

## تأثیر نانوذرات نقره و نور بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه بابونه آلمانی

مهین پوراسمعیل، یونس پوربیرامی هیر\*، اسماعیل چمنی و حسن ملکی لجبایر

گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۰۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۰۶/۱۷)

## چکیده

بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در جهان است که به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی کاربرد گسترده‌ای در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات متقابل نور (آبی، سفید، قرمز) و غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه بابونه آلمانی در شرایط کشت‌بافت انجام شد. گیاهان به مدت هفت هفته در شرایط کنترل‌شده قرار گرفتند. میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پلی‌فنول اکسیداز (PPO) و آسکوربات پراکسیداز (APX) اندازه‌گیری شد. نتایج مطالعه ما نشان داد که اثر متقابل نور و نانوذرات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار شد. بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تیمار نور آبی همراه با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره مشاهده شد. به‌طور خاص، فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و APX تحت نور آبی به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت که نشان‌دهنده تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات است. همچنین، میزان پروتئین کل در تیمار نور آبی و غلظت‌های بالای نانوذرات نقره به حداکثر مقدار خود رسید. در مقابل، نور قرمز و سفید تأثیر کم‌تری بر فعالیت آنزیم‌ها و سنتز پروتئین داشتند. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که نور آبی به‌عنوان یک محرک نوری قادر است همراه با نانوذرات نقره، سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه بابونه آلمانی را به‌طور معنی‌داری فعال کند. این یافته‌ها می‌توانند در بهینه‌سازی شرایط کشت‌بافت گیاهان دارویی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای دارویی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بابونه آلمانی، تنش اکسیداتیو، کشت‌بافت، نانوذرات نقره

## مقدمه

2022). این گیاه دارای ترکیبات بیولوژیکی فعالی همچون فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها است که اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند. با توجه به این خواص، بابونه آلمانی به یکی از منابع مهم در طب سنتی و داروسازی تبدیل شده است. افزایش تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این گیاه می‌تواند باعث بهبود خواص درمانی آن شود و از این‌رو مطالعه عوامل مؤثر در

گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) یک گونه گیاه دارویی شناخته‌شده از خانواده *Asteraceae* است که در طب سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله عفونت‌ها، بیماری‌های عصبی، تنفسی، گوارشی و کبدی کاربرد فراوانی دارد. همچنین به عنوان آرام‌بخش، ضداسپاسم، ضد عفونی‌کننده و ضد استفراغ استفاده می‌شود (El Mihaoui et al.,

تقویت این ترکیبات اهمیت دارد (Sah et al., 2022). یکی از روش‌های مؤثر برای تقویت تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان، کنترل شرایط محیطی است. در این میان، نور به‌عنوان یکی از عوامل محیطی کلیدی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان، می‌تواند تأثیر زیادی بر تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی داشته باشد. نور به‌ویژه از طریق تأثیر بر فتوسنتز و متابولیسم ثانویه گیاه، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم کند (Mohamed et al., 2021; Sutuliene et al., 2022). نور آبی، سفید و قرمز هر کدام اثرات متفاوتی بر گیاهان دارند. نور آبی با تحریک فرآیندهای فتوسنتز و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در گیاهان کمک می‌کند. نور قرمز نیز بر رشد و تولید ترکیبات ثانویه تأثیر دارد و نور سفید ترکیبی از طول‌موج‌های مختلف است که تأثیر متعادل‌تری را در گیاهان ایجاد می‌کند (Ke et al., 2024; Moradi et al., 2021).

علاوه بر نور، نانوذرات به‌ویژه نانوذرات نقره به‌عنوان یک فناوری نوین در کشاورزی و بیوتکنولوژی گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند. نانوذرات نقره به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی خود قادرند تا به‌طور مستقیم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیر بگذارند (Keshari et al., 2020). این نانوذرات می‌توانند به‌عنوان محرک‌های فیزیولوژیکی برای تقویت پاسخ‌های گیاهی به تنش‌های محیطی عمل کنند. مطالعات نشان داده‌اند که غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره ممکن است تأثیرات متفاوتی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشته باشند. در برخی موارد، غلظت‌های پایین نانوذرات نقره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها و در غلظت‌های بالا ممکن است اثرات سمی و منفی بر گیاهان داشته باشند (Iori et al., 2023; Liu et al., 2022).

