

بررسی برخی شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) تحت تنش شوری در حضور نانو ذره نقره

محمد سربرهنه و رشید جامعی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۰۹)

چکیده

تنش شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی در مناطق زیادی از ایران به ویژه مزارع کاشت انواع گیاهان دارویی است که موجب بروز مشکلات متعددی شده است. گیاه ریحان از جمله گیاهان دارویی مهم است که به دلیل داشتن ترکیبات فنلی مختلف در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. امنیت غذایی کشاورزی جهان به‌طور جدی تحت تأثیر تغییرات آب و هوایی و رشد سریع جمعیت قرار گرفته است. برای مقابله با این تهدیدها لازم است محققین از فناوری‌های جدید استفاده نمایند. در همین راستا، تاکنون چندین نانو ذره از قبیل نانوذرات نقره برای جوانه‌زنی بذور، رشد گیاه و تحمل به تنش‌های زیستی در تعدادی از گیاهان زراعی استفاده شده است. بر همین اساس مطالعه حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار روی گیاهچه‌های ریحان انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل شوری در سطوح صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار به صورت کاربرد پای بوته و نانونقره در دو سطح صفر و ۷۵ ppm به صورت محلول‌پاشی استفاده شد. برخی شاخص‌های بیوشیمیایی از قبیل محتوای فنل کل، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (AXP)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (POX) و آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در ریشه و اندام هوایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که کاربرد همزمان شوری و نانونقره منجر به افزایش قابل ملاحظه محتوای فنل کل در اندام‌های هوایی و ریشه (به ترتیب افزایش ۴۶/۸۹ و ۴۵/۴۸ درصدی)، افزایش فعالیت PAL در اندام‌های هوایی و ریشه (به ترتیب افزایش ۳۲/۵۱ و ۴۱/۵۶ درصدی) و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD در اندام هوایی و ریشه (به ترتیب افزایش ۵۸/۹۷ و ۴۳/۱۱ درصدی)، CAT (۶۳/۷۶ و ۷۳/۳۱ درصدی) و APX (۷۴/۱۸ و ۳۱/۷۹ درصدی) شد. همچنین نتایج بیانگر کاهش محتوای پراکسید هیدروژن در اندام‌های هوایی و ریشه در مقایسه با شاهد بود. به‌طور کلی، به نظر می‌رسد نانونقره از طریق کاهش محتوای پراکسید هیدروژن، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای فنل توانسته تحمل گیاه ریحان را به تنش شوری افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ریحان، نانوذرات نقره، تنش شوری

مقدمه

دارویی از خانواده Lamiaceae با خواص دارویی و غذایی مهم

که منبع اسانس و ترکیبات فنلی مهم است (Qasem et al.,

گیاه ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* یک گیاه

رادیکال‌های آزاد (Reactive oxygen species; ROS) در گیاهان می‌شود که منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود (Wu et al., 2018). به عنوان مثال در شرایط تنش، محتوای آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در کلروپلاست و میتوکندری به طور فزاینده‌ای انباشته شده و باعث کاهش فتوسنتز و افزایش تنفس گیاهان می‌شود (Balal et al., 2011). علاوه بر این، ساختار ماکرومولکول‌هایی مانند DNA و پروتئین می‌تواند توسط ROSها بیش از حد آسیب ببیند (Hu et al., 2021; Liu et al., 2021).

تولید ROS در پاسخ به هر نوع تنش (تنش زنده و غیرزنده) در گیاه، پاسخ اولیه به شرایط تنش است (Mushtaq et al., 2020). مولکول‌های ROS که تحت شرایط تنش تولید می‌شوند، عبارتند از: رادیکال‌های هیدروکسیل ($\text{OH}\cdot$)، اکسیژن منفرد (O_2^{\cdot})، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال آلکوکسیل (RO) و رادیکال سوپراکسید (O_2^{\cdot}) (Azizi et al., 2021). مولکول‌های ROS منجر به فعال شدن تنش اکسیداتیو ثانویه در گیاه می‌شوند که منجر به آسیب به سیستم‌های غشایی می‌شود (Ershad Langroudi et al., 2020). ROS در کلروپلاست، پراکسی‌زوم، آپوپلاست و میتوکندری تولید می‌شوند که باعث کاهش سنتز پروتئین، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و اختلال در متابولیسم سلولی می‌شوند (Liu et al., 2021). برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو، مولکول‌های آنتی‌اکسیدان سنتز می‌شوند تا مولکول‌های ROS را از بین ببرند و مانع از اثر آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو شوند. گیاه با کمک سیستم فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی با شرایط تنش مواجه می‌شود (Sarker and Oba, 2021). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل بتالین، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، اسیدهای آسکوربیک، ترکیبات مختلف فنلی و فلاونوئیدی مانند فنل‌های ساده، اسیدهای هیدروکسی بنزوئیک مختلف و هیدروکسی سینامیک اسیدها، فلاونول‌ها، فلاونول‌ها، فلاونون‌ها و غیره دارای ظرفیت بالایی به منظور جاروب کردن رادیکال‌های آزاد هستند (Ramegowda et al., 2020). در گیاهان در شرایط مواجه شدن با تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش خشکی و

اسیدهای فنولیک و فلاونول‌گلیکوزیدها اجزای اصلی فنلی ریحان هستند (Radzikowska-Kujawska et al., 2023). ریحان گونه گیاهی یک ساله که به راحتی از بذر قابل کشت است. اگر چه ریحان شیرین را می‌توان به راحتی در آب‌وهوای گرم کشت کرد اما تولید مزرعه‌ای آن توسط عوامل محیطی و شیوه‌های مدیریتی محدود شده است. همانند سایر گیاهان معطر، ویژگی‌های بیوشیمیایی و اسانس ریحان تحت تأثیر عوامل مختلف نظیر تنش‌های محیطی (شوری و خشکی) قرار می‌گیرد (Lazarevic et al., 2021).

شوری یکی از اصلی‌ترین تنش‌های محدودکننده تولیدات کشاورزی است و شورشیدن خاک‌های جهان از لحاظ تأثیر بر تغذیه بیش از ۹/۳ میلیارد جمعیت در سال ۲۰۵۰ یک چالش بزرگ خواهد بود. تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۵۰، تولید کشاورزی باید بیش از ۶۰ درصد در مقایسه با سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰۷ افزایش یابد (Fita et al., 2015). تولیدات محصولات کشاورزی پایدار همیشه با شرایط تنش مانند شوری تهدید می‌شوند. در سال‌های اخیر، تغییرات اقلیمی، جریان برگشتی آب دریا، نفوذ آب‌های زیرزمینی و فعالیت‌های انسانی مانند آبیاری و کاربرد کود، غلظت نمک در خاک را افزایش داده و در نتیجه منجر به افزایش شوری خاک شده است (Qian et al., 2021). شوری خاک منجر به مهار رشد، عملکرد و کیفیت محصول می‌شود (Yang and Guo, 2018a). این در حالی است که بیش از ۹۵۰ میلیون هکتار زمین تحت تأثیر تنش شوری قرار دارند و روند شوری خاک رو به افزایش است (Yang and Guo, 2018b). با شروع تنش شوری، شوری زیاد پتانسیل آب را در اطراف ریشه گیاه کاهش می‌دهد و جذب آب ریشه را محدود می‌کند (Negrao et al., 2017). ثانیاً تجمع بیش از حد سدیم و کلرید در گیاه باعث سمیت یونی می‌شود. این نه تنها هموستازی یونی مانند هموستاز Na^+ و K^+ را مختل می‌کند (Zhu, 2002)، بلکه مانع جذب کارآمد عناصر غذایی مانند Ca^{2+} و کمبود مواد مغذی ضروری در گیاهان می‌شود (Zhang et al., 2018; Wu, 2018; Li et al., 2021). تنش‌های اسمزی و یونی منجر به تجمع بیش از حد

کلوئیدی، چسبندگی بیشتری روی سطح سلول‌های قارچی و باکتریایی دارند و به‌خوبی پراکنده و تثبیت می‌شوند (Razak et al., 2023).

اهمیت تولید گیاهان دارویی در مواجهه با تنش شوری از یک طرف و اهمیت نانوذرات نقره از طرفی دیگر منجر شد تا در تحقیق حاضر نقش تعدیل‌کننده نانوذرات نقره در کاهش اثرات سوء تنش شوری بر ریحان و تأثیر این دو تیمار روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ریحان بررسی شد.

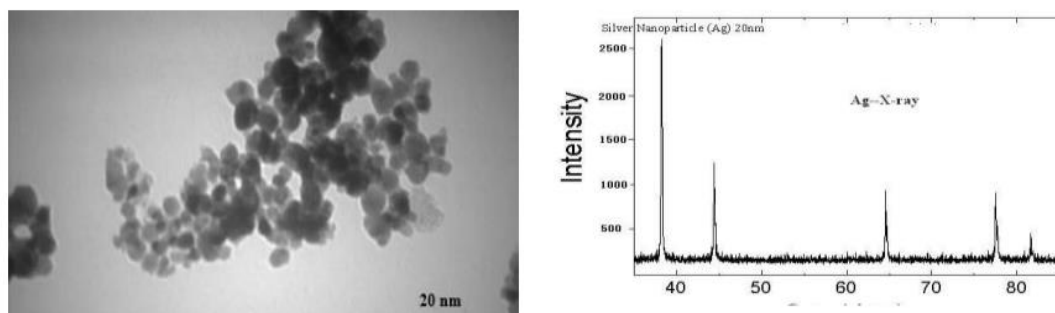
مواد و روش‌ها

تهیه بذور گیاه ریحان و تیمارها: بذورهای مربوط به گیاه ریحان از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی تهیه شد. بذورهای گیاه ریحان با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت پنج دقیقه استریل و سپس چهار بار با آب استریل‌شده کاملاً شسته و در گلدان‌های پلاستیکی به قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر کشت شدند. در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر کشت شد که پس از جوانه‌زنی تعداد بوته در هر گلدان کاهش یافت. آبیاری گیاه تا رسیدن به مرحله چهار برگی با آب مقطر و محلول هوگلند انجام گرفت. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله چهار برگ حقیقی، تیمارهای مورد مطالعه اعمال شد. در مطالعه حاضر، اثر تنش شوری و نانوذره نقره بررسی شد؛ لذا شش تیمار شامل (۱) شاهد، (۲) شوری در سطح ۷۵ میلی‌مولار، (۳) شوری در سطح ۱۵۰ میلی‌مولار، (۴) نانوذره نقره با غلظت ۷۵ ppm، (۵) شوری ۷۵ میلی‌مولار + نانوذره نقره با غلظت ۷۵ ppm و (۶) شوری ۱۵۰ میلی‌مولار + نانوذره نقره با غلظت ۷۵ ppm در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت.

