

تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر رشد، شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه

آسیه شاه ولی بر و صدیقه اسمعیل زاده بهابادی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۱/۰۴)

چکیده:

استفاده از نانوذرات زیستی نقش مهمی در افزایش بهره‌وری کشاورزی ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات در گیاهان به عنوان آفت‌کش‌ها، عوامل حفاظتی و مواد مغذی مورد توجه قرار گرفته است. بادرنجبویه گیاه دارویی از خانواده نعنائیان است که دارای خواص دارویی ضد باکتریایی، ضد سرطانی و ضد ویروسی است. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه بادرنجبویه، در سال ۱۳۹۵ در شرایط کشت گلدانی در دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با اعمال تیمار نانوذرات نقره در چهار غلظت (۱۰۰، ۶۰، ۲۰، ۰) انجام شد. نتایج نشان داد شاخص‌های مختلف رشد از جمله وزن تر ریشه و ساقه، طول ریشه و ساقه و میزان پروتئین به طور معنی‌داری تحت تاثیر نانوذرات نقره افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان این شاخص‌ها در غلظت ۶۰ ppm نانوذرات نقره و در روز ۱۵ که تحت تاثیر نانوذرات نقره بودند مشاهده شد. همچنین میزان پرولین و کربوهیدرات تحت تاثیر غلظت‌های نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد که بیشترین افزایش تحت تاثیر غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات نقره و در روز ۱۵ که تحت تاثیر نانوذرات نقره بودند مشاهده شد. میزان متابولیت‌های ثانوی از جمله فنل و فلاونوئید تحت تاثیر نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات نقره و پس از گذشت ۲۰ روز که تحت تاثیر نانوذرات نقره بودند مشاهده شده که با بیشترین افزایش همراه بوده است. حداکثر افزایش میزان آنتوسیانین تحت تاثیر غلظت ۶۰ ppm نانوذرات نقره و با گذشت ۱۵ روز که تحت تیمار نانوذرات نقره بود است. نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد، در تمام غلظت‌های نانوذرات نقره، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته که وابسته به زمان بوده است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) تحت تاثیر نانوذرات نقره منجر به کاهش فعالیت محتوای مالون دی‌آلدنید (MDA) شد. براساس نتایج این تحقیق، نانوذرات نقره به عنوان محرکی مناسب جهت افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: شاخص‌های فیزیولوژیکی، گیاه بادرنجبویه، متابولیت‌های ثانوی، نانوذرات نقره

مقدمه:

مقیاس ۱-۱۰۰ نانومتر است (Dudo et al., 2011, Khot et al.,)

فناوری نانو علمی در مورد دستکاری و مهندسی مواد در (2012). نانوذرات نقره (AgNPs) معمولاً شامل ۱۵۰۰۰-۲۰ اتم

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

وزن، ترکیب شیمیایی، تغییرات سطح، واکنش پذیری (Khodakovskaya *et al.*, 2012) و غلظت نانوذرات بستگی دارد و از یک گیاه به گیاه دیگر متفاوت است. به طور کلی مطالعات محدودی در زمینه اثر نانوذرات بر گیاهان دارویی و به ویژه نانوذرات سنتز شده به روش زیستی وجود دارد. Gruyer و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات نقره می‌تواند اثر مثبت یا منفی روی افزایش طول ریشه داشته باشد، آنها گزارش دادند که طول ریشه در جو افزایش یافته، اما در کاهو مهار شده است. به طور مثال اثر مخلوط نانوذرات تیتانیم و سلیسیم بر روی گیاهچه سویا سنجیده شده محققین گزارش کردند که نانوذرات جوانه زنی، رشد در گیاهچه سویا افزایش داده‌اند (lu *et al.*, 2002). در پژوهشی دیگر Homae و Ehsanpor بر گیاه سیب زمینی تحت تنش نانوذرات نقره میزان کلروفیل به طور قابل توجهی در غلظت‌های پایین افزایش و در سطوح بالاتر کاهش داشته است (Homae and Ehsanpour, 2015). نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر اثر مثبت بر کلروفیل a و محتویات کلروفیل کل در گیاهچه خردل (*Brassica juncea*) داشته که با ۲۵ و ۴۰ درصد افزایش همراه بوده است. گزارش شده است، گیاه نخود تحت تاثیر نانوذرات TiO₂ در شرایط کشت درون شیشه‌ای میزان متابولیت‌های ثانوی در آن افزایش پیدا کرده است (AL-Oubaidi and Kasid, 2015). اثر نانوذرات نقره بر میزان کربوهیدرات در دو گیاه لوبیا و ذرت مورد آزمایش قرار گرفته است که نتایج آن نشان داده که تا غلظت ۶۰ ppm نانوذرات نقره مقدار کربوهیدرات در هر دو گیاه افزایش داشته اما در غلظت‌های بالاتر روند کاهش داشته است (Salama, 2012).

بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*) یک گیاه چند ساله معطر متعلق به خانواده نعناعیان بومی مدیترانه (Small, 2006) و به طور گسترده‌ای در مناطق اروپای مرکزی و جنوبی و آسیا رشد می‌کند (Zargari, 1990). در ایران برای درمان سردرد، سوء هاضمه، کولیک، تهوع، کم‌خونی، سرگیجه، ضعف، آسم، برونشیت، آمنوره، نارسایی قلبی، آریتمی قلبی، بی‌خوابی، صرع، افسردگی، هیستری، زخم استفاده می‌شود (Anon,

نقره هستند (Chen and Schluesener, 2008). به علت اندازه کوچک نانوذرات و سطح تماس بیشتری که دارند، میزان چسبندگی به سطح سلولی افزایش می‌یابد که منجر به افزایش کارایی آنها می‌شود (Shah and Belozero, 2009). کاهش اندازه مواد در حد نانومتر به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم باعث تغییر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها شده، به گونه‌ای که ویژگی‌های مواد در ابعاد نانومتری با خصوصیات آنها در ابعاد بزرگتر از نانومتر بسیار متفاوت خواهد بود (Cho *et al.*, 2005). نانوذرات نقره کاربردهای مختلفی در صنعت‌های مانند الکترونیک، علوم زیست پزشکی، صنعت داروسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی، تصفیه آب و سیستم‌های کاتالیزوری دارد (Albrecht *et al.*, 2006).

نانوذرات نقره به دلیل اهمیت‌های زیستی و کاربردهای پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و با استفاده از روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی یا زیستی سنتز می‌شوند. نانوذرات نقره حاصل از روش‌های شیمیایی که امروزه به کار برده می‌شوند، به دلیل استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و سمی بودن و آسیب‌های زیست‌محیطی حاصل از آنها، نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده‌اند. روش‌های شیمیایی تهیه این نانوذرات منجر به باقی‌ماندن مقداری از واکنشگرهای سمی و استفاده نکردن از نانوذرات حاصل در کاربردهای زیستی می‌شود. امروزه گیاهان و محصولات کشاورزی به‌عنوان منابع تجدیدپذیر و ارزان در جهت تهیه نانومواد زیستی مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند. در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی، در سنتز زیستی نانوذرات از فشار، دما، انرژی بالا و مواد شیمیایی سمی استفاده نمی‌شود و مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست است (Velayutham *et al.*, 2013).