سمیت نانوذرات نقره در نتیجه اثر متقابل جذب ذرات، انحلال و القای تنش اکسیداتیو است. در واقع، تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌ها با برهمکنش مستقیم با ذرات به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی شناخته شده است (Lauria et al., 2023). گونه‌های اکسیژن فعال دارای

عملکردهای سیگنالینگ و اطلاعات زیادی است. با این حال، ROS (Oxygen Reactive Species) بیش از حد می‌تواند سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را از بین ببرد و منجر به آسیب DNA، لیپیدها و پروتئین‌ها شود. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان تعدیل‌کننده‌های مهم در تنش اکسیداتیو ناشی از AgNP شناخته شده‌اند (Liu et al., 2020). دو مورد از آنها، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، برای حفظ سطح ROS در موجودات برجسته هستند و به‌عنوان شاخص‌های زیستی افزایش تولید ROS استفاده می‌شوند (Duran et al., 2016; Liu et al., 2020). سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اولین آنزیم در مقابله با رادیکال‌های سوپراکسید است که آن‌ها را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند (Fujii et al., 2022). مطالعات نشان داده است که تغییر فعالیت آنزیم ممکن است به دلیل تنظیم ژن‌ها یا برهمکنش مستقیم سطحی آنزیم‌ها با نانوذرات نقره باشد (Cameron et al., 2018).

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر نورهای مختلف (آبی، سفید و قرمز) و غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه بابونه آلمانی در شرایط کشت بافت است. هدف اصلی، ارزیابی اثرات هم‌افزایی یا تقابلی این تیمارها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پروتئین کل به‌عنوان شاخص‌های کلیدی سازگاری متابولیکی است. دستاوردهای این مطالعه می‌تواند به مدیریت تنش اکسیداتیو، بازده تولید ترکیبات دارویی را در سیستم‌های کشت بافت افزایش دهند.

### مواد و روش‌ها

**کشت بذر و آماده‌سازی نانو ذرات نقره:** بذرهای گیاه بابونه از شرکت پاکان بذر تهیه و پس از ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۱۲ دقیقه، در محیط کشت MS کشت داده شدند. بذرها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته نگهداری شدند تا دوره رشد اولیه را طی کنند. پس از این مرحله، گیاهچه‌ها برای اعمال تیمارهای مختلف آماده شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها، تیمار با

با اندکی تغییرات استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۷۵۰ میکرولیتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار) بود که به ترکیب بالا ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شده و جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه محاسبه خواهد گردید.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم پراکسیداز:** برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Chance و Maehly با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۹۵۵). مخلوط واکنش شامل ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۷۵۰ میکرولیتر گوئیکول ۱۰ میلی‌مولار، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار pH=۷ و ۷۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل است که به آن ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه گردید. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در مدت زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز به صورت هر میکرومول H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تجزیه‌شده میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه گزارش شد.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:** برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano و Asada با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۹۸۷). مخلوط واکنش حاوی ۲۵۰۰ میکرولیتر آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ۵۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۲ میلی‌مولار محلول در آب دوبار تقطیر بود که ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه شده و میزان فعالیت آنزیم آسکوربیت پراکسیداز در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم به صورت میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه گزارش شد.

**سنجش فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز:** برای اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase)، ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج

غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد (Khan et al., 2023). نانوذرات نقره مورد استفاده در این پژوهش از نانوذرات نقره با اندازه ۲۰ نانومتر و CAS No:7440-50-8 استفاده شد جهت جلوگیری از تجمع نانوذرات و تضمین پراکندگی یکنواخت، ذرات در آب دوبار تقطیرشده به کمک هموژنایزر اولتراسونیک به مدت ۲۰ دقیقه پراکنده شدند، سپس محلول‌های نانوذرات با غلظت‌های مشخص تهیه و بلافاصله برای تیمار گیاهچه‌ها استفاده شدند. گیاهچه‌ها به مدت هفت هفته تحت تیمار نوری با شدت ۴۰۰۰ لوکس در نور سفید، قرمز و آبی قرار گرفتند و پس از پایان این دوره، شاخص‌های مورد نظر اندازه‌گیری شدند. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل انجام گرفت تا اثرات مجزا و تعامل بین غلظت نانوذرات و نوع نور به‌طور دقیق بررسی شود.

**استخراج عصاره آنزیمی:** ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگ را در ازت مایع کاملاً خرد می‌نماییم، سپس ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل ۰/۶۰۷ گرم تریس را با ۰/۰۵ گرم PVP (پلی‌وینیل پیرولیدون) است که باید pH آن روی ۸ تنظیم شود) اضافه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فاز بالایی جهت قرائت میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌ها جدا شد.