تهیه محلول نانوذرات نقره: پودر نانوذرات نقره از شرکت نانوسانی مشهد تهیه شد. اندازه نانوذرات خریداری‌شده ۲۰ نانومتر با خلوص ۹۹/۹۹ درصد، گالی $10/5 \text{ g/cm}^3$ و دارای رنگ تیره و مورفولوژی کروی بودند. در مطالعه حاضر نانوذرات در غلظت ۷۵ ppm تهیه شد (Nejatzadeh, 2021). به منظور پایداری محلول تهیه‌شده از دستگاه اولتراسونیک

شوری، سازوکارهایی برای افزایش تجمع این آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی با هدف سمیت‌زدایی ROS تکامل یافته است (Hussain Wani et al., 2013). افزایش فعالیت آنزیم‌هایی از قبیل SOD، CAT، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و POX در پاسخ به تنش شوری نشان داده شده است (Choudhary et al., 2020). غلام‌نیا و همکاران (۱۴۰۰) در مطالعه‌ای به تأثیر آثار تنش شوری در سطوح صفر، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی نعناع فلفلی در فواصل زمانی متفاوت پرداخته‌اند. نتایج به دست آمده نشان داده است که اعمال تنش شوری منجر به افزایش سطح نسبی ترکیبات فنلی شد.

یکی از گزینه‌های بالقوه در میان نانوذرات برای افزایش عملکرد محصول از طریق افزایش جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه، نانوذرات نقره است که بسته به غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، تأثیرات مثبت و منفی بر رشد گیاه دارند. نتایج مطالعات متعدد نشان داده است که کاربرد نانوذرات نقره منجر به افزایش شاخص جوانه‌زنی بذر، پتانسیل جوانه‌زنی بذر، میانگین زمان جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، وزن خشک گیاهچه و وزن تر می‌شود (Kale et al., 2021). در مطالعات مختلف تأثیر بهبوددهندگی و همچنین تأثیر سمیت نانوذرات نقره بر گیاهان گزارش شده است. در کشاورزی به منظور کنترل بیماری‌های گیاهی در محصولات غذایی و میوه‌ها مورد نیاز است زیرا از نظر اقتصادی کنترل عوامل بیماری‌زا بسیار اهمیت دارد. نانوذرات نقره به عنوان یک قارچ‌کش و باکتری‌کش مؤثرتر عمل می‌کنند. نانوذرات را می‌توان برای محافظت از گیاهان به دو صورت استفاده کرد: (الف) به عنوان نانوذرات حفاظت از محصول، یا (ب) به عنوان حامل برای آفت‌کش‌های موجود یا سایر مواد فعال مانند RNA دو رشته‌ای (dsRNA)، و می‌توان از طریق محلول‌پاشی، غوطه‌وری، خیساندن برگ، دانه یا ریشه استفاده کرد، نانوذرات می‌توانند چندین مزیت از جمله (۱) افزایش ماندگاری، (۲) افزایش حلالیت آفت‌کش‌های ضعیف محلول در آب، (۳) کاهش سمیت و (۴) افزایش جذب مکان خاص به آفت مورد هدف داشته باشند. نانوذرات نقره



شکل ۱- تصویر XRD (سمت راست)، و SEM (سمت چپ) نانوذرات نقره

پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی مولار با $\text{pH}=7$ و ۲ میلی لیتر پتاسیم یدید ۱ مولار اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم APX: برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عصاره آنزیمی تهیه شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم از بافت تر گیاه در ۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار ($\text{pH}=7/5$) که حاوی ۱ درصد PVP و ۱ درصد EDTA ۱ میلی مولار بود در هاون چینی به خوبی ساییده شد. تمام مراحل استخراج روی یخ انجام شد. سپس عصاره‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ g در دستگاه سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محلول رویی به دست آمده برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (Nasibi et al., 2016). محلول واکنش به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=7$ ، (EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات سدیم ۱ میلی مولار)، ۰/۲ میلی لیتر (۲۰۰ میکرولیتر) H_2O_2 ۱ درصد و ۰/۱ میلی لیتر (۱۵۰ میکرولیتر) عصاره بود (Nakano and Asada, 1981). در نهایت فعالیت APX به صورت کاهش در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه گردید.

(Ultrasonication) (Elma, Germany) استفاده شد. نانوذرات هر بار قبل از استفاده توسط دستگاه اولتراسونیک فرایاشی (Dispersion) شدند. شکل ۱ نانوذرات تهیه‌شده برای مطالعه حاضر را نشان می‌دهد.

تعیین میزان فنل کل: برای استخراج عصاره‌ها به منظور اندازه‌گیری فنل کل، ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه پودر شده با ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد سائیده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس به ۱ میلی لیتر از عصاره استخراجی، ۹ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو اضافه شده و به هم زده شد. بعد از پنج دقیقه، ۱۰ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط حاصل اضافه و در دمای آزمایشگاه به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان، میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (مدل Agilent ساخت کشور آمریکا) در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. به منظور تعیین میزان فنل، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم گالیک اسید تهیه شد (Marinova et al., 2005).

تعیین محتوای پراکسید هیدروژن: برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید و از روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. برای این منظور ۰/۵ گرم از بافت تر گیاهی در ۰/۱ TCA ۰/۱ درصد ساییده و عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر

میلی‌لیتر بافر بورات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=8/5$ محتوی ۲- مرکاپتواتانول ۵ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدین ۲ درصد در هاون سرد ساییده شد. هموژنات حاصل با استفاده از پارچه نظیف چهار لایه صاف و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در 10000 g سانتریفیوژ شد. عصاره استخراج شده به منظور سنجش فعالیت آنزیم PAL استفاده شد. به ۵ میلی‌لیتر از محلول رویی ۰/۵۵ میلی‌لیتر L- فنیل آلانین ۱۰۰ میلی‌مولار اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از مدت زمان یادشده جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد.

نمونه‌برداری از واحدهای آزمایشی به صورت تصادفی انجام شد. همچنین برای تمام آزمایشات انجام شده سه تکرار اعمال شد و نتایج به صورت مقادیر میانگین و انحراف معیار (SE) ارائه گردید. تجزیه واریانس (ANOVA) برای تمام صفات مورد مطالعه در نرم‌افزار SPSS 26 انجام گرفته و مقایسه میانگین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. در نهایت نمودارهای مربوط به مقایسات میانگین‌ها در برنامه Excel 2016 ترسیم شدند.

نتایج و بحث

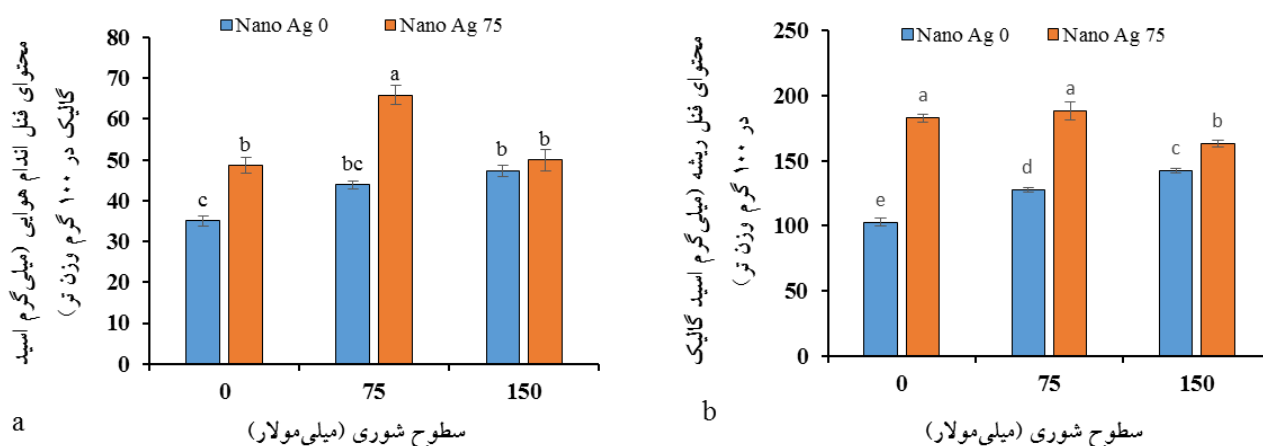
محتوای فنل کل: بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشاهده شد که کاربرد همزمان شوری و نانوقره منجر به افزایش محتوای فنل کل در ساقه شد و این روند در شوری ۷۵ میلی‌مولار همراه با نانوقره ۷۵ ppm بارزتر بود و در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار روند افزایش فنل اندام هوایی در مقایسه با شوری ۷۵ میلی‌مولار کمتر بود. همان‌طور که شکل ۱a نشان می‌دهد بیشترین محتوای فنل (۶۵/۸۹ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن تر) در شوری ۷۵ میلی‌مولار + نانوقره ۷۵ ppm و کمترین محتوای فنل (۳۴/۹۹ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن تر) در شاهد (بدون تیمار شوری و نانوقره) مشاهده شد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشاهده شد که