فناوری نانو تقریباً در تمام زمینه‌های علمی کاربرد دارد. از نانوذرات برای رشد گیاهان و کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شود (Park *et al.*, 2006). نانوذرات اثرات مثبت و منفی بر عملکردهای مختلف گیاهان دارند (Rico *et al.*, 2011). اثر نانوذرات روی عملکرد هر سیستم زیستی، از جمله گیاهان در درجه اول به خواص فیزیکی نانوذرات، مانند اندازه، شکل،

تنک کردن گلدان‌ها انجام شد و برای هر تیمار در هر گلدان ۴ گیاه گذاشته شد و سایر گیاهان حذف شد.

بیوسنتز نانوذرات نقره و مشخصه‌های نانوذرات نقره:

نانوذرات نقره از نیترات نقره با استفاده از عصاره میوه جغجغه (*Prosopis farcta*) سنتز شد. بدین منظور ابتدا عصاره آبی میوه گیاه جغجغه تهیه شد. برای سنتز نانو ذرات نقره بعد از اضافه کردن محلول نیترات نقره ۰/۰۱ مولار به عصاره آبی میوه جغجغه، ظرف مخلوط عصاره و محلول نیترات نقره در دمای اتاق و در مکان تاریک قرار گرفت تا واکنش تبدیل Ag^+ به Ag^0 صورت گیرد. سپس برای به دست آوردن نانو ذرات نقره تولید شده، محلول حاوی نانو ذرات نقره با سانتیفریوژ ۴۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید. محلول بالای لوله را بیرون ریخته و نانو ذرات نقره که در ته لوله جمع شده‌اند را با آب مقطر دو بار تقطیر شده هم زده و دوباره سانتیفریوژ شد، این عمل ۳ بار تکرار می‌گردد تا درجه خلوص نانو ذرات نقره به دست آمده افزایش یابد. بیوسنتز نانوذرات نقره توسط اسپکتروسکوپی مرئی-فرابنفش، پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) شناسایی و تایید شد (سالاری، ۱۳۹۵).

اعمال تیمار: نانوذرات نقره سنتز شده، در چهار غلظت

(۱۰۰ ppm، ۶۰، ۲۰، ۰) در مرحله ۸ برگی گیاه (۳ ماه بعد از کشت) به صورت اسپری برگی اعمال شد. انتخاب غلظت‌های ذکر شده بر اساس محدوده غلظت نانوذرات استفاده شده در گیاهان دارویی دیگر و به ویژه خانواده نعناعیان انتخاب گردید. در ادامه، گیاهان در روزهای مختلف بعد از اعمال تیمار (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز) برداشت شدند.

اندازه‌گیری طول ریشه و ساقه: پس از هر مرحله برداشت

نمونه‌های شاهد و تیمار طول ریشه از ناحیه‌ی یقه تا نوک ریشه و طول ساقه از ناحیه‌ی یقه تا نوک جوانه انتهایی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری قطر ساقه: پس از هر مرحله برداشت ساقه

گیاهان مربوط به هر گلدان از نمونه‌های شاهد و تیمار با کولیس اندازه‌گیری شد.

مهم‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بادرنجبویه شامل سیترونال (۱۰ تا ۵۰ درصد) تشکیل می‌دهد. از ترکیبات دیگر شامل اسانس (میانگین ۰/۱ درصد با سیترال-ژرانیل و نرال، لینالول، اوژنول، سیترونال، ژرانیل) تانن، ماده تلخ، رزین، پلی فنل‌ها، فلاونوئید، سوکسینیک اسید و رزمارینک اسید است (Awad et al., 2009). اسانس آن دارای خواص ضد میکروبی، ضدباکتری، ضد ویروسی است. گیاه بادرنجبویه به دلیل تولید متابولیت‌های ثانوی و اهمیت بسیاری که در مصارف پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و نیز صنایع غذایی دارد، بسیار مورد توجه است. کاربرد این گیاه دارویی در تولید مواد آرایشی، بهداشتی و غذایی در جهان گسترش یافته است، بنابراین بهبود کمیت و کیفیت ویژگی‌های گیاهی مواد موثره مهم موجود، امری ضروری است. جستجو در منابع نشان می‌دهد تا کنون گزارشی مبنی بر اثرات نانوذرات بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه وجود ندارد. لذا هدف از تحقیق تحقیق حاضر بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی بر شاخص‌های رشد، میزان متابولیت‌های ثانوی، پرولین، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گیاه بادرنجبویه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مراحل کاشتن گیاه: این پژوهش در ر سال ۱۳۹۵ در شرایط کشت گلدانی در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه زابل اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با اعمال تیمار نانوذرات نقره در چهار غلظت (۱۰۰ ppm، ۶۰، ۲۰، ۰) انجام شد. گلدان‌ها با مخلوطی ۳:۱ با پرلیت و ماسه اتوکلاوه شده پر شد و در هر گلدان ۱۲ بذر (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) در عمق ۱ سانتی متری کاشته شد. گلدان‌ها در اتاقک رشد (ژرمیناتور) با دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد، ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی و با رطوبت ۸۰-۷۰ درصد قرار داده شد. از مرحله دو برگی با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند. قبل از اعمال تیمار نانوذرات نقره، عمل

شده در بالا بود اما به جای عصاره، همان حجم متانول ۸۰٪ به آن اضافه شده بود. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Chang et al., 2002).

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین: برای اندازه‌گیری آنتوسیانین از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد ۰/۱ گرم از وزن‌تر برگ به همراه ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و ۱ درصد اسید کلریدریک) ساییده شد. سپس عصاره‌ی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ (Eppendorf 5810R) شده و فاز بالای آن به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای آزمایشگاه نگهداری شد بعد از ۲۴ ساعت جذب هریک از نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه توسط اسپکتروفتومتر (مدل Jenway 6405) خوانده شد برای محاسبه‌ی غلظت آنتوسیانین از ضرب خاموشی ($m M^{-1}cm^{-1}$) استفاده شد. (۳۳۰۰۰^۱)

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات: میزان کربوهیدرات به روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) سنجیده شد مقدار ۰/۵ گرم وزن‌تر گیاه از هر تیمار توزین شد و در داخل ۵ میلی لیتر آب مقطر به وسیله هاون خوب له گردید سپس با تنظیم صاف شد و از عصاره گیاهی حاصل ۲ میلی لیتر برداشته شد و به داخل یک لوله آزمایش منتقل گردید، روی آن ۱ میلی لیتر فنل ۵٪ (v/w) ریخته شد و به آن ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک اضافه شد و کاملاً مخلوط شد در نهایت به هرکدام از لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به حال خود رها شدند تا رنگ ظاهر و تثبیت شود. برای شاهد به جای عصاره گیاهی از ۲ میلی لیتر آب مقطر استفاده گردید و مراحل فوق در مورد آن نیز اجرا شد. بعد از ظهور رنگ میزان جذب در ۴۹۰ نانومتر توسط دستگاه توسط اسپکتروفتومتر (مدل Jenway 6405) سنجیده شد. جهت محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده خواهد شد.

سنجش میزان پرولین: میزان پرولین آزاد در قسمت‌های مختلف نمونه‌های شاهد و تیمار بر طبق روش Bates و

اندازه‌گیری وزن‌تر اندام هوایی و وزن تر ریشه: در هر مرحله از برداشت وزن‌تر اندام‌های هوایی و وزن‌تر ریشه‌های گیاهان مربوط به هر گلدان با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند. سپس نمونه‌ها به منظور انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای منفی ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند.