**سنجش پروتئین محلول کل:** در این مطالعه تعیین غلظت پروتئین به کمک روش برادفورد انجام شد (Bradford, 1976). جهت اندازه‌گیری میزان غلظت پروتئین نمونه‌های گیاهی با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) منحنی استاندارد رسم گردید. سپس، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های عصاره آنزیمی با ۱ میلی‌لیتر معرف بردفورد ۲۰٪ (v/v) مخلوط شد و بعد از پنج دقیقه میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد برحسب (μg/ml) محاسبه گردید.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت کمی آنزیم کاتالاز:** برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi (۱۹۸۴)

نانوذرات نقره در سطح احتمال ۵ درصد در تمامی شاخص‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱).

نتایج مطالعات ما نشان داد که محتوای پروتئین کل در تیمار نور آبی با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر (L1C5) بیشترین مقدار بود میزان پروتئین در تیمار نور قرمز زمانی که از نانو ذرات نقره استفاده نشده بود (L2C1) کمترین مقدار بود (شکل ۱a). ترکیب نور آبی با غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر AgNPs بیشترین تأثیر را بر فعالیت آنزیم‌ها داشت. این احتمال وجود دارد که نانوذرات نقره با القای تنش اکسیداتیو، تولید ROS را افزایش می‌دهد و در نتیجه سیستم دفاعی گیاه را برای سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحریک کند.

در خصوص فعالیت آنزیم کاتالاز تمام اثرات اصلی (نور و نانوذرات) و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار نور آبی با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر AgNPs مشاهده شد (L1C5)، در حالیکه کمترین فعالیت مربوط به تیمار نور قرمز بدون استفاده از نانوذرات نقره (L2C1) بود. این نتایج نشان می‌دهد که نور آبی، به‌ویژه در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین اثر تحریک‌کننده را بر افزایش فعالیت کاتالاز دارد، درحالی‌که نور قرمز حتی در غلظت‌های بالا تأثیر کمتری نسبت به نور آبی داشته است. افزایش فعالیت کاتالاز تحت نور آبی ممکن است ناشی از تحریک سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و اثر سینرژیک نانوذرات نقره باشد (شکل ۱b).

نتایج تجزیه واریانس در مورد فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که تمام اثرات اصلی (نور و نانوذرات) و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بنابراین پاسخ آنزیم به نانوذرات نقره به نور وابسته است. بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار نور آبی با ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر (L1C5) بود که به طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود (شکل ۱c). کمترین فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز زمانی مشاهده شد که از نور قرمز و بدون نانو ذرات نقره استفاده شده بود. به‌طورکلی افزایش غلظت نانوذرات در تمام نورها فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش می‌دهد، اما این

به کمک محلول استخراج به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر رسانده و به ۴ میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز که شامل ۵۰ میلی‌مول بافر فسفات پتاسیم  $\text{pH}=7/8$ ، ۷۵ میکرومولار NBT، ۱۳ میلی‌مولار ال-متیونین، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۲ میکرومولار ریوفلاوین است، مخلوط شد. سپس میزان جذب نوری آن را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده و فعالیت آنزیم براساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه محاسبه شد (Beauchamp and Fridovich, 1971).

**سنجش آنزیم پلی‌فنول اکسیداز:** برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز محلول واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار،  $\text{pH}=7$ ) و ۰/۳ میلی‌لیتر پیروگال (۵ میلی‌مولار) تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه نموده و سپس محلول حاصل در حمام بن‌ماری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه محاسبه گردید (Kar and Mishra, 1976).

داده‌ها براساس طرح فاکتوریل بررسی شدند. محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل واریانس و آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 انجام شد. علاوه بر آن مقایسه میانگین بین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