سنجش فعالیت آنزیم CAT: فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) تعیین شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH}=7/5$ ، ۱۵ میلی‌مولار میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره استخراجی بود. با اضافه کردن عصاره به محیط واکنش، تجزیه H_2O_2 به وسیله آنزیم شروع شد. فعالیت آنزیم CAT به صورت کاهش در جذب طی ۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ضریب خاموشی $43/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم SOD: به منظور سنجش فعالیت آنزیم SOD از روش Fridovich و Beauchamp (۱۹۷۱) استفاده شد. اساس سنجش مهار فتوشیمیایی نیتروبلوترازولیوم (NBT) بود. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر پتاسیم - فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7/8$ محتوی ۷۵ میکرومولار نمک NBT، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۲ میکرومولار ریوفلاوین و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه زیر لامپ مهتابی ۴۰ وات در فاصله ۳۰ سانتی‌متری قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانو خوانده شد. Units یا یک واحد آنزیم SOD مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که موجب مهار ۵۰ درصد ممانعت از احیاء نوری نیتروبلوترازولیوم (جلوگیری از تبدیل به فورمازان) می‌شود.

سنجش فعالیت آنزیم POX: فعالیت آنزیم GPX با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) تعیین شد. مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH}=7$ ، ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۱ درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره فعالیت GPX به صورت افزایش جذب طی یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و ضریب خاموشی $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم PAL: به منظور سنجش فعالیت آنزیم PAL از روش Ke و Saltveit (۱۹۸۶) با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش فعالیت آنزیم PAL بر اساس سرعت تشکیل اسید سینامیک تعیین شد. ۲ گرم از نمونه‌ها به همراه ۸



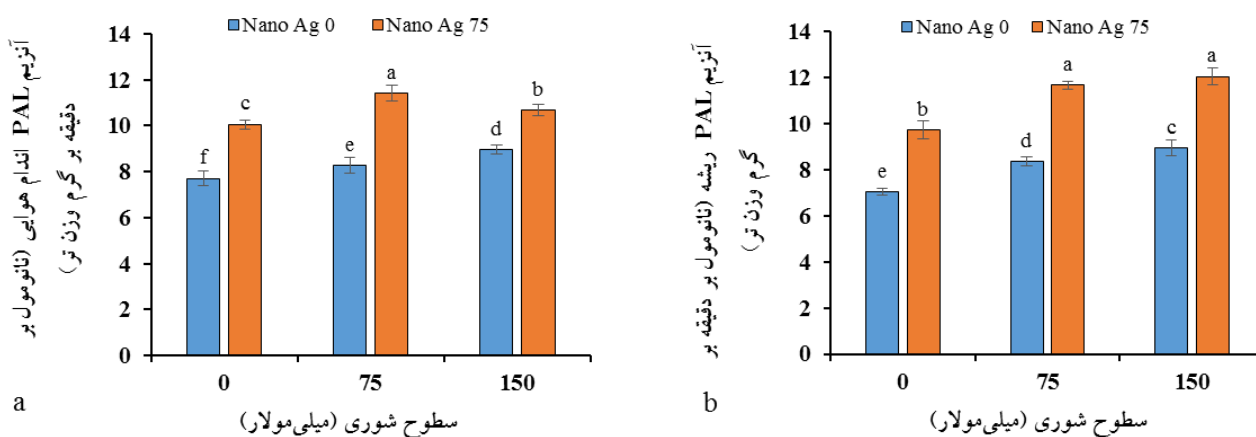
شکل ۱- اثر سطوح مختلف تیمارهای شوری و نانونقره روی محتوای فنل در اندام هوایی (a) و ریشه (b) در گیاه ریحان. حروف غیرمشابه بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد ترکیبی شوری و نانونقره منجر به افزایش فعالیت آنزیم PAL ریشه در گیاه ریحان شد و این روند در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار همراه با نانونقره ۷۵ ppm مشخص‌تر بود. همانطور که شکل ۲b نشان می‌دهد بیشترین فعالیت آنزیم PAL ریشه (۱۲/۰۳ نانومول بر دقیقه در گرم وزن تر) در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار + نانونقره ۷۵ ppm، و کمترین فعالیت آنزیم PAL ریشه (۷/۰۳ نانومول بر دقیقه در گرم وزن تر) در شاهد (بدون تیمار شوری و نانونقره) مشاهده شد. بین شوری ۷۵ میلی‌مولار + ۷۵ ppm نانونقره با تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار + نانونقره ۷۵ ppm اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

همانطور که در شکل ۱ مشاهده شد اعمال تنش شوری منجر به افزایش محتوای فنل کل در مقایسه با شاهد شد. محتوای فنل کل در واقع به‌عنوان یک سازوکار آنتی‌اکسیدانی در گیاه مطرح است به‌طوری‌که با افزایش این ترکیبات میزان تحمل گیاه به تنش افزایش پیدا می‌کند. از جمله سازوکارهای دفاع غیرآنزیمی به منظور رویارویی با تنش اکسایشی (اکسیداتیو) القاشده توسط تنش در گیاهان، تجمع ترکیب‌های فنلی است. فنل‌های گیاهی متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که در شرایط مطلوب محیطی از مسیر شیکمیک اسید و از متابولیسم فنیل پروپانویید سنتز می‌شوند ولی تنش‌های محیطی مختلف، مقدار آن‌ها را در سلول‌ها تغییر می‌دهند (Vogt,

کاربرد همزمان شوری و نانونقره منجر به افزایش محتوای فنل کل در ریشه شد و این روند در شوری ۷۵ میلی‌مولار همراه با نانونقره ۷۵ ppm بارزتر بود و در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار روند افزایش فنل ریشه در مقایسه با شوری ۷۵ میلی‌مولار کندتر بود. همان‌طور که شکل ۱b نشان می‌دهد بیشترین محتوای فنل (۱۸۸/۵۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در شوری ۷۵ میلی‌مولار + نانونقره ۷۵ ppm مشاهده شد هر چند که با تیمار نانونقره ۷۵ ppm و بدون شوری اختلاف معنی داری نداشت. کمترین محتوای فنل ریشه (۱۰۲/۷۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در شاهد (بدون تیمار شوری و نانونقره) مشاهده شد.

فعالیت آنزیم PAL: بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشاهده شد که کاربرد همزمان شوری و نانونقره منجر به افزایش فعالیت آنزیم PAL در اندام هوایی شد و این روند در گیاهان تیمار شده با شوری ۷۵ میلی‌مولار در ترکیب با نانونقره در غلظت ۷۵ ppm بیشتر بود و در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار روند افزایش فعالیت آنزیم PAL اندام هوایی در مقایسه با شوری ۷۵ میلی‌مولار کمتر بود. همان‌طور که شکل ۲a نشان می‌دهد بیشترین فعالیت آنزیم PAL (۱۱/۴۱ نانومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در شوری ۷۵ میلی‌مولار + نانونقره ۷۵ ppm و کمترین فعالیت آنزیم PAL (۷/۷۰ نانومول بر دقیقه بر گرم وزن تر) در شاهد (بدون تیمار شوری و نانونقره) مشاهده شد.



شکل ۲- اثر سطوح مختلف تیمارهای شوری و نانوقره روی فعالیت آنزیم PAL در اندام هوایی (a) و ریشه (b) در گیاه ریحان. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

آمین‌زدایی فنیل آلانین به اسید ترانس سینامیک را کاتالیز می‌کند (Cass *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای Phimchan و همکاران (۲۰۱۴) بیان داشته‌اند که تحت تنش خشکی فعالیت آنزیم PAL در مقایسه با گیاهان بدون تنش افزایش یافته است. در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که فعالیت PAL برای غلبه بر اثرات مضر تنش شوری از طریق افزایش محتوای فنولیک و آنتوسیانین افزایش یافته است. نتایج مطالعه حاضر همبستگی مثبت بین نوسان فعالیت آنزیمی PAL و محتوای فنلی را نشان می‌دهد. ترکیبات فنلی از طریق مسیر فنیل پروپانوییدی سنتز می‌شوند که در آن PAL یک آنزیم کلیدی و اولیه است. با توجه به افزایش محتوای فنل بر اثر تیمار شوری در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که محتوای فنل اندازه‌گیری شده با ترکیبات فنلی غیر از آنتوسیانین‌ها مرتبط هستند (Saad *et al.*, 2021). افزایش فعالیت آنزیم PAL در شرایط تنش شوری در گیاه خردل سیاه (*Brassica nigra*) (Kazem *et al.*, 2020) با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد نانوقره در غلظت ۷۵ ppm منجر به افزایش محتوای فنل شد. در شرایط تنش به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد، سیستم دفاعی گیاهان تولید محتوای پلی‌فنولیک شامل فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین را به عنوان سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی طبیعی افزایش می‌دهد (Karuppusamy, 2009). ترکیبات پلی‌فنلیک

ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند که با جمع‌آوری و احیای ROSها مانع از اکسیداسیون مولکول‌های حیاتی سلول می‌شوند و با مهار و کاهش اتو-اکسیداسیون لیپیدها و خاموش کردن اکسیژن رادیکالی مانع بروز تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاه می‌شوند (Oh *et al.*, 2009). لذا افزایش میزان ترکیبات فنلی در بافت گیاهی در شرایط تنش یکی از راه‌های مقاومت نسبت به افزایش تنش و تنش اکسیداتیو است. افزایش مقدار فنل‌های محلول به‌ویژه پیش‌سازهای بیوسنتز لیگنین با افزایش ضخامت دیواره سلولی و ایجاد مانع زیستی جهت ورود نمک به یاخته‌ها تحمل آن‌ها را به این عناصر افزایش می‌دهد و میزان ترکیبات فنلی در مواجهه با تنش شوری در گیاهان افزایش پیدا می‌کند (Kumar *et al.*, 2013). با افزایش تجمع نمک و انتقال آن به برگ‌های گیاه، میزان فنل‌های آن افزایش می‌یابد (Santander *et al.*, 2022). افزایش تولید فنل کل که از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در گیاه هستند توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Sarker *et al.*, 2023). افزایش تولید فنل در مواجهه با تنش‌های شوری می‌تواند مؤید این باشد که گیاه در جهت کاهش اثرات تخریبی تنش تولید این ترکیبات را افزایش داده است و می‌تواند توجیه‌کننده افزایش محتوای فنل در پژوهش حاضر باشد.