سنجش میزان پروتئین: غلظت مقدار پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976). برای تعیین غلظت پروتئین‌های نمونه‌ها از هر عصاره پروتئینی مقدار ۵۰ میکرولیتر در لوله‌ی آزمایش ریخته و ۲/۵ میلی لیتر محلول برادفورد به آن اضافه شد و پس از ورتکس کردن، مقدار جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل Jenway 6405) سنجیده شد، و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم برگرم وزن‌تر محاسبه گردید.

تعیین میزان فنل کل: برای تعیین میزان فنل کل از روش McDonald و همکاران (۲۰۰۱) استفاده گردید. پس از تهیه عصاره با حلال متانول ۷۰٪ محتوای فنل کل با استفاده از روش فولین‌سیوکالتیو اندازه‌گیری گردید. برای تعیین مقادیر ترکیبات فنلی در لوله آزمایش به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین‌سیوکالتو (۱:۹) و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه آنکوبه شد. پس از مدت زمان یاد شده جذب نوری آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل Jenway 6405) خواند شد. جهت تعیین میزان فنل کل، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم گالیک اسید تهیه گردید.

سنجش میزان فلاونوئید: برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی لیتر متانول (۸۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک توسط اسپکتروفتومتر (مدل Jenway 6405) اندازه‌گیری گردید. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکر

گایاکول پراکسیداز به صورت افزایش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (مدل Jenway 6405) محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی ($2676 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX):

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (با اسیدپته ۷) محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، ۰/۳ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به صورت کاهش در جذب H_2O_2 طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر (مدل Jenway 6405) محاسبه شد ($\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) $2/8^1 =$ ضریب خاموشی).

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپید: اندازه‌گیری میزان

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربتوریک اسید (TBAT) با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. ۰/۲ گرم بافت تر برگ و ریشه در ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد همگن شده سپس عصاره‌ی حاصل به فالكون انتقال یافته و به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک‌اسید بود اضافه شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، انکوبه گردیدند. سپس مخلوط حاصل بلافاصله در حمام یخ سرد شد و بعد از آن در سرعت ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf 5810R) گردید. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین و جذب ویژه در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از ضریب تصحیح ($\mu \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ۰/۱۵۵ محاسبه و براساس واحد میکرومول‌برگرم وزن‌تر ($\mu \text{mol g}^{-1} \text{ FW}$) بیان شد (Heath and Packer, 1968).

آنالیز آماری داده‌ها: برای کاهش خطا، نمونه برداری و

آزمایش‌ها به صورت ۳ تکرار انجام شد. آنالیز داده‌های آماری

همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. برای سنجش میزان پرولین ۰/۱ گرم برگ نمونه‌ها به همراه ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد در هاون ساییده شد و به مدت ۷۲ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا اسید آمینه‌ی پرولین آزاد شود. بعد از ۷۲ ساعت نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Eppendorf 5810R) شدند، سپس به ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین (شامل ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار، ۳۰ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۱/۲۵ گرم نین هیدرین) اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه (Memmert WNB22) قرار داده شد. بعد از خارج ساختن نمونه‌ها از حمام آب گرم، نمونه‌ها به وسیله‌ی یخ به سرعت سرد شدند و روی هر نمونه ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به هم زده شد. بعد از تشکیل دو فاز جذب فاز رویی برای هر نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه توسط اسپکتروفوتومتر (مدل Jenway 6405) خوانده شد. جهت تعیین میزان پرولین، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم پرولین تهیه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): سنجش فعالیت آنزیم

کاتالاز با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) محتوی ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱ درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره‌ی استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Jenway 6405) محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی ($\text{Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ۰/۰۴۳۶ استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): سنجش

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (PH=۷) محتوی ۱ میلی‌لیتر گایاکول پراکسیداز ۱ درصد، ۱ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی استخراجی بود. فعالیت آنزیم

بر اساس مدل طرح پایه بلوک‌های کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS با تجزیه‌ی واریانس یک طرفه و آزمون دانکن در سطح احتمال آماری $P < 0.05$ انجام گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار EXCEL سری ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج:

سنتر زیستی نانوذرات نقره و ویژگی‌های آن: نانوذرات نقره با استفاده از عصاره میوه جغجغه با روش زیستی سنتز شدند. نانوذرات نقره به‌دست آمده به فرم کروی و با میانگین اندازه ذرات $12/68$ نانومتر بود (شکل ۱).

اثر نانوذرات بر رشد و نمو گیاه بادرنجبویه: طول ریشه:

طول ریشه گیاه بادرنجبویه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در روزهای ۱۰ و ۱۵ برداشت که تحت تیمار نانوذرات نقره بودند، طول ریشه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره نسبت به کنترل افزایش داشت به طوری که بیشترین میزان افزایش طول ریشه در روز ۱۵ و در غلظت 60 ppm نانوذرات نقره مشاهده شد (شکل ۲a). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که طول ساقه تحت تاثیر تمام غلظت‌های نانوذرات نقره (100 ، 60 و 20) در روزهای ۱۰ و ۱۵ به طور معناداری نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین افزایش طول ساقه نسبت به شاهد مربوط به غلظت 60 ppm نانوذرات نقره با اندازه (21 cm) و پس از گذشت ۱۵ روز مشاهده شد (شکل ۲b). بیشترین میزان افزایش قطر ساقه تحت تاثیر غلظت 60 ppm نانوذرات نقره و در روز ۱۵ پس از برداشت مشاهده شد (شکل ۲c). نتایج تحقیق حاضر نشان داد وزن اندام هوایی در روز ۱۵ پس از برداشت وزن اندام هوایی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (100 ، 60 ، 20) نسبت به شاهد افزایش داشت که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بوده، به طوری که بیشترین افزایش وزن اندام هوایی مربوط به غلظت 60 ppm نانوذرات نقره بود (شکل ۳a). نتایج تحقیق حاضر نشان داد وزن اندام هوایی در روز ۱۵ پس از برداشت وزن اندام هوایی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (100 ، 60 ، 20) نسبت به شاهد

افزایش داشت که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بوده، به طوری که بیشترین افزایش وزن اندام هوایی مربوط به غلظت 60 ppm نانوذرات نقره بود (شکل ۳a).

اثر نانوذرات بر پروتئین گیاه بادرنجبویه: در پژوهش

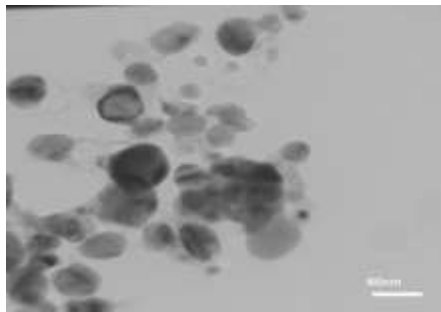
حاضر گیاه بادرنجبویه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (100 ، 60 ، 20) هیچ تغییری در میزان پروتئین در مقایسه با شاهد در روز ۵ مشاهده نشد. با این حال میزان پروتئین در روز ۱۰ تحت تیمار نانوذرات نقره در غلظت‌های 100 و 60 ppm و نانوذرات نقره به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار پروتئین در گیاه بادرنجبویه تحت تنش نانوذرات نقره در غلظت 60 و 100 ppm نانوذرات نقره و در روز ۱۵ تحت تیمار نانوذرات نقره مشاهده شد (شکل ۳c).