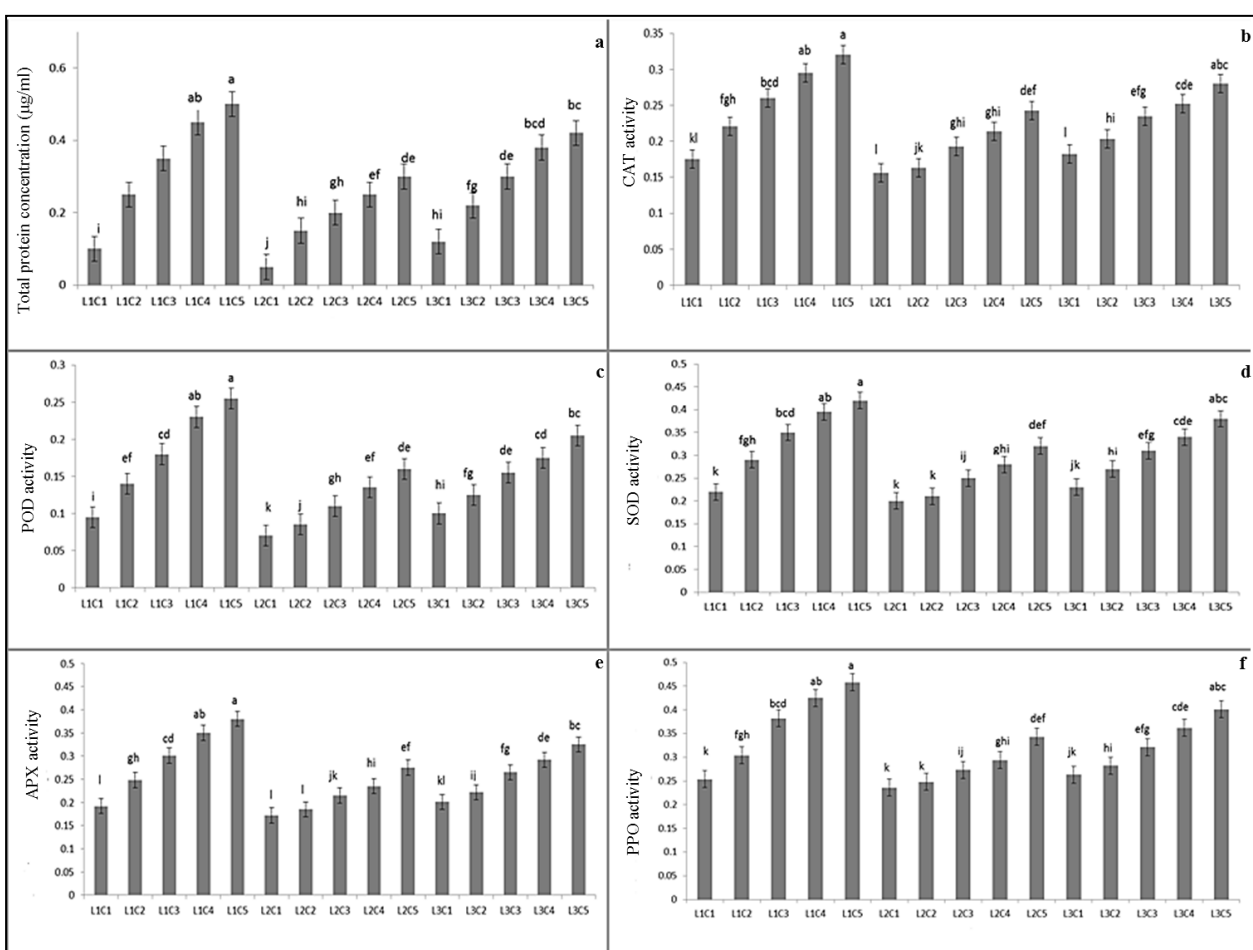
## نتایج و بحث

در این مطالعه، تأثیر متقابل نورهای آبی (L1)، قرمز (L2) و سفید (L3) با نانوذرات نقره (AgNPs) در غلظت‌های (C1) صفر، ۱۰ (C2)، ۲۰ (C3)، ۳۰ (C4) و ۴۰ (C5) میلی‌گرم بر لیتر بر شاخص‌های بیوشیمیایی (CAT, POD, APX, SOD, ) در شرایط کشت‌بافت بررسی شد. این مطالعه در قالب طرح فاکتوریل انجام و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل بین نور و

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر AgNPs و نور بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
پلی فنول اکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز	آنزیم پراکسیداز	آنزیم کاتالاز	پروتئین		
۰/۰۱۶**	۰/۰۱۸۴**	۰/۰۱۴۵**	۰/۰۱۲۲۵**	۰/۰۰۹**	۰/۰۰۱۲۵**	۲	نور
۰/۰۵۶**	۰/۰۵۳۶**	۰/۰۵۱۲**	۰/۰۴۶۸۰**	۰/۰۳۱**	۰/۰۱۱۲۵**	۴	نانو ذرات نقره
۰/۰۰۲۵**	۰/۰۰۲۸**	۰/۰۰۲۲۵**	۰/۰۰۱۹۵**	۰/۰۰۱۵**	۰/۰۰۰۲۰*	۸	نور × نانوذرات نقره
۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۴۹	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۵	۳۰	اشتباه آزمایشی

ns, \* و \*\* به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار



شکل ۱- تأثیر تیماردهی مختلف بر میزان (a) پروتئین، (b) آنزیم کاتالاز، (c) پراکسیداز، (d) آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، (e) آنزیم آسکوربات پراکسیداز، (f) آنزیم پلی فنول اکسیداز.