PAL آنزیم کلیدی در مسیر فنیل پروپانوییدی است که

در گیاهان (فلفل‌ها) در شرایط تنش از گیاه در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. ترکیبات فنلی از طریق گروه‌های هیدروکسیل و همچنین از طریق عامل‌های فلز زدا منجر به کاهش ROSها و رادیکال‌های لیپیدی می‌شوند (Isah, 2019) که از این طریق منجر به ممانعت از اکسیداسیون لیپیدها شده و همچنین تجمع مالون دی‌آلدئید را در گیاه کاهش می‌دهند. گزارش شده است که نانوقره از طریق بلوکه کردن مسیر سیگنالینگ هورمون اتیلن (Rezvani et al., 2012) منجر به کاهش و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده (Isah, 2019) و حفظ و حتی افزایش ترکیبات فنلی (Mehrian and Karimi, 2017) و افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی (Isah, 2019) در گیاه می‌شود. لذا در مطالعه حاضر دلیل افزایش متابولیت‌های ثانویه از قبیل فنل و فلاونوئید در گیاه ریحان می‌تواند مربوط به تأثیر نانوقره در بلوکه کردن مسیر اتیلن، حذف رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید ترکیبات فنلی باشد. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Begum و همکاران (۲۰۲۰) در کشت کالوس گیاهان *Fagonia indica* مطابقت دارد. در شرایط تنش به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سیستم دفاعی گیاهان ترکیبات پلی‌فنولیک (فنل و فلاونوئید) را آزاد می‌کنند (Karuppusamy, 2009). در مطالعه حاضر نیز همانطور که مشاهده شد کاربرد غلظت ۷۵ ppm نانوقره منجر به افزایش محتوای پلی‌فنولیک شد. به نظر می‌رسد که این سطح از نانوقره برای گیاه ریحان دارای نقش حفاظتی بوده است. در مطالعه‌ای دیگر نیز Mehrian و Karimi (۲۰۱۷) گزارش کرده‌اند که نانوقره در ذرت منجر به افزایش محتوای فنلی شده است، همچنین در مطالعه‌ای دیگر عامریان و همکاران (۱۴۰۱) افزایش ترکیبات فنل را در اثر تیمار با نانوقره در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در شرایط تنش خشکی در دانه‌ریست کینوا رقم "Titicaca" گزارش کرده‌اند که نتایج مطالعه حاضر نیز بیانگر همین امر است.

مطالعات بیوشیمیایی نشان داده‌اند که نانوذرات نقره می‌توانند منجر به تولید مقادیر زیادی از ROSها شوند و از این طریق باعث آسیب اکسیداتیو شدید به سلول‌های گیاهی

گردند، به عنوان مثال، پراکسیداسیون و آسیب در نفوذپذیری غشای سلولی در گیاهان در اثر تیمار با نانوقره توسط Yan و Chen (۲۰۱۹) گزارش شده است. با این حال مطالعات قبلی نشان داده است که نانوذرات فلزی با افزایش ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان، تحمل گیاهان را در برابر تنش اکسیداتیو افزایش می‌دهند (Quiterio-Gutierrez et al., 2019). PAL آنزیمی است که در مسیر فنیل پروپانوئید به صورت آنزیم فعال‌کننده شرکت می‌کند و نقش مهمی در استراتژی دفاعی سلولی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از غلظت فلزات سمی ایفا می‌کند (Cass et al., 2015). از این نظر، مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد نانوذرات نقره باعث القای فعالیت PAL می‌شود که به نوبه خود می‌تواند تنش اکسیداتیو را کاهش دهد. بنابراین، افزایش فعالیت PAL مشاهده شده در اثر تیمار با نانوقره نشان داد که سازوکار دفاعی گیاه افزایش یافته است و فعالیت‌های این آنزیم در واقع به تحمل گیاه ریحان در شرایط تنش شوری کمک می‌کند. نتایج مشابهی توسط Ali و همکاران (۲۰۱۹) گزارش شده است. آنها بیان کرده‌اند که کاربرد نانوقره می‌تواند به طور مؤثر برای افزایش فعالیت PAL به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های فعال زیستی در گیاه *Caralluma tuberculata* مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، Quiterio-Gutierrez و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کرده‌اند که استفاده از نانوقره فعالیت PAL را افزایش می‌دهد و منجر به افزایش توانایی برای تحمل حمله عوامل بیماری‌زا در گیاهان گوجه‌فرنگی می‌شود. در مطالعه حاضر، افزایش پروتئین‌های محلول را می‌توان به انواع فرآیندهای متابولیکی که نانوذرات نقره در سلول‌های گیاهی القا کردند، نسبت داد. در نهایت، مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات نقره می‌توانند به‌عنوان محرک‌های بیرونی PAL درگیر در مسیر فنیل پروپانوئید در ریحان شرکت کنند. گزارش افزایش میزان فعالیت آنزیم PAL در گیاه نعناع شیرین بو (*Hpytus suaveolens*) توسط Valdez-Salas و همکاران (۲۰۲۰) در اثر تیمار با نانوقره (۱۰۰ ppm) مطابق با نتایج مطالعه حاضر است.

پراکسید هیدروژن: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که

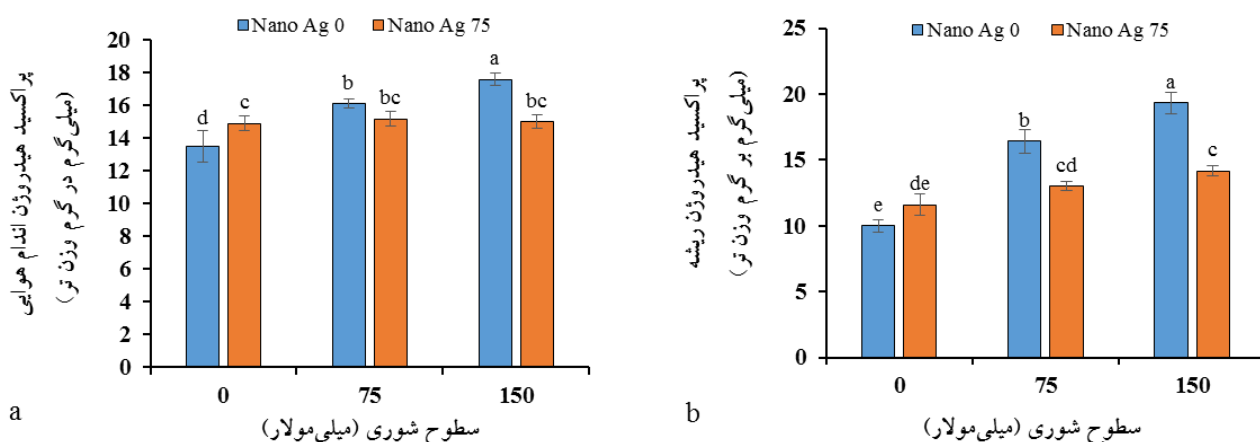
نتایج با یافته‌های Liu و همکاران (۲۰۲۳) مبنی بر افزایش تولید پراکسید هیدروژن در گیاه کدوی زیتنی (*Lagenaria siceraria*) در شرایط تنش شوری و همچنین نتایج مطالعه Sun و همکاران (۲۰۲۲) مبنی بر افزایش تولید پراکسید هیدروژن در گیاه زالزالک (*Malus hupehensis*) در شرایط تنش قلیایی مطابقت دارد.

تجمع بیش از حد ROSها از جمله پراکسید هیدروژن، منجر به عدم تعادل سلولی و اختلال در سیگنالینگ فرآیندهای مرتبط با رشد می‌گردد و از این طریق منجر به مهار رشد و آسیب یاخته‌ای می‌شود (Sharma and Dietz, 2009; Zhang et al., 2021). در طی مطالعات مختلف ثابت شده است که افزایش سریع پراکسید هیدروژن منجر به کاهش توقف رشد در گیاهان از طریق کاهش انعطاف‌پذیری دیواره سلول‌های گیاهی می‌شود (Kao, 2014). در شرایط طبیعی، پراکسید هیدروژن و سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بخش‌های مختلف سلول‌های گیاهان تولید می‌شوند اما با توجه به اینکه میزان‌شان بسیار کم است، توسط یکسری عوامل حذف می‌شوند. در شرایط متداول SOD، رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد و CAT و APX به سادگی پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کنند (Arora et al., 2002). قسمت اعظم صدمات تنش‌های غیرزیستی مربوط به اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو است. این امر به دلیل تولید بیشتر رادیکال‌های آزاد با جایگزینی آهن به جای عنصر روی در ساختار پروتئین‌ها و افزایش فعالیت NADP(H) اکسیداز و نیز کاهش حذف این رادیکال‌های آزاد با آنزیم‌هایی مانند SOD است (Marschner, 2012). دلایل ذکر شده می‌تواند علت افزایش پراکسید هیدروژن در شرایط تنش شوری باشد.