اثر نانوذرات نقره بر میزان متابولیت‌های ثانوی: میزان

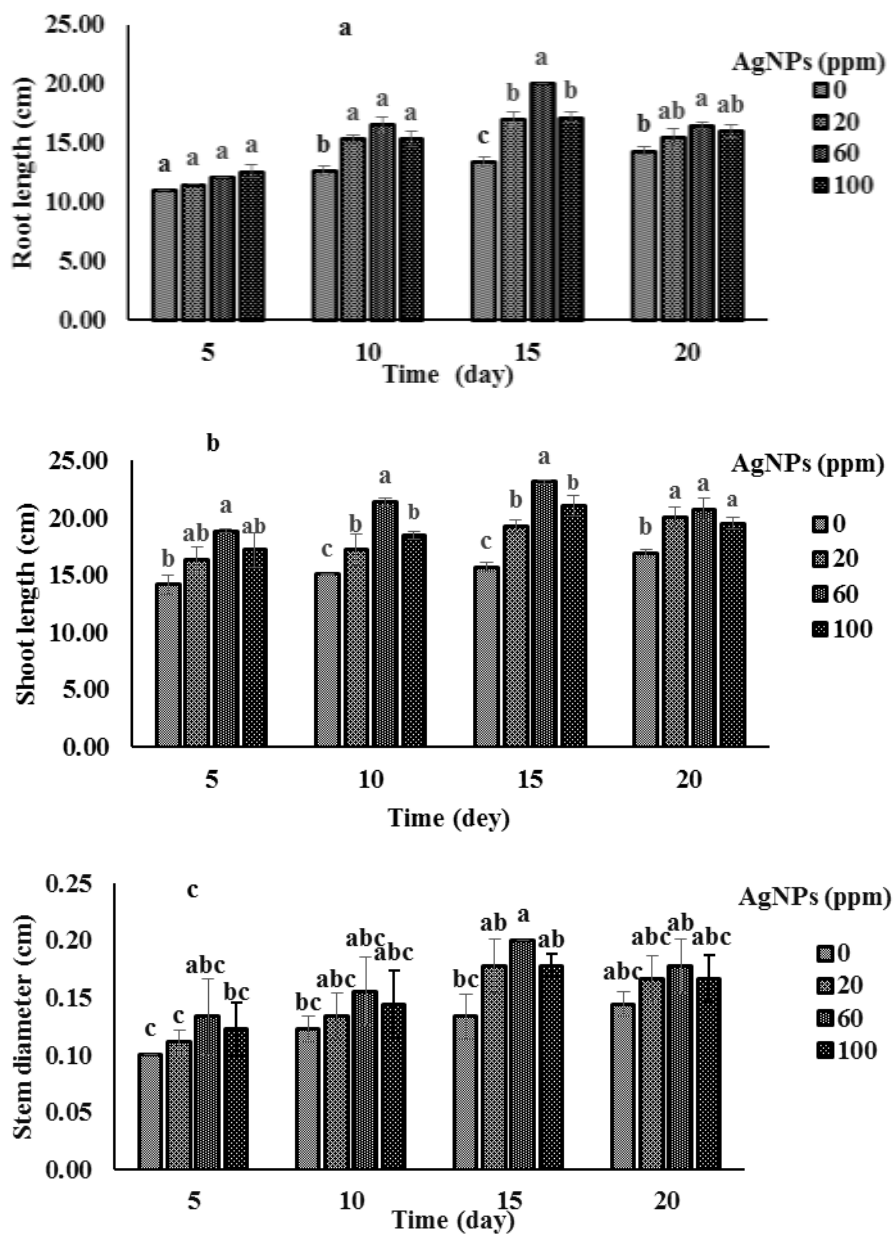
فنل در تمام غلظت‌ها نانوذرات نقره (20 ، 60 ، 100) و زمان مختلف (5 ، 10 ، 15 ، 20 روز) در مقایسه به شاهد افزایش داشته که حداکثر این افزایش مربوط به روز ۲۰ که تحت تیمار نانوذرات نقره بوده و غلظت 100 ppm نانوذرات نقره می‌باشد و کمترین میزان فنل مربوط به گروه شاهد می‌باشد (شکل ۴a). نانوذرات نقره منجر به افزایش فلاونوئید در تمام غلظت‌ها نانوذرات نقره (100 ، 60 ، 20) و در زمان‌های مختلف (5 ، 10 ، 15 ، 20 روز) نسبت به گروه شاهد شده که از نظر آماری این افزایش در سطح ($p \leq 0.05$) معنی دار بود و در روز ۲۰ تحت تیمار نانوذرات نقره تمام غلظت‌ها (100 ، 60 ، 20) فلاونوئید در گروه شاهد مشاهده شد (شکل ۴b). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (100 ، 60 ، 20) در روزهای مختلف باعث افزایش میزان آنتوسیانین در مقایسه با شاهد شده است (شکل ۴c).

اثر نانوذرات نقره بر میزان کربوهیدرات گیاه

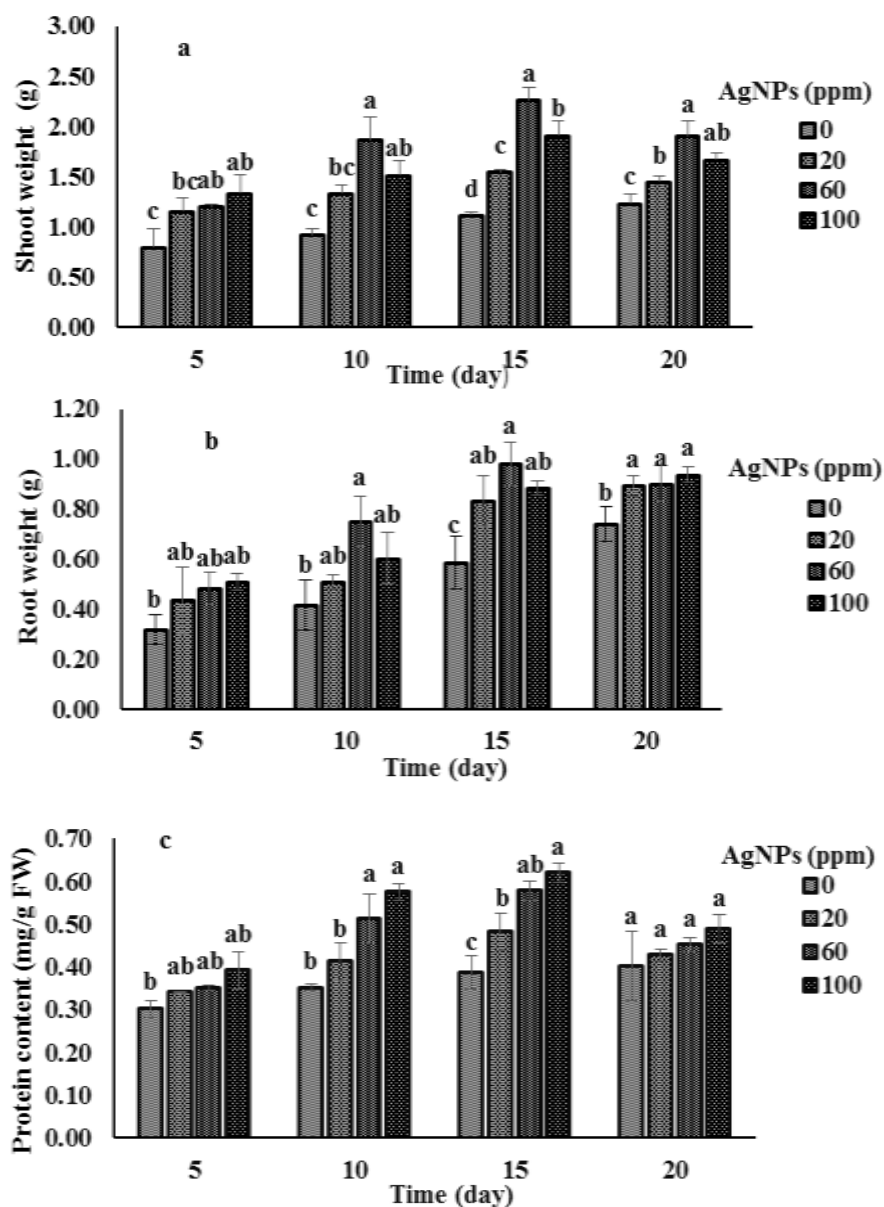
بادرنجبویه: همان طور که در شکل ۵a نشان داده شده است، میزان کربوهیدرات در روزهای ۵ و ۱۰ تحت تاثیر نانوذرات نقره به طور معنی داری در غلظت‌های 100 و 60