نتایج مطالعه ما در مورد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نشان داد که اثرات اصلی نور و نانو ذرات و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود

افزایش تحت نور آبی بسیار چشمگیرتر است. نور قرمز حتی در غلظت‌های بالا نانوذره (۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) نسبت به نور آبی عملکرد ضعیف‌تری دارد.

کشت بافت بابونه آلمانی دارد، اگر چه بررسی اثرات دقیق آن نیازمند مطالعات بیشتر است.

تأثیر نور و نانوذرات نقره بر رشد و متابولیسم گیاهان از جنبه‌های مهم پژوهشی در کشاورزی مدرن محسوب می‌شود. نور آبی، سفید و قرمز هرکدام با تأثیر بر فرآیندهای فتوسنتزی و تنظیم هورمونی، می‌توانند رشد گیاه را به‌طور متفاوتی تعدیل کنند (d'Aquino *et al.*, 2023; Khan *et al.*, 2023). نور آبی از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های نوری مانند کریپتوکروم‌ها (CRY1/2) و فوتوتروپین‌ها (PHOT1/2)، مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تنش اکسیداتیو و متابولیسم ثانویه را تنظیم می‌کند (Son and Oh, 2015). از سوی دیگر، نانوذرات نقره با خاصیت ضد میکروبی و تعدیل تنش اکسیداتیو، پتانسیل بهبود مقاومت و عملکرد گیاه را دارند (Alfosea-Simon *et al.*, 2025). بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه، نشان‌دهنده پاسخ‌های سازگاری گیاه به این تنش‌ها است که می‌تواند برای بهینه‌سازی شرایط کشت بابونه در محیط‌های کنترل‌شده مفید باشد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که تیمار ترکیبی نور آبی و نانوذرات نقره در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای پروتئین کل در گیاه بابونه آلمانی شد. این نتایج با مطالعات قبلی که تأثیر مثبت نور آبی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان دارویی را گزارش کرده‌اند، همسو است (Manivannan *et al.*, 2015). در این مطالعه، نور قرمز کمترین تأثیر را بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی حتی در حضور نانوذرات نقره داشت، این نتایج با برخی پژوهش‌های قبلی که نشان داده‌اند نور قرمز عمدتاً بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارد، مطابقت دارد (Jin *et al.*, 2023).

نور آبی با اتصال به گیرنده‌های CRY1/2، فعالیت آنزیم‌های NADPH اکسیداز را افزایش داده و منجر به تولید  $H_2O_2$  و سوپراکسید ( $O_2^-$ ) می‌شود. این ROSها به عنوان مولکول‌های سیگنالینگ ثانویه عمل کرده و مسیر MAPK (مانند MAPK3/6) را فعال می‌کنند (He *et al.*, 2019;

جدول ۱). بالاترین فعالیت SOD در تیمار نور آبی با غلظت ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر AgNPs مشاهده شد (L1C4 و L1C5) بیشترین فعالیت SOD را نشان دادند. نور آبی در تمام غلظت‌ها عملکرد بهتری نسبت به نورهای دیگر داشت. نور سفید در غلظت‌های بالا (۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم) به نور آبی نزدیک شد. نور قرمز ضعیف‌ترین عملکرد را داشت (شکل ۱d).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) تحت تأثیر معنی‌دار هر دو فاکتور نور و غلظت نانوذرات قرار گرفت. اثر متقابل نور و غلظت نیز معنی‌دار است (جدول ۱). بیشترین فعالیت APX در تیمار نور آبی با ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات (L1C4) قرار گرفت. در تمام تیمارهای نوری، با افزایش غلظت نانوذرات، فعالیت APX افزایش یافت. این افزایش در نور آبی چشم‌گیرتر بود. نور آبی ممکن است از طریق تحریک مسیرهای سیگنالینگ وابسته به ROS باعث افزایش فعالیت APX شده باشد. نانوذرات نقره احتمالاً با القای استرس اکسیداتیو، سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه را فعال کرده‌اند. سینترژیسم بین نور آبی و نانوذرات در افزایش فعالیت آنزیم مشهود است (شکل ۱e).