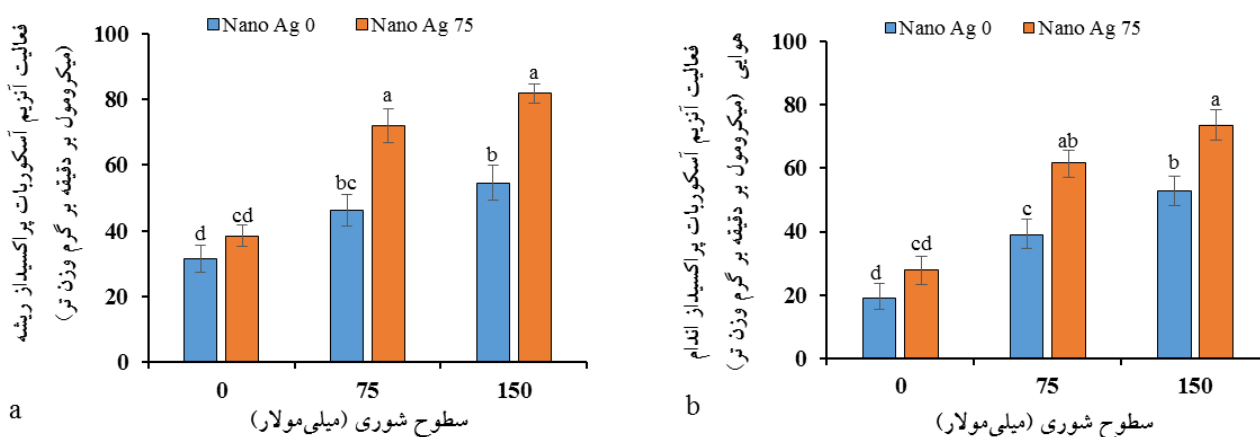
فعالیت آنزیم APX: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد همزمان شوری و نانوقره منجر به افزایش فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه گیاه ریحان شد اما تأثیر شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و ۷۵ ppm نانوقره در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود. به‌طورکلی بیشترین میزان فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه به ترتیب ۷۳/۵۳ و ۸۱/۹۲ میکرومول در دقیقه در گرم وزن تر در گیاهان تیمار شده با شوری ۱۵۰

کاربرد همزمان شوری و نانوقره منجر به افزایش میزان پراکسید هیدروژن در اندام هوایی و ریشه گیاه ریحان گردید اما تأثیر تیمار شوری به ویژه شوری ۱۵۰ میلی‌مولار بدون کاربرد نانوقره در افزایش پراکسید هیدروژن در مقایسه با سایر تیمارها بارزتر بود. به‌طورکلی بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در اندام هوایی و ریشه به ترتیب ۱۷/۶۱ و ۱۹/۳۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر در گیاهان تیمار شده با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار و بدون کاربرد نانوقره مشاهده شد و کمترین میزان پراکسید هیدروژن در اندام هوایی و ریشه به ترتیب ۱۳/۵۱ و ۹/۹۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در گیاهان شاهد به دست آمد (شکل a و b).

پراکسید هیدروژن پیش‌ماده بسیاری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن است، لذا تعیین میزان آن در بافت‌های گیاهی در شرایط تنش بسیار حائز اهمیت است (Ghori et al., 2019). هنگامی که ROSها در بافت‌های گیاهی تجمع پیدا می‌کنند، ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین و لیپیدها اکسید شده و در واقع نوعی تنش ثانویه تحت عنوان تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی رخ می‌دهد. سازوکار دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو شامل سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی است که به صورت سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی است، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل APX، CAT، SOD و GPX، و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل آسکوربات، گلوکاتیون و آلفاتوکوفرول هستند (Zhang et al., 2021). پراکسید هیدروژن از جمله ROSها است که در نتیجه تبدیل رادیکال سوپراکسید (O_2^-) توسط آنزیم SOD تولید می‌شود در طی این واکنش رادیکال هیدروکسیل (OH) بسیار فعال تولید می‌شود. رادیکال پراکسید هیدروژن دارای طول عمر طولانی است و نقش‌های مهمی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تنفس نوری، فتوسنتز، پیری، تحرک روزنه‌ها و رشد گیاه دارد، اما در غلظت‌های زیاد، سبب مرگ سلولی می‌شود (Ahmad, 2014). بنابراین لازم است این رادیکال آزاد به منظور بقای سلول‌ها، خنثی شود. در مطالعه انجام شده نیز تنش شوری منجر به افزایش قابل ملاحظه‌ی رادیکال پراکسید هیدروژن شد. این



شکل ۳- اثر سطوح مختلف تیمارهای شوری و نانونقره روی میزان پراکسید هیدروژن در اندام هوایی (a) و ریشه (b) در گیاه ریحان. حروف غیرمشابه بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



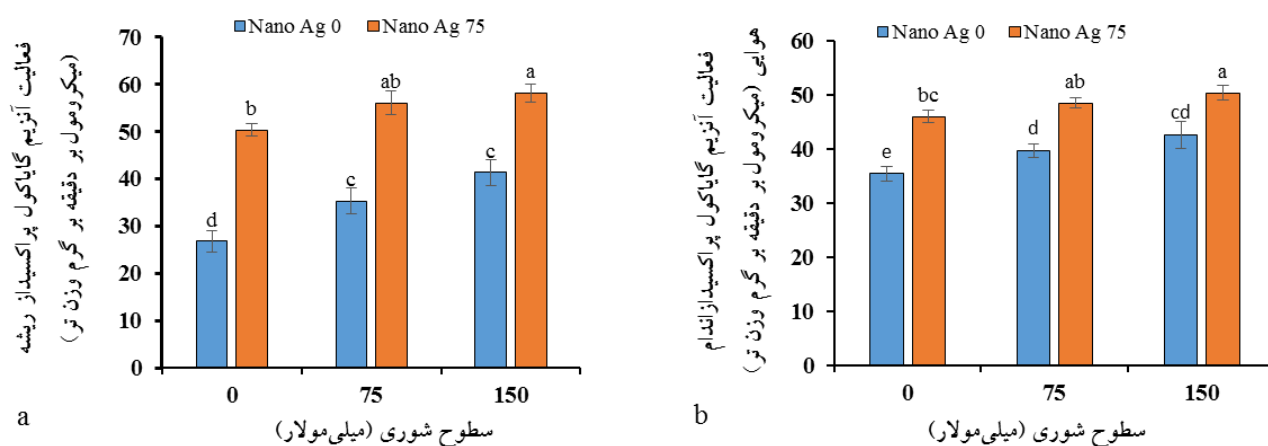
شکل ۴- اثر سطوح مختلف تیمارهای شوری و نانونقره روی فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی (a) و ریشه (b) در گیاه ریحان. حروف غیرمشابه بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

نانونقره در مقایسه با سایر تیمارها بارزتر بود. به‌طورکلی بیشترین میزان فعالیت آنزیم POX در اندام هوایی و ریشه به ترتیب ۵۰/۴۰ و ۵۸/۲۰ میکرومول در دقیقه در گرم وزن تر در گیاهان تیمار شده با شوری ۱۵۰ میلی‌مولار + غلظت ۷۵ ppm نانونقره به دست آمد هر چند که در هر دو اندام هوایی و ریشه این میزان از فعالیت آنزیم POX با تیمار ۷۵ ppm نانونقره + ۷۵ میلی‌مولار شوری اختلاف معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد. کمترین میزان فعالیت آنزیم POX در اندام هوایی و ریشه به ترتیب ۳۵/۴۵ و ۲۸/۷۸ نانومول در گرم وزن تر) در گیاهان شاهد به دست آمد (شکل b و ۵a).

همانطور که مشاهده شد اعمال تنش شوری منجر به

میلی‌مولار و غلظت ۷۵ ppm نانونقره به دست آمد هر چند که در هر دو اندام هوایی و ریشه این میزان از فعالیت آنزیم APX با تیمار ۷۵ ppm نانونقره + ۷۵ میلی‌مولار شوری اختلاف معنی داری از لحاظ آماری نداشتند. کمترین میزان فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه به ترتیب ۱۸/۹۸ و ۳۱/۳۶ نانومول در گرم وزن تر) در گیاهان شاهد به دست آمد (شکل b و ۴a).

فعالیت آنزیم POX: با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که کاربرد همزمان شوری و نانونقره منجر به افزایش فعالیت آنزیم POX در اندام هوایی و ریشه گیاه ریحان شد با این حال تأثیر شوری ۱۵۰ میلی‌مولار + ۷۵ ppm



شکل ۵- اثر سطوح مختلف تیمارهای شوری و نانونقره روی فعالیت آنزیم POX در اندام هوایی (a) و ریشه (b) در گیاه ریحان. حروف غیرمشابه بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

زیاد، توانایی صدمه‌زدن به مولکول‌های زیستی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را دارند (Esfandiari *et al.*, 2011).