شکل ۱- تصویر نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی با استفاده از میکروسکوپ TEM



شکل ۲ - اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر پارامترهای رشد (طول ریشه a، طول ساقه b، قطر ساقه c گیاه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($p \leq 0.05$) تفاوت معنی‌دار ندارند.



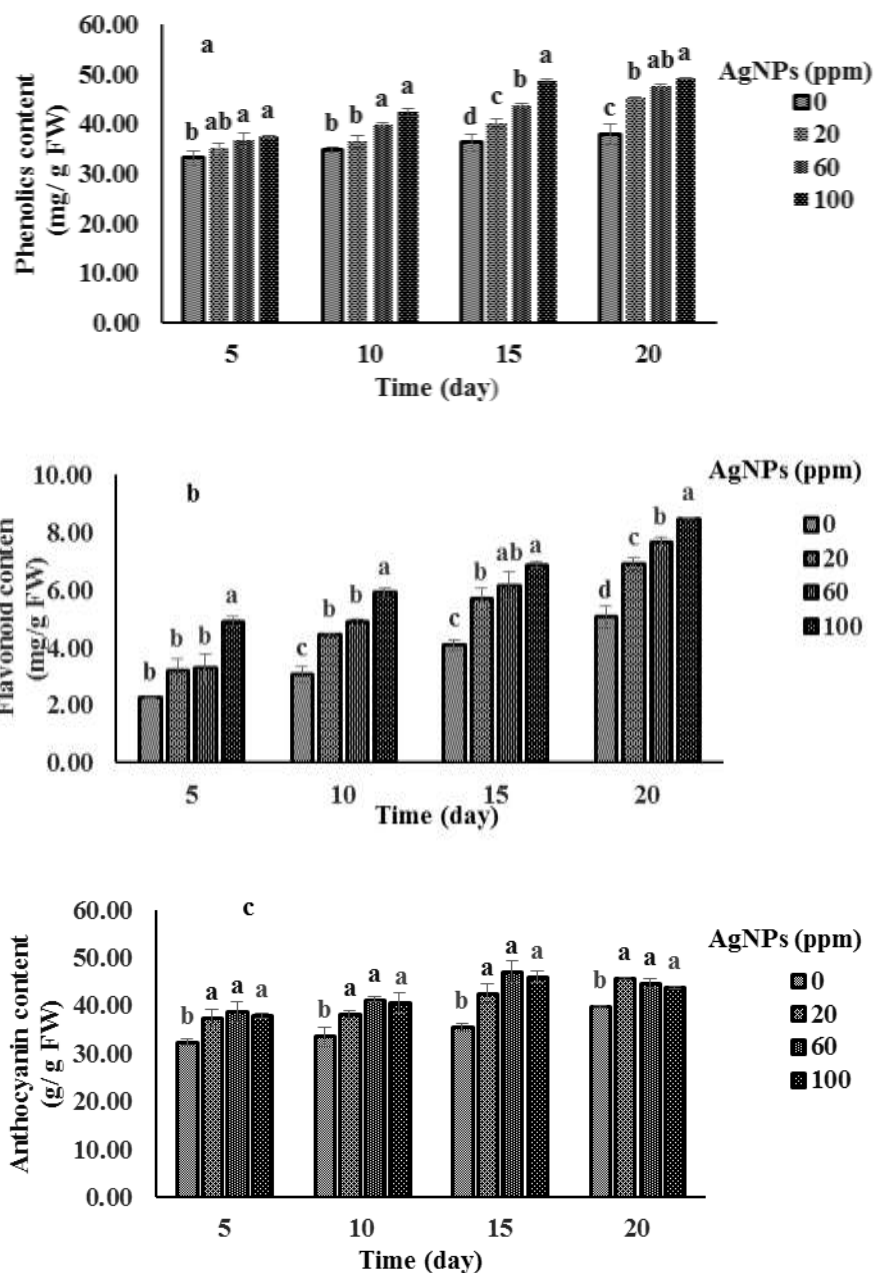
شکل ۳ - اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر پارامترهای وزن اندام هوایی (a)، وزن تر ریشه (b) و میزان پروتئین (c) گیاه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و SE \pm (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($p \leq 0.05$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد افزایش یافت. میزان کربوهیدرات با افزایش غلظت نانوذرات نقره در روز ۱۵ نسبت به شاهد افزایش یافت. در روز ۲۰ غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات نقره نسبت به شاهد افزایش یافته بود.

اثر نانوذرات نقره بر میزان پرولین گیاه بادرنجبویه: براساس نتایج تحقیق حاضر بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در روزهای ۱۵ و ۲۰ که تحت تاثیر غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد مشاهده گردید (شکل ۶a). براساس

اثر نانوذرات نقره بر میزان پرولین گیاه بادرنجبویه: براساس مقایسه میانگین داده‌ها میزان پرولین در تمام روزهای تحت تیمار نانوذرات نقره در اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات

اثر نانوذرات نقره بر میزان پرولین گیاه بادرنجبویه: براساس مقایسه میانگین داده‌ها میزان پرولین در تمام روزهای تحت تیمار نانوذرات نقره در اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات

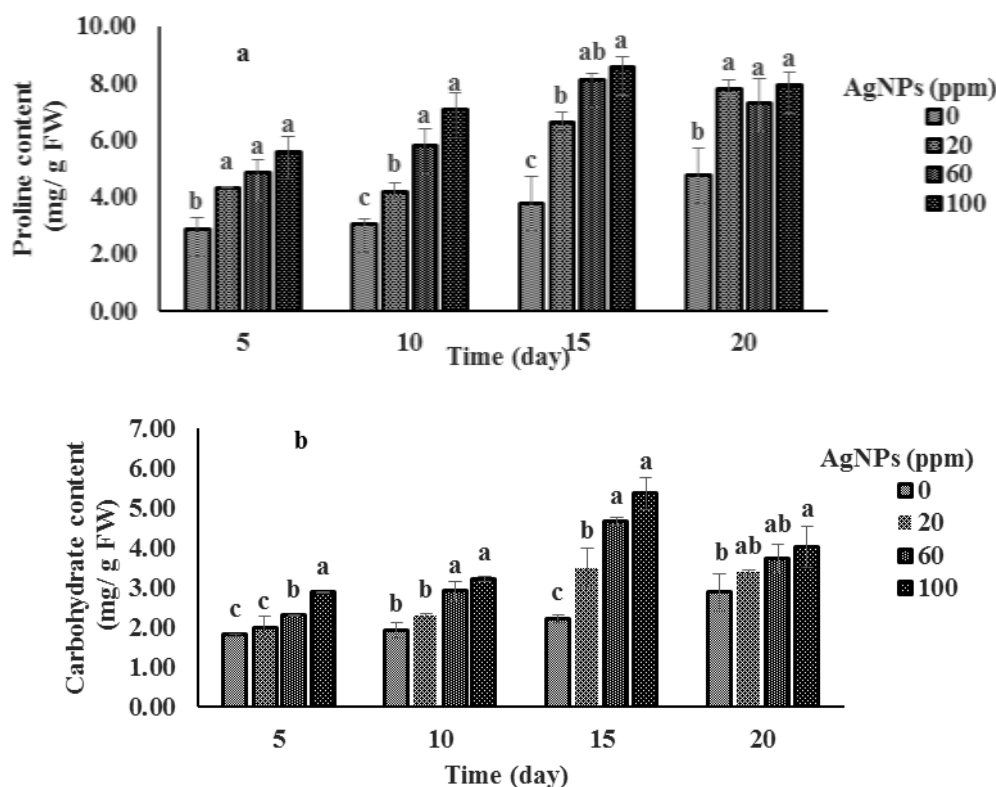


شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان متابولیت‌های ثانوی (فنل a، فلاونوئید b، آنتوسیانین c) گیاه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($p \leq 0.05$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

شاهد گیاه بادرنجبویه در طی دوره رشدی افزایش نشان داد (شکل ۶c).

اثر نانوذرات بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA): بررسی‌ها نشان داد که میزان MDA در تمام غلظت‌ها نانوذرات نقره (۱۰۰، ۶۰، ۲۰) در روزهای ۵ و ۱۰ در مقایسه با شاهد افزایش داشته که این افزایش در سطح ($p \leq 0.05$) معنی

نتایج تحقیق حاضر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات در روزهای ۱۵ و ۲۰ نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در روزهای ۱۵ و ۲۰ تحت تاثیر غلظت ۱۰۰ ppm مشاهده شد (شکل ۶b). میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاه بادرنجبویه در نمونه‌های



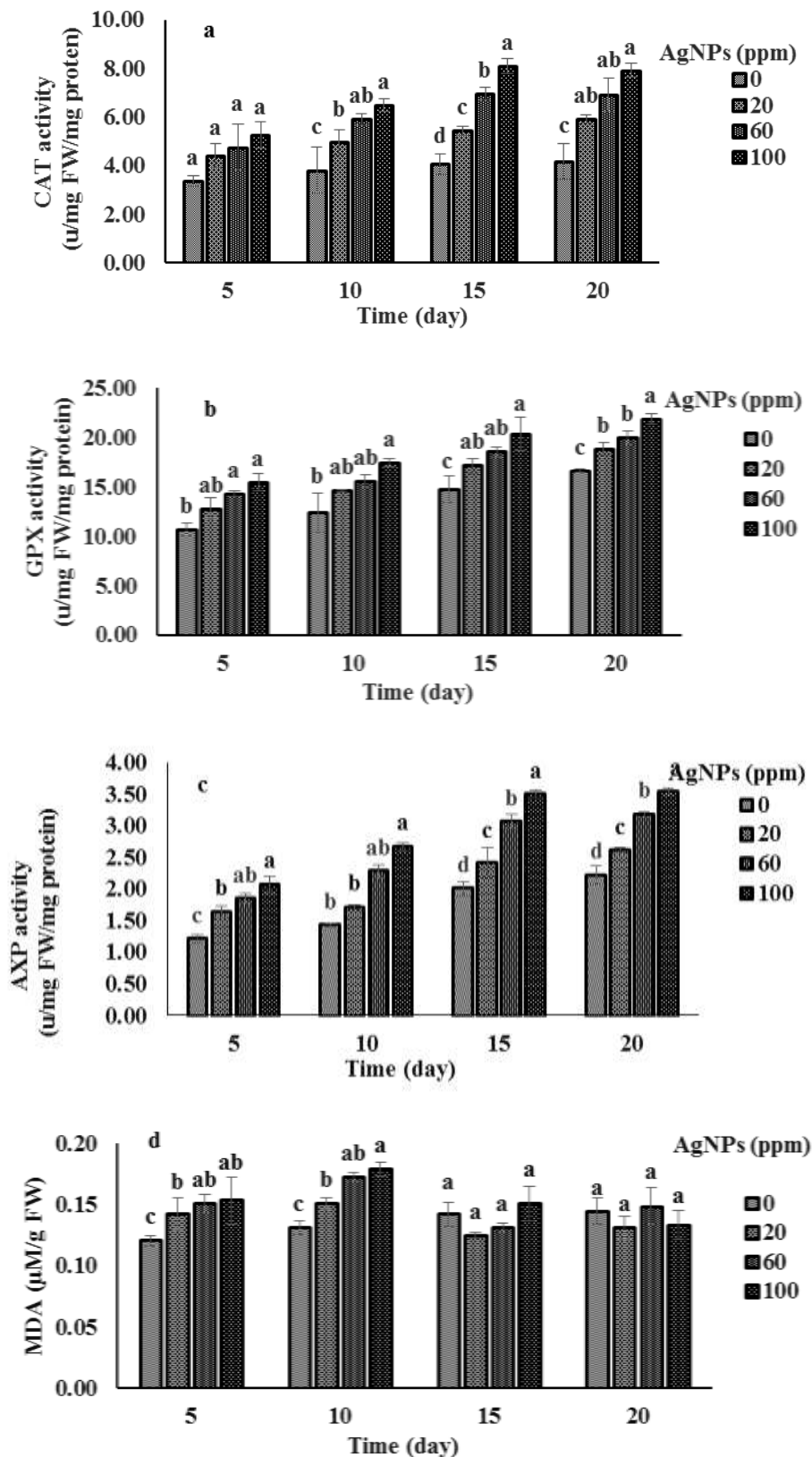
شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان پرولین (a) و میزان کربوهیدرات (b) گیاه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($p \leq 0.05$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

از آن اثر مهاری بر روی رشد گیاه دارد. نانوذرات نقره که به روش زیستی سنتز شده بوده در گیاه سنبل آبی باعث افزایش رشد در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر شده است در حالی که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برلیتر باعث کاهش رشد گیاه شده است (Rani *et al.*, 2016). این افزایش رشد می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، مانند سیتوکینین‌ها و جبرلین‌ها باشد (Stampoulis *et al.*, 2009). بنابراین اثرات نانوذرات نقره بسته به غلظت نانوذرات و نوع گونه گیاهی بر رشد متفاوت است. میزان پروتئین در گیاهان بادرنجبویه منجر به افزایش رشد در گیاه می‌شود که نشان دهنده این است محتوی پروتئین درونی گیاه عاملی مهمی در کنترل رشد گیاه می‌باشد. بیوستز نانوذرات نقره به روش زیستی منجر به افزایش پروتئین در گیاه بادرنجبویه شد که نتایج این تحقیق با نتایج Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گونه *Bacopa monnieri* میزان پروتئین افزایش داشته

دار بود. اما در روز ۱۵ تحت تیمار میزان MDA در غلظت‌های ۲۰ و ۶۰ ppm نانوذرات نقره نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۶d).