فعالیت آنزیم پلی‌فنول اکسیداز (PPO) تحت تأثیر معنی‌دار نور و غلظت نانوذرات قرار گرفت. اثر متقابل بین نور و غلظت نیز معنی‌دار بود (جدول ۱). نور آبی با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین مقدار را داشت (L1C5). فعالیت آنزیم PPO با افزایش غلظت نانوذرات به طور معنی‌داری افزایش یافت. نور آبی در تمام غلظت‌ها باعث افزایش فعالیت آنزیم PPO شد. نور آبی ممکن است با تحریک مسیرهای بیوسنتز ترکیبات فنولی و سینترژیستی با نانوذرات نقره، فعالیت آنزیم PPO را افزایش دهد (شکل ۱f). نانو ذرات نقره نیز ممکن است به عنوان کوفاکتور در واکنش‌های اکسیداسیون ترکیبات فنولی عمل کند.

این نتایج به طور جامع نشان می‌دهد که ترکیب نور آبی و نانوذرات نقره (۳۰-۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) به عنوان یک استراتژی نوین، پتانسیل قابل توجهی در بهبود رشد و عملکرد

نشان می‌دهد می‌توان با مدیریت همزمان این دو فاکتور، بهینه‌ترین شرایط را برای تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت‌بافت بایونه آلمانی فراهم کرد.

### نتیجه‌گیری

این مطالعه به بررسی تأثیر نورهای مختلف و غلظت‌های متفاوت نانوذرات نقره بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه بایونه آلمانی پرداخت. این مطالعه نشان داد که ترکیب نور آبی با نانوذرات نقره (۳۰-۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور معناداری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، اکسیداز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پلی‌فنول اکسیداز) و محتوای پروتئین کل را در گیاه بایونه آلمانی تحت شرایط کشت‌بافت افزایش می‌دهد. اثرات متقابل نور و نانوذرات در سطح ۱٪ معنادار بود ( $P < 0.01$ )، که نشانگر وابستگی پاسخ بیوشیمیایی گیاه به کیفیت نور و غلظت نانوذرات است. بیشترین فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین در تیمار نور آبی با ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات مشاهده شد، در حالیکه نور قرمز کمترین تأثیر را داشت. این نتایج بیانگر آن است که نور آبی با تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و سنتز ترکیبات فنولی، سازگاری گیاه به تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات را بهبود می‌بخشد. بهینه‌سازی همزمان نور و نانوذرات می‌تواند به عنوان یک راهبرد نوین در کشت‌بافت گیاهان دارویی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند به کار رود. پژوهش‌های آینده باید مکانیسم‌های مولکولی این تعاملات و پایداری طولانی‌مدت نانوذرات را بررسی کنند.

(Nauseef, 2014). مطالعات نشان می‌دهند که افزایش ROS تحت نور آبی، بیان ژن‌های SOD، APX و CAT را افزایش می‌دهد (Pech et al., 2024)، که با یافته‌های این پژوهش (افزایش فعالیت آنزیم‌ها تحت نور آبی با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره) همخوانی دارد.

مکانیسم احتمالی این اثر را می‌توان به چند عامل نسبت داد: نور آبی با فعال‌سازی گیرنده‌های کریپتوکروم و فوتوتروپین‌ها منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه القای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Consentino et al., 2015; Manivannan et al., 2015). این یافته با نتایج مطالعه که افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را تحت نور آبی گزارش کرده بود، مطابقت دارد (Rossa et al., 2002). نانوذرات نقره در غلظت‌های بهینه (۳۰-۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) با عمل به عنوان یک عامل استرس ملایم، بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهند (Do et al., 2024). این اثر سینرژیک در مطالعه حاضر به وضوح در تیمارهای ترکیبی مشاهده شد.