نتیجه این صدمات، بروز اختلالات متابولیسمی است که بیانگر اهمیت ویژه مولکول‌های زیستی در متابولیسم سلول است (کرمیان و عطایی برازنده، ۱۳۹۳). تجمع آسیب‌های ناشی از ROSها و دیگر ترکیبات سمی به دست آمده از اکسیداسیون مواد زیستی در نهایت منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده درون سلولی می‌شود (Esfandiari *et al.*, 2011). ROSها حتی در شرایط مطلوب محیطی نیز تولید می‌شوند (Edreva, 2005). لذا، لازم است که سلول‌های گیاهی از سازوکارهای دفاعی ویژه‌ای برای مقابله با آثار مخرب آن‌ها، چه در شرایط طبیعی و چه در شرایط تنش برخوردار باشند (Asada, 2000). گیاهان از طریق دو سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (پراکسیدازها و کاتالازها) و غیرآنزیمی (کارتنوئیدها و ترکیبات فنلی) سلول‌ها و سیستم‌های زیرسلولی را از اثرات سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند (El-Tayeb and El- Enany, 2006). CAT یک اکسیدوردوکتاز است که در ساختمان آن گروه هم وجود دارد و باعث تجزیه آب اکسیژنه از طریق تغییر یک واکنش اکسیداسیون احیاء با کمک یون‌های آهن به آب و مولکول اکسیژن می‌شود (Hasanuzzaman *et al.*, 2017). CAT، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه ریحان شد. در طی شرایط تنش، الکترون‌ها از مسیر طبیعی خود در زنجیره انتقال الکترون تنفسی خارج شده و به مولکول اکسیژن می‌رسند که منجر به تولید رادیکال سوپر اکسید می‌شوند (Shanying *et al.*, 2017). گیاهان از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی نظیر آنزیم‌های CAT، SOD، APX، GR، گلوکاتیون اس- ترانسفراز و سیستم دفاعی غیرآنزیمی مانند آسکوربات و گلوکاتیون برای مهار تجمع بیش از حد رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش استفاده می‌کنند (Winiarska-Mieczan, 2018). همانطور که می‌دانیم تنش در گیاهان منجر به افزایش تولید ROSها می‌شود و گیاهان در برابر ROSها مجهز به پراکسیدازها به‌عنوان دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند. این آنزیم‌ها، ROSها را خنثی کرده و مانع فعالیت آن‌ها می‌گردند (Dat *et al.*, 2000). علاوه بر نقش دفاعی، پراکسیدازها در برخی از فرآیندهای متابولیکی از جمله اکسیداسیون فنل و ایجاد پیوند با پروتئین‌های ساختاری سلول نیز دخالت دارند (Sharma *et al.*, 2012).

تولید ROSها در اثر احیای ناقص اکسیژن اتمسفری در فرآیندهای حیاتی سلول مانند: فتوسنتز، تنفس و تنفس نوری انجام می‌شود از جمله مهم‌ترین ROSها می‌توان به رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و اکسیژن منفرد اشاره کرد که برای سلول، سمی و فوق‌العاده خطرناک هستند (Edreva, 2005). ROSها از طریق میل الکترون‌خواهی

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بیانگر افزایش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اثر تیمار با غلظت ۷۵ ppm نانوقره و کاهش پراکسید هیدروژن بود. سازوکار اصلی سمیت گیاهی در اثر نانوقره تولید ROSها به میزان زیاد است که توسط ذرات نانوقره تولید آن‌ها القا می‌شود که منجر به تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود (Tripathi *et al.*, 2017). تعدادی از مطالعات نشان داد که تولید ROSها به طور قابل توجهی در گیاهان پس از قرارگرفتن در معرض نانوذرات نقره افزایش می‌یابد. چهار نوع در سلول‌های گیاهی تولید می‌شود، که شامل اکسیژن منفرد، سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، و رادیکال هیدروکسیل هستند (Ma *et al.*, 2015). در شرایط محیطی نرمال، ROSها به عنوان محصولات جانبی مسیرهای متابولیک طبیعی در اندامک‌هایی مانند کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند (Moller *et al.*, 2007). با این حال، در شرایط تنش، مقادیر بیش از حد ROSها تولید می‌شود و از طریق انتقال الکترون منجر به آسیب اکسیداتیو شدید به بیومولکول‌های گیاهی می‌شود (Carocho and Ferreira, 2013). تولید ROSهای اضافی ناشی از قرار گرفتن در معرض نانوذرات متعاقباً می‌تواند منجر به تنش اکسیداتیو شود، باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (معروف به پراکسیداسیون لیپیدی) شود و به نفوذپذیری غشای سلولی آسیب رسانده و ساختار سلولی را تغییر دهد و مستقیماً به پروتئین و DNA آسیب وارد کند و در نتیجه سلول منجر به مرگ و مهار رشد در گیاهان شود (Yuan *et al.*, 2018). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسنده افزایش یافت، به نظر می‌رسد غلظت نانوقره مورد استفاده در گیاه ریحان منجر به سمیت و تنش شده است. Qian و همکاران (۲۰۱۳) دریافته‌اند که نانوذرات نقره می‌توانند در برگ‌های آرابیدوپسیس انباشته شوند و رونویسی ژن‌های آنتی‌اکسیدان و آکواپورین را تغییر دهند، که نشان می‌دهد نانوذرات نقره می‌توانند تعادل بین سیستم‌های اکسیدان و آنتی‌اکسیدان را تغییر دهند. به‌طور مشابه، Speranza و همکاران (۲۰۱۳) سمیت نانوذرات نقره در شرایط *in vitro*

(Gong *et al.*, 2017). جایگاه CAT به طور عمده در سیتوزول، میتوکندری و پراکسی‌زوم است و مانع از اکسیداسیون لیپیدها، تخریب کلروفیل و آسیب‌های دیواره سلولی می‌شود (Jithesh *et al.*, 2006). آنزیم CAT به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، منجر به فعال‌شدن پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش‌ها می‌شود و همراه با سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر به حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود (Mo *et al.*, 2008).

از APX پراکسیدازهای مهم موجود در سیتوزول و کلروپلاست است. این آنزیم همچون آنزیم CAT یک ساختار هم در جایگاه فعال خود است که در مرکز آن یک اتم آهن قرار دارد (Rani *et al.*, 2014). همچنین در این بخش فعال آنزیم، اسید آمینه سیستئین حضور دارد که از نظر پتانسیل ردوکس فعال است و به اصطلاح به آن سلنوسیستئین گفته می‌شود (Unsal *et al.*, 2020). APX بیشتر در تنظیم نهایی سیگنال‌ها و انتقال پیام‌های سلولی در طی تنش‌ها دخیل است (Zaid *et al.*, 2020). سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن توسط APX از طریق اکسیداسیون آسکوربات به مونودی هیدروآسکوربات انجام می‌شود و برای این واکنش یک مولکول NAD(P)H نیاز است (Akram *et al.*, 2017).

نتایج مطالعه حاضر بیانگر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش شوری بود در تأیید نتایج مطالعه حاضر Bayat و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کرده‌اند که تنش شوری - قلیایی منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله CAT، APX، SOD و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH در گیاه مریم‌گلی (*Salvia lavandulifolia*) شد. همچنین Yan و همکاران (۲۰۲۰) افزایش فعالیت CAT و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH را در شرایط تنش شوری - قلیایی در گیاه تلخ بیان (*Sophora alopecuroides*) گزارش کرده‌اند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر افزایش فعالیت آنزیم POX در شرایط تنش قلیایی روی برنج قرمز توسط Sharma و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش شده است. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر در یک راستا است.

نانونقره توسط عامریان و همکاران نیز گزارش شد که این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر در یک راستا است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، می‌توان گزارش کرد که تنش شوری بر بسیاری از فاکتورهای مورد ارزیابی در پژوهش حاضر تأثیر منفی گذاشت، ولی برخی شاخص‌ها از جمله محتوای فنل و پراکسید هیدروژن، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند CAT و POX افزایش یافتند. در مطالعه حاضر همچنین محتوای پراکسید هیدروژن، فنل و پرولین، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اثر تیمار با نانونقره افزایش یافتند. به‌طور کلی یافته‌های این تحقیق، تأثیر نانونقره در شرایط تنش شوری روی گیاه ریحان، یک نقش مهم در سازگاری گیاه ریحان در شرایط شوری را نشان می‌دهد که این نقش خود را از طریق ایجاد تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی ایفا می‌کند. هر چند که تجزیه و تحلیل‌های گسترده‌ای بر اساس تکنیک‌های پیشرفته و جامع مانند RNA Sequencing و Bisulfite Sequencing برای تأیید این نظریه لازم است.

سپاسگزاری

از خانم دکتر ندا فرناد کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه ارومیه برای همکاری در پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌نمایند که هیچگونه تعارض منافی در رابطه با نشر این مقاله وجود ندارد.

برای گرده گیاه کیوی را بررسی کرده و گزارش کرده‌اند که میزان تولید ROSها در اثر تیمار با نانونقره افزایش یافت و منجر به کاهش زنده‌ماندن و عملکرد گرده شد.