بحث

در مطالعه حاضر تاثیر نانوذرات نقره که به روش زیستی سنتز شده، بر رشد گیاه بادرنجبویه بررسی شد. غلظت ۶۰ ppm نانوذرات نقره و در زمان ۱۵ روز بعد از تیمار بیشترین تاثیر را بر رشد داشت. در بررسی انجام گرفته شده روی گیاه کلم راپا نانوذرات نقره که به روش زیستی سنتز شده در غلظت‌های پایین به عنوان محرک رشد عمل کرده و در غلظت‌های بالا باعث مهار رشد گیاه شلغم (*Brassica rapa ssp.*) شده است (Baskar *et al.*, 2015). مطالعه Salama (۲۰۱۲) روی گیاه ذرت و لوبیا نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت ۶۰ ppm سبب افزایش رشد در گیاهان می‌شود اما در غلظت‌های بالاتر



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (آنزیم کاتالاز (a)، آنزیم گایاکول پراکسیداز (b) آنزیم آسکوربات پراکسیداز (c) میزان MDA (d) گیاه بادرنجبویه. مقادیر نشان داده شده میانگین ۳ تکرار و \pm SE (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح $(p \leq 0.05)$ تفاوت معنی دار ندارند.

محافظت از سلول‌های گیاهی از طریق تنظیم اسمولاریته داخلی، نگهداری تورژسانس و همچنین پایداری غشاها و پروتئین‌ها می‌شود (Bohnert *et al.*, 1995). پرولین با افزایش فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیداتیو، و با حذف فعالیت اکسیژن واکنش پذیر (ROS)، مقاومت گیاه به استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد، بنابراین باعث حفظ فعالیت ردوکس می‌شود (Matysik *et al.*, 2002). میزان پرولین در گیاه گندم تحت تاثیر نانوذرات نقره با افزایش غلظت در مقایسه با شاهد به طور معنی داری افزایش یافته که حداکثر افزایش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر بوده است (Karimi and Mohsenzadeh, 2017). بنابراین به نظر می‌رسد در گیاه میزان پرولین به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند با افزایش غلظت نانوذرات نقره افزایش می‌یابد.

کاتالاز یکی از مهم‌ترین اجزای مکانیسم حفاظت کننده در گیاه است که در میتوکندری و پراکسی‌زوم وجود دارد (Gupta *et al.*, 2009)، و نقش مهمی در پاک سازی رادیکال‌های آزاد خصوصا تولید پراکسید هیدروژن در طول تنفس نوری و شرایط تنش دارد (Bowler *et al.*, 1992). نتایج Sharma و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافته و در نتیجه میزان ROS کاهش می‌یابد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز یکی از مهم‌ترین پراکسیداز در رفع سمیت H_2O_2 هم در سیتوزول و هم در کلروپلاست‌هاست (Mittova *et al.*, 2000). نتایج پژوهش Sharma و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با افزایش غلظت نانوذرات نقره در گیاه خردل افزایش نشان داده است. Sharma و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که نانوذرات نقره باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شده است. این افزایش مشاهده شده در فعالیت‌های آنزیمی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های اصلی حفاظت در مقابل افزایش تولید ROS باشد. فعالیت آنزیم ممکن است تغییر کند که به غلظت، نوع نانوذرات و مدت زمانی که تحت تاثیر آن قرار می‌گیرد بستگی دارد (Movafeghi *et al.*, 2017). رادیکال‌های آزاد اکسیژن با اثر بر

است مطابقت دارد. علاوه بر این، Anusuya و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که نانوذرات نقره-کیتوزان به طور قابل توجهی میزان پروتئین کل را در گیاهچه نخود افزایش می‌دهد. بنابراین تغییرات میزان پروتئین بستگی به غلظت نانوذرات نقره استفاده شده در گیاه مورد مطالعه دارد.

مقدار فنل در گیاه گوجه فرنگی در تمام غلظت نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد افزایش یافته بود (Mehrian and Karimi, 2017). مشتقات فنلی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دخیل هستند که به تعداد گروه‌های هیدروکسیلی موجود در مولکول بستگی دارد. علاوه بر این، ساختارهای فنلی می‌توانند به عنوان عامل‌های فلز زدا عمل کنند (Michalak, 2006)، که باعث کاهش ROS و رادیکال‌های لیپیدی می‌شود. میزان فلاونوئید در کالوس گیاه *Satureja khuzestanica* تحت تاثیر نانولوله‌های کربنی چند دیواره به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش داشته است (Ghorbanpour and Hadian, 2015). Aghajani و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات نقره می‌تواند مراحل رشد گیاه و مقدار متابولیت‌های ثانوی را تغییر دهد. فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنولیکی و از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند. فلاونوئیدها نقش حفاظتی در برابر رادیکال‌های آزاد دارند (Agati *et al.*, 2007)، زیرا تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را مهار می‌کنند و آنها را حذف می‌کند (Rice-Evans *et al.*, 1997). نتایج Homae و Ehsanpor در سال (۲۰۱۵) نشان داده که میزان آنتوسیانین در گیاه سیب زمینی تحت تاثیر غلظت ۲ میلی‌گرم برلیتر نانوذرات نقره نسبت به شاهد افزایش داشت. آنتوسیانین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است که از سلول‌ها در برابر ROS محافظت می‌کند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد میزان آنتوسیانین تحت تاثیر نانوذرات نقره افزایش یافت.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق نانوذرات نقره باعث افزایش میزان کربوهیدرات در گیاه بادنجه‌بویه شده، که نتایج تحقیقات محققین نشان داده که در گونه‌های *Eichhornia crassipes* میزان کربوهیدرات افزایش یافته بود (Rani *et al.*, 2016). افزایش میزان کربوهیدرات در شرایط تنش باعث

بررسی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات نقره که به روش زیستی سنتز شده باعث افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی گردید. غلظت ۶۰ ppm نانوذرات نقره در روز ۱۵ پس از برداشت باعث بیشترین میزان شاخص‌های مختلف رشد از جمله طول ریشه و ساقه، وزن تر ریشه و ساقه و میزان پروتئین گردید. نتایج نشان داد، افزایش مقدار پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نشان دهنده فعال شدن سیستم دفاعی گیاه برای کاهش پراکسیداسیون لیپید تحت تاثیر نانوذرات نقره بود. بر اساس نتایج این تحقیق، نانوذرات نقره به عنوان محرکی مناسب جهت افزایش رشد و تولید متابولیت‌های ثانوی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است (شماره گرنت: UOZ-GR-9618-20).

پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء، واکنش های زنجیرهای پراکسیداسیون را تحریک و منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند (Savoure *et al.*, 1999). کاهش میزان MDA تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ ppm نانوذرات نقره در مقایسه با شاهد گزارش شده است (Sharma *et al.*, 2012). MDA که در بافت‌ها تحت شرایط تنش بوجود می‌آید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها شناخته شده است. به نظر می‌رسد کاهش میزان MDA در روزهای ۱۵ و ۲۰ تحت تاثیر نانوذرات نقره به دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، شاخص‌های رشد و پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه تحت تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات نقره در زمان‌های مختلف برداشت

منابع

- سالاری تجدانو، س. ۱۳۹۵. سنتز نانوذرات نقره با استفاده از میوه گیاه جغجغه. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105: 121-126.
- Agati, G., Matteini, P., Goti, A. and Tattini, M. (2007) Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174: 77-89.
- Aghajani, Z., pourmeidan, A. and Ekhtiyari, R. (2013) Effect of nano-silver on stages of plant growth and yield and composition of essential oil of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen. *African Journal of Agricultural Research* 8: 707-710.
- Albrecht, M. A., Evans, C. W. and Raston, C. L. (2006) Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry* 8: 417-432.
- AL-Oubaidi, H. K. M. and Kasid, N. M. (2015) Increasing (phenolic and flavonoids compounds of *Cicer arietinum* L. from embryo explant using titanium dioxide nanoparticle in vitro. *world journal pharmaceutical research* 4:1791-1799.
- Anon, N. (2002) Iranian herbal pharmacopoeia. Tehran: Ministry of Health Publication 1: 114-121.
- Anusuya, S. and Banu, K. N. (2016) Silver-chitosan nanoparticles induced biochemical variations of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 39-44.
- Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., Trudeau, V. L. and Arnason, J. T. (2009) Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of gaba transaminase activity. *Phytotherapy Research* 23:1075-1081.
- Baskar, V., Venkatesh, J. and Park, S. W. (2015) Impact of biologically synthesized silver nanoparticles on the growth and physiological responses in *Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 17672-17682.
- Bates, L. S., Waldron, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-208.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. and Jensen, R. G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *The plant cell* 7: 1099-1111.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chen, X. and Schluesener, H. J. (2008) Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett* 176: 1-12.
- Cho, K. H., Park, J. E., Osaka, T. and Park, S. G. (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta* 51: 956-960.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-6
- Dudo, A., Choi, D. and Scheufele, D. A. (2011) Food nanotechnology in the news. Coverage patterns and thematic emphases during the last decade. *Appetite* 56: 78-89.
- Ghorbanpour, M. and Hadian, J. (2015) Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon* 94: 749-759.
- Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N. and Triffault-Bouchet, G. (2013) Interaction between silver nanoparticles and plant growth. In: International symposium on new technologies for environment control, energy-saving and crop production in greenhouse and plant factory—greensys, Jeju, Korea, 6–11 Oct.
- Gupta, M., Sharma, P., Sarin, N. B. and Sinha, A. K. (2009) Differential response of arsenic stress in two varieties of *brassica juncea* l. *Chemosphere* 74: 1201-1208.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968) Photooxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125:189–198.
- Homaei, M. B. and Ehsanpour, A. A. (2015) Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under in vitro conditions. *Indian Journal of Plant Physiology* 20: 353-359.
- Karimi, J. and Mohsenzadeh, S. (2017) Physiological Effects of Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Toxicity in *Triticum aestivum*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 41: 111-120.
- Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of *tobacco* cells. *ACS Nano* 6:2128.
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., and Schuster, E. W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop protection* 35: 64-70.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Ramachandran, R., Abirami, S. M., Mohan, N. and Kalaichelvan, P. T. (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. *Process Biochemistry* 47: 651-658.
- Lu, C. M., Zhang, C. Y., Wen, J. Q. and Wu, G.R. (2002) Effects of nano material on germination and growth of *soybean*. *Soybean Science* 21:168-171.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B. and Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* 82:525–532.
- McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M. and Robards, K. (2001) Phenolic content and antioxidant activity of *olive* extracts. *Food chemistry* 73: 73-84.
- Mehrian, S. K. and Karimi, N. (2017) Biological testing of the chemically synthesized silver nano-particles for nitrate, chloride, potassium and sodium contents, and some physiological and biochemical characteristics of *tomato* plants. *Indian Journal of Plant Physiology* 22: 48-55.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15: 523–530.
- Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. and Tal, M. (2000) Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 110: 42-51.
- Movafeghi, A., Khataee, A., Abedi, M., Tarrahi, R., Dadpour, M. and Vafaei, F. (2017) Effects of TiO₂ nanoparticles on the aquatic plant *spirodela polyrrhiza*: Evaluation of growth parameters, pigment contents and antioxidant enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Park, H. J., Kim, S. H., Kim, H. J. and Choi, S. H. (2006) A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. *The plant pathology journal* 22: 295-302.
- Rani, P. U., Yasur, J., Loke, K. S. and Dutta, D. (2016) Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (mart) solms. *Acta physiologiae plantarum* 38: 58.
- Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2: 152-159.

- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R. and GardeaTorresdey, J. L. (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:3485–3498.
- Salama, H. M. H. (2012) Effects of silver nanoparticles in some crop plants, scavenging and anti-inflammatory properties of STW 5 (Iberogast®) and its components. *Phytomedicine* 13: 36-44.
- Savoure, A. et al. 1999. NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana glauca* L. *Plant, Cell & Environment*, 22: 387-396.
- Shah, V. and Belozerovala, I. (2009) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air, and Soil Pollution* 197: 143-148.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K. and Arora, S. (2012) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied biochemistry and biotechnology* 167: 2225-2233.
- Small, E. (2006). *Culinary herbs*. NRC Research Press.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K. and White, J. C. (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental science & technology* 43: 9473-9479.
- Updhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and 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: 453-461.
- Velayutham, K., et al. (2013) Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6 : 95-101.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Journal of Plant Physiology* 64: 88-93.
- Wang, J., et al. (2013) Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environmental Science & Technology* 47: 5442-5449.
- Zargari, A. I. (1990) *Medicinal plants*. Tehran: Tehran University Press 1: 77–81.

The effect of silver nanoparticles synthesized by biological method on growth, physiological and biochemical properties of *Melissa officinalis* L.

Asiyeh shavalibor¹ and Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi*¹

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.
(Received: 21/11/2017, Accepted: 24/01/2018)

Abstract

Using bio nanoparticles plays an important role in increasing agricultural productivity. In recent years, the use of nanoparticles in plants has been considered as pesticides, protective agents and nutrients. *Melissa Officinalis* L. is a medicinal plant of the family of Lamiaceae, which has antibacterial, anticancer and antiviral properties. In this research effects of different concentrations of silver nanoparticles on some physiological parameters of *M. Officinalis* L. was performed under pot condition in Basic Sciences Faculty of University of Zabol, in 2017. Experiment was conducted using randomized complete block design with 3 replications by silver nanoparticles treatment in four concentrations (100, 60, 20, 0 ppm). The results showed that different growth parameters including root and stem fresh weight, root and shoot length and protein content significantly increased under AgNPs, with the highest amount at 60 ppm AgNPs on day 15. Proline and carbohydrate also increased under different concentrations of AgNPs compared to control, with highest content at 100 ppm AgNPs on day 15. The maximum content of secondary metabolites, including phenol and flavonoids, was observed the at 100 ppm AgNPs on day 20. The maximum increase in the anthocyanin content was observed at concentration of 60 ppm AgNPs on day 15. The increased activity of antioxidant enzymes (catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase) under different concentrations of AgNPs led to a decrease in MDA content. According to the results of this study, AgNPs are suggested as a suitable stimulant for increasing growth and production of secondary metabolites.

Keywords: *Melissa officinalis*, Silver nanoparticles, secondary metabolites, physiological properties

Corresponding author, Email: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir