshmi, R. (2020).** Phytostimulatory effect of phytochemical fabricated nanosilver (AgNPs) on *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Seed germination: An insight from antioxidative enzyme activities and genetic similarity studies. *Current Plant Biology*. 23: 100-158.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K. and Li, D. (2010).** Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(3): 669-675.
- Lu, C.M., Zhang, C.Y., Wen, J.Q. and Wu, G.R. (2002).** Research on the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Science*. 21: 68-171.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M. and Robards, K. (2001).** Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*. 73: 73-84.
- Mehrian, S.K. and Karimi, N. (2017).** Biological testing of the chemically synthesized silver nano-particles for nitrate, chloride, potassium and sodium contents, and some physiological and biochemical characteristics of tomato plants. *Indian Journal of Plant Physiology*. 22: 48-55.

- Nair, P.M.G. and Chung, I.M. (2014).** Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 11(2):105-113.
- Naznin, A. and Hasan, N. (2009).** In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Leaves and Flowers Extracts of *Lippia Alba*. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 4(1): 107-110.
- Rajaei, S.M., Niknam, V., Seyedi, S.M., Ebrahimzadeh, H. and Razavi, K. (2009).** Contractile roots are the most sensitive organ in *Crocus sativus* to salt stress. *Biology Plantarum*. 53(3): 523-529.
- Rani, P.U., Yasur, J., Loke, K.S. and Dutta, D. (2016).** Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (mart) solms. *Acta physiologiae plantarum*. 38: 58.
- Rapisarda, P., Fanella, F. and Maccarone, E. (2000).** Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(6):2249-2252.
- Rezvani, N., Sorooshzadeh, A. and Farhadi, N. (2012).** Effect of Nano-Silver on Growth of Saffron in Flooding Stress. *World Academy of Science Engineering and Technology*. 6(1): 517-522.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. (2003).** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163:1037-1046.
- Salachna, P., Byczynska, A., Zangineszka, A., Piechocki, R. and Mizielinska, M. (2019).** Stimulatory effect of silver on the growth and flowering of potted oriental lilies. *Agronomy*. 9:610.
- Sharma, K., Sharma, R., Shit, S. and Gupta, S. (2012).** Nanotechnological application on diagnosis of a plant disease. In: *International Conference on Advances in Biological and Medical Sciences*. Pp 149-150.
- Shin SW, Song, I.H. and Um, SH. (2015).** Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*. 5:1351-65.
- Shavalibor, A., and Ismailzadeh, B. (2019).** The effect of silver nanoparticles synthesized by biological method on growth, physiological and biochemical properties of *Melissa officinalis* L. 8(32):19-34.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Firoz, M., Y. and Al-Khaishany, M. (2015).** Role of nanoparticles in plants. In: *Nanotechnology and Plant Sciences*. pp. 19-35.
- Yasar, F., Ellialtioglu, S. and Yildiz, K. (2008).** Effect of Salt Stress on Antioxidant Defense Systems, Lipid Peroxidation, and Chlorophyll Content in Green Bean. *Russian Journal of Plant Physiology*. 55(6): 782-786.
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B.P., Auffan, M. and Wiesner, M. (2011).** More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science Technology*. 45: 2360-2367.
- Vukics, V., Kery, A., Bonn, G. and Guttman, A. (2008).** Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 309: 1917-1925.

The effect of biosynthesized silver nanoparticles on some physiological and biochemical parameters of viola tricolor (*Viola tricolor* L.)

Hassanvand, A.¹, Saadatmand, S.^{1*}, Lari Yazdi, H.² and Iranbakhsh, A.R.¹

¹Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

²Department of Biology, Islamic Azad University, Borujerd Branch, Borujerd, Iran

Received date: 2020/08/25 Accepted date: 2020/10/14

Abstract

Employing biosynthesized nanoparticles plays an important role in increasing efficiency of agricultural practices. In recent years, the use of nanoparticles in plants has been considered as pesticides, protective agents, and nutrients. *Viola tricolor* belongs to the Violaceae family, which has antibacterial, anticancer, and antiviral properties. In this study, silver nanoparticles were synthesized using silver nitrate and *Viola tricolor* extract to investigate the effect of different concentrations of silver nanoparticles on the physiologic and biochemical indexes of *Viola tricolor*. Results showed that different growth parameters including root and stem fresh weight, root and shoot length, and protein content significantly increased under AgNPs. The highest levels of these indices were observed at 0, 10, 50 and 100 ppm silver nanoparticles, respectively. Proline and carbohydrates also increased under different concentrations of AgNPs compared with the control and the highest values of these indices were observed under 100 ppm silver nanoparticles. The contents of secondary metabolites, including phenol and flavonoids, were affected under 100 ppm AgNP showing the highest increase. The maximum increase in the anthocyanin content was observed at 10 ppm AgNPs. Analysis of the antioxidant enzyme activities showed that they increased under all AgNPs concentrations of the study. Increases in the activities of antioxidant enzymes (catalase and glutathione reductase) under AgNPs treatments led to a decrease in MDA content. Based on the results of the current study, silver nanoparticles are suggested as proper stimulants for increased growth and production of antioxidant properties.

Keywords: Anthocyanin, Catalase, Glutathione reductase, Malondialdehyde, Root growth.

*Corresponding author; s_saadatmand@yahoo.com