در مطالعه‌ای که توسط Nair و Chung (۲۰۱۴) انجام شده است، گزارش شد که قرارگرفتن گیاه برنج در معرض غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر نانونقره منجر به افزایش قابل توجهی در تشکیل پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدی در اندام‌های هوایی و ریشه شد. تجزیه و تحلیل بیشتر نشان داد که تولید ROSها توسط نانوذرات نقره وابسته به غلظت مورد استفاده دارد (Nair and Chung, 2014). در مطالعه‌ای دیگر Thiruvengadam و همکاران (۲۰۱۵) تأثیر قرارگرفتن در معرض نانونقره در شلغم را گزارش کرده و دریافته‌اند که افزایش غلظت نانونقره باعث تولید بیش از حد رادیکال‌های سوپراکسید و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. تشکیل پراکسید هیدروژن نیز پس از قرارگرفتن در معرض ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره به طور قابل توجهی افزایش یافت. فلورسانس دی‌کلرو فلئوروسین افزایش شدید تولید ROSها را در ریشه‌های نهال شلغم را نشان داد که نشان‌دهنده وجود تنش اکسیداتیو در ریشه‌ها پس از قرار گرفتن در معرض نانونقره بود. به‌طور کلی می‌توان افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و POX را به نقش حفاظتی نانونقره به عنوان بازدارنده تولید اتیلن و جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد نسبت داد. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های Kumar و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت که اذعان کرده‌اند نانونقره منجر به افزایش فعالیت آنزیم CAT و کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم CAT در شرایط تنش خشکی در گیاه دانه‌رست کینوا در اثر تیمار با

منابع

- غلام‌نیا، اعظم، مصلح آرانی، اصغر، سودایی‌زده، حمید، ترکش اصفهانی، سعید، و قاسمی، سمیه (۱۴۰۰). بررسی آثار تنش شوری و گرما بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و ریشی در گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita L.*) در فواصل زمانی متفاوت. *مجله زیست‌شناسی گیاهی/ایران*، ۱۳(۴۸)، ۳۹-۵۲.
- کرمان، رویا، و عطایی برازنده، صدیقه (۱۳۹۳). مطالعه اثر شوری بر برخی از شاخص‌های رشد در سه گونه از جنس اسپرس

(*Onobrychis*) در ایران. نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۵ (۱۵)، ۸۲-۶۹.

- Ahmad, B. (2014). Interactive effects of silicon and potassium nitrate in improving salt tolerance of wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(9), 1889-1899. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60639-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60639-5)
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 613. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00613>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z. U. R. (2019). Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 715-724. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577884>
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science*, 82, 1227-1238.
- Asada, K. (2000). The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 355(1402), 1419-1431. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0703>
- Azizi, I., Esmailpour, B., & Fatemi, H. (2021). Exogenous nitric oxide on morphological, biochemical and antioxidant enzyme activity on savory (*Satureja hortensis* L.) plants under cadmium stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(6), 417-423. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.05.003>
- Balal, R. M., Ashraf, M. Y., Khan, M. M., Jaskani, M. J., & Ashfaq, M. (2011). Influence of salt stress on growth and biochemical parameters of citrus rootstocks. *Pakistan Journal of Botany*, 43(4), 2135-2141. <https://www.researchgate.net/publication/233531731>
- Bayat, H., Shafie, F., & Shahraki, B. (2022). Salinity effects on growth, chlorophyll content, total phenols, and antioxidant activity in *Salvia lavandulifolia* Vahl. *Advances in Horticultural Science*, 36(2), 145-153. <https://doi.org/10.36253/ahsc-12015>
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Begum, S., Zahid, A., Khan, T., Khan, N. Z., & Ali, W. (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, 1739-1750. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00851-w>
- Carocho, M. & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Cass, C. L., Peraldi, A., Dowd, P. F., Mottiar, Y., Santoro, N., Karlen, S. D., Bukhman, Y. V., Foster, C. E., Thrower, N., Bruno, L. C., Moskvin, O. V., Johnson, E. T., Willhoit, M. E., Phutane, M., Ralph, J., Mansfield, S. D., Nicholson, P., & Sedbrook, J. C. (2015). Effects of phenylalanine ammonia lyase (PAL) knockdown on cell wall composition, biomass digestibility, and biotic and abiotic stress responses in *Brachypodium*. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4317-4335. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv269>
- Choudhary, A., Kumar, A., & Kaur, N. (2020). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 42(1), 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.10.002>
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science*, 57, 779-795. <https://doi.org/10.1007/s000180050041>
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. A. M. E. L. A., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93-101. <https://doi.org/10.1093/jxb/32.1.93>
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106(2), 119-133. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.022>
- El-Tayeb, M. A. & El-Enany, N. L. (2006). Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Growth Regulation*, 50, 191-199. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9118-2>
- Ershad Langroudi, M., Hashemabadi, D., Kalatejari, S., & Asadpour, L. (2020). Effects of pre-and postharvest applications of salicylic acid on the vase life of cut *Alstroemeria* flowers (*Alstroemeria hybrida*). *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 3(1), 115-124. <https://doi.org/10.22077/jhpr.2019.2409.1053>
- Esfandiari, E., Javadi, A., Shokrpour, M., & Shekari, F. (2011). The effect of salt stress on the antioxidant defense mechanisms on wheat seedling. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(8), 2021-2036. <https://www.researchgate.net/publication/257928619>
- Fita, A., Rodriguez-Burruazo, A., Boscaiu, M., Prohens, J., & Vicente, O. (2015). Breeding and domesticating crops

- adapted to drought and salinity: A new paradigm for increasing food production. *Frontiers in Plant Science*, 6, 978. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00978>
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Gong, X., Shi, Sh., Dou, F., Song, Y., & Ma, F. (2017). Exogenous melatonin alleviates alkaline stress in *Malus hupehensis* rehd. by regulating the biosynthesis of polyamines. *Journal Molecules*, 22, 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules22091542>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S., Alharby, H. F., Razafindrabe, B. H. N., & Fujita, M. (2017). Hydrogen peroxide pretreatment mitigates cadmium-induced oxidative stress in *Brassica napus* L.: An intrinsic study on antioxidant defense and glyoxalase systems. *Frontiers in Plant Science*, 8, 115. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00115>
- Hu, D., Lv, G., Qie, Y., Wang, H., Yang, F., & Jiang, L. (2021). Response of morphological characters and photosynthetic characteristics of *Haloxylon ammodendron* to water and salt stress. *Sustainability*, 13(1), 388. <https://doi.org/10.3390/su13010388>
- Hussain Wani, S., Brajendra Singh, N., Haribhushan, A., & Iqbal Mir, J. (2013). Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Current Genomics*, 14(3), 157-165. <https://doi.org/10.2174/1389202911314030001>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. R., & Parida, A. K. (2006). Antioxidative response mechanism in halophytes: Their role in stress defense. *Journal Genetics*, 85, 237-254. <https://doi.org/10.1007/BF02935340>
- Kale, S. K., Parishwad, G. V., & Patil, A. S. H. A. S. (2021). Emerging agriculture applications of silver nanoparticles. *ES Food and Agroforestry*, 3, 17-22. <https://doi.org/10.30919/esfaf438>
- Kao, C. H. (2014). Cadmium stress in rice plants: Influence of essential elements. *Crop, Environment and Bioinformatics*, 11, 113-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6436-4>
- 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. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000026>
- Kazem, G., Hassanzadeh, N., Shakiba, M., & Esmailpour, B. (2020). Exogenous salicylic acid and 24-epi-brassinolide improve antioxidant capacity and secondary metabolites of *Brassica nigra* in salt stress condition. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (26C). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101636>
- Ke, D. & Saltveit, M. E. (1986). Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonialyase activity in iceberg lettuce. *Hort Science*, 21(5), 1169-1171. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.22.2.1986>
- Kumar, D., Mishra, D. S., Chakraborty, B., & Kumar, P. (2013). Pericarp browning and quality management of litchi fruit by antioxidants and salicylic acid during ambient storage. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 797-802. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0384-2>
- Kumar, V. K., Muthukrishnan, S., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100158>
- Lazarevic, B., Satovic, Z., Nimac, A., Vidak, M., Gunjaca, J., Politeo, O., & Carovic-Stanko, K. (2021). Application of phenotyping methods in detection of drought and salinity stress in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 12, 629441. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.629441>
- Li, Z., Hu, Y., Chang, M., Kashif, M. H., Tang, M., Luo, D., ... & Chen, P. (2021). 5-azacytidine pre-treatment alters DNA methylation levels and induces genes responsive to salt stress in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Chemosphere*, 271, 129562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129562>
- Liu, F., Yang, J., Mu, H., Li, X., Zhang, X., Wen, Y., & Zhang, X. (2023). Effects of brassinolide on growth, photosynthetic rate and antioxidant enzyme activity of ornamental gourd under salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 137. <https://doi.org/10.1134/s1021443722603202>
- Liu, J., Fu, C., Li, G., Khan, M. N., & Wu, H. (2021). ROS homeostasis and plant salt tolerance: Plant nanobiotechnology updates. *Sustainability*, 13(6), 3552. <https://doi.org/10.3390/su13063552>
- Ma, C., Chhikara, S., Minocha, R., Long, S., Musante, C., White, J. C., ... & Dhankher, O. P. (2015). Reduced silver nanoparticle phytotoxicity in *Crambe abyssinica* with enhanced glutathione production by overexpressing bacterial γ -glutamylcysteine synthase. *Environmental Science and Technology*, 49(16), 10117-10126.
- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgaria fruits and vegetables. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 40, 255-260.
- Marschner, P. (2012). Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd Ed. Academic Press, London.