نتایج ما نشان داد که فعالیت پلی‌فنول اکسیداز تحت تأثیر نور آبی به طور معنی‌داری افزایش یافت. این یافته با گزارش‌هایی که افزایش محتوای فنلی را در گیاهان تحت نور آبی نشان داده بودند، همخوانی دارد (Son and Oh, 2015). افزایش معنی‌دار پروتئین کل در تیمارهای ترکیبی می‌تواند ناشی از تحریک سنتز پروتئین‌های دفاعی و آنزیمی تحت تأثیر نور آبی و نانوذرات باشد. نکته قابل توجه در این پژوهش، اثر متقابل معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بین فاکتورهای نور و نانوذرات بود که نشان می‌دهد پاسخ گیاه به نانوذرات تحت تأثیر کیفیت نور قرار دارد. این یافته از نظر عملی حائز اهمیت است، چرا که

### منابع

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *In Methods in enzymology*, 105, 121-126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Alfosea-Simon, F. J., Burgos, L., & Alburquerque, N. (2025). Silver nanoparticles help plants grow, alleviate stresses, and fight against pathogens. *Plants*, 14(3), 428. DOI: 10.3390/plants14030428
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Cameron, S. J., Hosseinian, F., & Willmore, W. G. (2018). A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2030. DOI: 10.3390/ijms19072030
- Chance, B., & Maehly, A. (1955). Assay of Catalases and Peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 357-424. DOI: 10.1002/9780470110171.ch14
- Consentino, L., Lambert, S., Martino, C., Jourdan, N., Bouchet, P. E., Witzak, J., & d'Harlingue, A. (2015). Blue-light dependent reactive oxygen species formation by Arabidopsis cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytologist*, 206(4), 1450-1462. DOI: 10.1111/nph.13341
- d'Aquino, L., Cozzolino, R., Nardone, G., Borelli, G., Gambale, E., Sighicelli, M., & Chianese, E. (2023). Effects of white and blue-red light on growth and metabolism of basil grown under microcosm conditions. *Plants*, 12(7), 1450. DOI: 10.3390/plants12071450
- Do, T., Vaculciakova, S., Kluska, K., Peris-Diaz, M. D., Priborsky, J., Guran, R., & Zitka, O. (2024). Antioxidant-related enzymes and peptides as biomarkers of metallic nanoparticles (eco) toxicity in the aquatic environment. *Chemosphere*, 364, 142988. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2024.142988
- Duran, N., Duran, M., De Jesus, M. B., Seabra, A. B., Favaro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 789-799. DOI: 10.1016/j.nano.2015.11.016
- El Mihyaoui, A., Esteves da Silva, J. C., Charfi, S., Candela Castillo, M. E., Lamarti, A., & Arnao, M. B. (2022). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): A review of ethnomedicinal use, phytochemistry and pharmacological uses. *Life*, 12(4), 479.
- Fujii, J., Homma, T., & Osaki, T. (2022). Superoxide radicals in the execution of cell death. *Antioxidants*, 11(3), 501. DOI: 10.3390/antiox11030479
- He, G., Liu, J., Dong, H., & Sun, J. (2019). The blue-light receptor CRY1 interacts with BZR1 and BIN2 to modulate the phosphorylation and nuclear function of BZR1 in repressing BR signaling in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 12(5), 689-703. DOI: 10.1016/j.molp.2019.02.001
- Iori, V., Muzzini, V. G., Venditti, I., Casentini, B., & Iannelli, M. A. (2023). Phytotoxic impact of bifunctionalized silver nanoparticles (AgNPs-Cit-L-Cys) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) on chronically exposed callus cultures of *Populus nigra* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(54), 116175-116185. DOI: 10.1007/s11356-023-30690-7
- Jin, D., Su, X., Li, Y., Shi, M., Yang, B., Wan, W., & Zou, J. (2023). Effect of red and blue light on cucumber seedlings grown in a plant factory. *Horticulturae*, 9(2), 124.
- Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57(2), 315-319. DOI: 10.1104/pp.57.2.315
- Ke, X., Yoshida, H., Hikosaka, S., & Goto, E. (2024). Effect of red and blue light versus white light on fruit biomass radiation-use efficiency in dwarf tomatoes. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1393918. DOI: 10.3389/fpls.2024.1393918
- Keshari, A. K., Srivastava, R., Singh, P., Yadav, V. B., & Nath, G. (2020). Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cestrum nocturnum*. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 11(1), 37-44. DOI: 10.1016/j.jaim.2017.11.003
- Khan, S., Zahoor, M., Khan, R. S., Ikram, M., & Islam, N. U. (2023). The impact of silver nanoparticles on the growth of plants: The agriculture applications. *Heliyon*, 9(6). DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e16928
- Lauria, G., Piccolo, E. L., Ceccanti, C., Paoli, L., Giordani, T., Guidi, L., & Pellegrini, E. (2023). Supplemental red light more than other wavebands activates antioxidant defenses in greenhouse-cultivated *Fragaria × ananassa* var. Elsanta plants. *Scientia Horticulturae*, 321, 112319. DOI: 10.1016/j.scienta.2023.112319
- Liu, W., Worms, I., & Slaveykova, V. I. (2020). Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes. *Environmental Science: Nano*, 7(5), 1507-1517. DOI: 10.1039/C9EN01284B
- Liu, Y., Schouten, R. E., Tikunov, Y., Liu, X., Visser, R. G., Tan, F., & Marcelis, L. F. (2022). Blue light increases anthocyanin content and delays fruit ripening in purple pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 192, 112024. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2022.112024
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Halimah, N., Ko, C. H., & Jeong, B. R. (2015). Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56, 105-113. DOI: 10.1007/s13580-015-0114-1
- Mohamed, S. J., Rihan, H. Z., Aljafer, N., & Fuller, M. P. (2021). The impact of light spectrum and intensity on the growth, physiology, and antioxidant activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plants*, 10(10), 2162. DOI: 10.3390/plants10102162
- Moradi, S., Kafi, M., Aliniaiefard, S., Salami, S. A., Shokrpour, M., Pedersen, C., & Kalaji, H. M. (2021). Blue light improves photosynthetic performance and biomass partitioning toward harvestable organs in saffron (*Crocus sativus* L.). *Cells*, 10(8), 1994. DOI: 10.3390/cells10081994
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in

- ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1), 131-140.
- Nauseef, W. M. (2014). Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 757-767. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.04.040
- Pech, R., Volna, A., Spunda, V., & Nezval, J. (2024). Blue light as an important factor increasing plant tolerance to acute photooxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*, 226, 105923. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2024.105923
- Rossa, M. M., de Oliveira, M. C., Okamoto, O. K., Lopes, P. F., & Colepicolo, P. (2002). Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 14, 151-157. DOI: 10.1023/A:1019985722808
- Sah, A., Naseef, P. P., Kurunian, M. S., Jain, G. K., Zakir, F., & Aggarwal, G. (2022). A comprehensive study of therapeutic applications of chamomile. *Pharmaceuticals*, 15, 1284. DOI:10.3390/ph15101284
- Son, K. H., & Oh, M. M. (2015). Growth, photosynthetic and antioxidant parameters of two lettuce cultivars as affected by red, green, and blue light-emitting diodes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56, 639-653. DOI: 10.1007/s13580-015-1064-3
- Sutuliene, R., Lauzikié, K., Pukas, T., & Samuoliene, G. (2022). Effect of light intensity on the growth and antioxidant activity of sweet basil and lettuce. *Plants*, 11(13), 1709. DOI: 10.3390/plants11131709

## The effect of AgNPs and light on the activity antioxidant enzymes in *Matricaria chamomilla*

Mahin Pouresmaeil, Younes Pourbeyrami- e- Hir \*, Esmail Chamani and Hassan Maleki Lajayer

Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department of Horticulture Science and Landscape Engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Received: 2025/04/27, Accepted: 2025/09/08)

### Abstract

*Matricaria chamomilla* is one of the most important medicinal plants in the world, which has been widely used in the pharmaceutical, food, and cosmetic-health industries due to its bioactive compounds. This study aimed to investigate the interaction effects of light (blue, white, red) and different concentrations of silver nanoparticles (0, 10, 20, 30, 40 mg/L) on the activity of antioxidant enzymes in *M. chamomilla* under tissue culture conditions. The plants were kept in controlled conditions for seven weeks. The amount of total protein and the activity of antioxidant enzymes, including catalase (CAT), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), polyphenol oxidase (PPO), and ascorbate peroxidase (APX), were measured. The results of our study showed that the interaction effect of light and nanoparticles on the activity of antioxidant enzymes was significant. The highest activity of antioxidant enzymes was observed in the blue light treatment combined with a concentration of 40 mg/L of silver nanoparticles. In particular, the activities of SOD, CAT, and APX enzymes increased significantly under blue light, indicating the stimulation of the plant's antioxidant defense system in response to the oxidative stress caused by nanoparticles. Also, the total protein content reached its maximum value under blue light treatment and high concentrations of silver nanoparticles. In contrast, red and white light had a lesser effect on enzyme activity and protein synthesis. The findings of this study indicate that blue light as a photostimulator can significantly activate the antioxidant system of *M. chamomilla* together with silver nanoparticles. These findings can be used to optimize the tissue culture conditions of medicinal plants and increase the production of secondary metabolites with medicinal applications.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, *Matricaria chamomilla*, Oxidative stress, Tissue culture, Silver nanoparticles

Corresponding author, Email: Younes\_ph62@uma.ac.ir