- Mehrian, S. K. & 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.
- Mo, Y., Gong, D., Liang, L., Han, R., Xie, J., & Li, W. (2008). Enhanced preservation effects of sugar apple fruits by salicylic acid treatment during postharvest storage. *Journal of Science and Food Agriculture*, 88, 2693-2699. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3395>
- Møller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459-481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(3), 81-91. <https://doi.org/dx.doi.org/10.7324/JABB.2020.80315>
- Nair, P. M. G. & Chung, I. M. (2014). Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 112, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.056>
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell and Physiology*, 22, 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nasibi, F., Kalantari, K. M., Zanganeh, R., Mohammadinejad, G., & Oloumi, H. (2016). Seed priming with cysteine modulates the growth and metabolic activity of wheat plants under salinity and osmotic stresses at early stages of growth. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21, 279-286. <https://doi.org/10.1007/s10502-016-0233-4>
- Nejatzadeh, F. (2021). Effect of silver nanoparticles on salt tolerance of *Satureja hortensis* L. during in vitro and in vivo germination tests. *Heliyon*, 7(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05981>
- Negrao, S., Schmockel, S. M., & Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>
- Oh, M. M., Carey, E. E., & Rajashekar, C. B. (2009). Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.008>
- Phimchan, P., Chanthai, S., Bosland, P., & Techawongstien, W. S. (2014). Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic - 4 -hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in capsicum under drought stress. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62, 7057-7062. <https://doi.org/10.1021/jf4051717>
- Qasem, A., Assaggaf, H., Mrabti, H. N., Minshawi, F., Rajab, B. S., Attar, A. A., & Bouyahya, A. (2023). Determination of chemical composition and investigation of biological activities of *Ocimum basilicum* L. *Molecules*, 28(2), 614. <https://doi.org/10.3390/molecules28020614>
- Qian, D., Xiong, S., Li, M., Tian, L., & Qu, L. Q. (2021). OsFes1C, a potential nucleotide exchange factor for OsBiP1, is involved in the ER and salt stress responses. *Plant Physiology*, 187, 396-408. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab263>
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., & Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, 25(9), 1947-1956. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5)
- Quiterio-Gutierrez, T., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Hernandez-Fuentes, A. D., Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., ... & Juarez-Maldonado, A. (2019). The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses of tomato plants under stress by *Alternaria solani*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1950. <https://doi.org/10.3390/ijms20081950>
- Radzikowska-Kujawska, D., Sawinska, Z., Grzanka, M., Kowalczewski, P. L., Sobiech, L., Switek, S., & Nowicki, M. (2023). *Hermetia illucens* frass improves the physiological state of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its nutritional value under drought. *Plos One*, 18(1), e0280037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280037>
- Ramegowda, V., Da Costa, M. V. J., Harihar, S., Karaba, N. N., & Sreeman, S. M. (2020). In Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817892-8.00017-9>
- Rani, A., Kumar, A., Lal, A., & Pant, M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: A review. *International Journal of Environmental Health Research*, 24, 378-399. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>
- Razak, N. Q. A., Yusoff, M. H. M., Aziz, W. N. A. A., Kamal, M. L., Hasan, S., Uyup, N. H., ... & Shafie, M. H. (2023). Effects of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth: A review. *Journal of the Indian Chemical Society*, 100866. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100866>
- Rezvani, N., Sorooshzadeh, A., & Farhadi, N. (2012). Effect of nanosilver on growth of saffron in flooding stress. *World Academy of Science Engineering and Technology*, 6(1), 517-522.
- Saad, K. R., Kumar, G., Mudliar, S. N., Giridhar, P., & Shetty, N. P. (2021). Salt stress-induced anthocyanin biosynthesis genes and MATE transporter involved in anthocyanin accumulation in *Daucus carota* cell culture. *ACS Omega*, 6(38), 24502-24514. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02941>
- Santander, C., Vidal, G., Ruiz, A., Vidal, C., & Cornejo, P. (2022). Salinity eustress increases the biosynthesis and accumulation of phenolic compounds that improve the functional and antioxidant quality of red lettuce. *Agronomy*,

- 12(3), 598. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030598>
- Sarker, U. & Oba, S. (2021). The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 559876. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559876>
- Sarker, U., Hossain, M. N., Oba, S., Ercisli, S., Marc, R. A., & Golokhvast, K. S. (2023). Salinity stress ameliorates pigments, minerals, polyphenolic profiles, and antiradical capacity in lalshak. *Antioxidants*, 12(1), 173. <https://doi.org/10.3390/antiox12010173>
- Shanying, H. E., Xiaoe, Y., Zhenli, H. E. & Baligar, V. C. (2017). Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: A review. *Pedosphere*, 27, 421-438. <https://doi.org/10.3390/biology9070177>
- Sharma, M., Mahajan, P., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2019). 24-Epibrassinolide pre-treatment reduces alkaline-induced oxidative stress in red rice seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 23192-23197. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05474-7>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 21, 12-32. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma, S. S. & Dietz, K. J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.007>
- Speranza, A., Crinelli, R., Scoccianti, V., Taddei, A. R., Iacobucci, M., Bhattacharya, P., & Ke, P. C. (2013). In vitro toxicity of silver nanoparticles to kiwifruit pollen exhibits peculiar traits beyond the cause of silver ion release. *Environmental Pollution*, 179, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.04.021>
- Sun, Z., Zou, Y., Xie, C., Han, L., Zheng, X., Tian, Y., & Wang, C. (2022). Brassinolide improves the tolerance of *Malus hupehensis* to alkaline stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1032646.
- Thiruvengadam, M., Gurunathan, S., & Chung, I. M. (2015). Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa* L.). *Protoplasma*, 252, 1031-1046. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0738-5>
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V. P., Sharma, N. C., ... & Chauhan, D. K. (2017). An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.030>
- Unsal, V., Dalkiran, T., Cicek, M., & Kolukcu, E. (2020). The role of natural antioxidants against reactive oxygen species produced by cadmium toxicity: A review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10, 184. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.023>
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N., & Smidh, B. N. (1985). Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 121, 453-467. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44958-x>
- Valdez-Salas, B., Beltran-Partida, E., Mendez-Trujillo, V., & Gonzalez-Mendoza, D. (2020). Silver nanoparticles from *Hpytus suaveolens* and their effect on biochemical and physiological parameter in mesquite plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101733. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101733>
- Vogt, T. (2010). Phenyl propanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3, 2-20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Winiarska-Mieczan, A. (2018). Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress-a review. *Biometals*. 31, 909-926. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0153-z>
- Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na⁺ sensing and transport. *The Crop Journal*, 6(3), 215-225. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.01.003>
- Wu, H., Shabala, L., Azzarello, E., Huang, Y., Pandolfi, C., Su, N., & Shabala, S. (2018). Na⁺ extrusion from the cytosol and tissue-specific Na⁺ sequestration in roots confer differential salt stress tolerance between durum and bread wheat. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 3987-4001. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery194>
- Yan, A. & Chen, Z. (2019). Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 23-25. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Yan, F., Zhu, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Li, J., Wang, Q., & Liu, Y. (2020). De novo transcriptome sequencing and analysis of salt-, alkali-, and drought-responsive genes in *Sophora alopecuroides*. *BMC Genomics*, 21(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06823-4>
- Yang, Y. & Guo, Y. (2018a). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt stress responses. *New Phytologist*, 217, 523-539. <https://doi.org/10.1111/nph.14920>
- Yang, Y. & Guo, Y. (2018b). Unraveling salt stress signaling in plants. *Journal of Integrative and Plant Biology*, 60, 796-804. <https://doi.org/10.1111/jipb.12689>
- Yuan, L., Richardson, C. J., Ho, M., Willis, C. W., Colman, B. P., & Wiesner, M. R. (2018). Stress responses of aquatic plants to silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 52(5), 2558-2565. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05837>

- Zaid, A., Mohammad, F., & Fariduddin, Q. (2020). Plant growth regulators improve growth, photosynthesis, mineral nutrient and antioxidant system under cadmium stress in menthol mint (*Mentha arvensis* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 25-39. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.895427>
- Zhang, M., Cao, Y., Wang, Z., Wang, Z. Q., Shi, J., Liang, X., ... & Jiang, C. (2018). A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize. *New Phytologist*, 217(3), 1161-1176. <https://doi.org/10.1111/nph.14882>
- Zhang, Z., Wang, L., Lei, X., Tang, L., & Li, Y. (2021). Effects of silicon on the growth, nutrient uptake and cadmium accumulation of tomato seedlings. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9659-4>
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247-273. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329>

Investigating some biochemical parameters of Basil plant (*Ocimum basilicum*) under salinity stress in the presence of silver nanoparticles

Mohammad Sarberahneh, Rashid Jamei*

Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2024/06/16, Accepted: 2024/07/30)

Abstract

Salinity stress is one of the most important abiotic stresses in many areas of Iran, especially in the fields of medicinal plants, which has caused many problems. The basil plant is one of the important medicinal plants that is used in various industries due to its phenolic compounds. Climate change and rapid population growth seriously affect the world's agricultural food security. To deal with these threats, researchers must use new technologies. In this regard, so far, several nanoparticles, such as silver nanoparticles, have been used for seed germination, plant growth and tolerance to biological stresses in a number of agricultural plants. Based on this, the present study was conducted as a factorial in the form of a completely randomized design with two factors and three replications on basil seedlings. Experimental factors, including salinity at 0, 75, and 150 mM levels, were used as plant foot application and nanosilver at 0 and 75 ppm levels as foliar spraying. Some biochemical indicators, such as the content of total phenol, hydrogen peroxide and the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (AXP), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POX) and the enzyme phenylalanine ammonialyase (PAL), in the root and shoot, were evaluated. The obtained results showed that the simultaneous application of salt and nanosilver led to a significant increase in total phenol content in shoot and root (46.89% and 45.48% increase, respectively), increased PAL activity in shoot and root (respectively 32.51% and 41.56% increase), and also increased the activity of SOD antioxidant enzymes in shoot and root (58.97% and 43.11% increase, respectively), CAT (63.76% and 73.31%), and APX (74.18 and 31.79 percent). Also, the results showed a decrease in hydrogen peroxide content in the shoot and root compared to the control. In general, it seems that nanosilver has been able to increase the tolerance of basil plants to salt stress by reducing the content of hydrogen peroxide and increasing the activity of antioxidant enzymes and the content of phenol.

Keywords: Antioxidant, Basil, Silver nanoparticles, Salinity stress

Corresponding author, Email: r.jamei@urmia.ac.ir