

بررسی پیش تیمار کروناتین بر تنش ناشی از نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون بر گیاه سویا

شهلا هاشمی شهرکی^۱، فرشته محمدحسینی جور^{۲*}

چکیده

سنتز نانوذرات توسط روش سبزه، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است. در پژوهش حاضر، سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره زیتون انجام گرفت. ویژگی مورفولوژیکی و ساختاری نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط اسپکتروفتومتر UV-TEM، آنالیز شدند. اسپکتروفتومتر UV visible با TEM روش‌های متفاوتی هستند. سپس، اثر نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm با پیش تیمار کروناتین (صفر و ۵۰ نانومولار) بر پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید و آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (ASP)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) بررسی شدند. سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره‌ی زیتون با ماکزیمم جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر و تصویر میکروسکوپ عبوری، اندازه میانگین ذرات ۴۱ نانومتری را تایید کرد. نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زیتون، ذرات کروی شکل هستند. بررسی نانوذرات اکسیدروی بر گیاه سویا نشان داد که در غلظت ۴۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی، فعالیت آنزیم ASP، PAL، SOD پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید افزایش می‌یابد. مالون دآلدئید در غلظت ۲۰۰ ppm نانوذرات اکسید روی تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت اما فعالیت آنزیم SOD افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. پیش تیمار کروناتین باعث بهبود تنش‌های ایجاد شده در غلظت ۲۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی شد و منجر به کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید گردید اما کروناتین در غلظت ۴۰۰ ppm نانوذرات اکسید باعث افزایش این محتوا شد.

واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن، کروناتین، مالون دآلدئید، نانوذرات اکسید روی

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: (fereshtehmhasani@yahoo.com)

مقدمه

نانوذرات دارای ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و فعالیت‌های کاتالیزوری متفاوتی نسبت به درشت مولکول‌ها هستند. امروزه نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردشان توجه بسیاری از افراد از جمله محققان و صنعتگران و... را به خود جلب کرده است و تلاش‌های بسیاری برای تولید نانوذرات از روش‌های مختلف و مصارف گوناگون آن در قسمتهای صنعتی شده است (Jain *et al.*, 2009). بنابراین مقدار زیادی از نانوذرات وارد محیط شده است و گیاهان موجود در محیط را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند. نانوذرات در گونه‌های مختلف گیاهان اثرهای متفاوتی دارد (Zhu *et al.*, 2008). در گزارشات محدودی مبنی بر تأثیر مثبت نانوذرات بر رشد برخی از گیاهان از جمله بادام زمینی (Prasad *et al.*, 2012)، نخود (Pandey *et al.*, 2010) وجود دارد. نهال‌های یک ساله نوعی کاج (*Larix elgensis*) به مدت ۶ ساعت در غلظت‌های ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر نانو دی اکسید سیلیسیم (SiO_2) قرار داده شدند. تیمار دی اکسید سیلیسیم (SiO_2) رشد و کیفیت نهال‌ها را به شدت بهبود بخشید. تیمار با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر بهترین نتیجه را داد که در آن متوسط ارتفاع ۴۲/۵ درصد، قطر ریشه ۳۰/۷ درصد، طول ریشه‌ی اصلی ۱۴ درصد بود و تعداد ریشه‌های جانبی نهال‌ها ۳۱/۶ درصد در مقایسه با شاهد افزایش یافت. همچنین در تیمار ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر دی اکسید سیلیسیم، بالاترین غلظت کلروفیل را نشان داد (Lin *et al.*, 2004). برخی گزارشات اثر بازدارندگی اکسیدروی در مراحل نمو گیاهان نظیر جوانه‌زنی و طویل شدن ریشه را نشان دادند (Lin & Xing, 2007). در تحقیقی اثر چهار نانوذره ZnO ، Fe_3O_4 ، SiO_2 ، Al_2O_3 با سه غلظت ۴۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر روی گیاه *Arabidopsis thaliana* بررسی شد. در بین نانوذرات مورد مطالعه، نانوذرات ZnO اثر مهار جوانه زنی بیشتری نسبت به نانوذرات دیگر داشت (Lee *et al.*, 2010). همچنین نانوذرات Fe_3O_4 و ZnO اثرات بازدارندگی بر طول ریشه‌چه نشان دادند درحالی‌که نانوذرات Al_2O_3 و SiO_2 ، تأثیر مثبت بر طول ریشه‌چه نشان داشتند. Boonyanitipong و همکاران (۲۰۱۱) غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات اکسیدروی و دی اکسید تیتانیوم را بر جوانه‌زنی بذر برنج آزمایش کردند و اظهار داشتند که هیچ یک از نانوذرات، درصد جوانه‌زنی را کاهش ندادند ولی نانوذرات اکسیدروی طویل شدن ریشه و تعداد ریشه را کاهش داد، در حالی که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم اثر بازدارندگی بر طویل شدن ریشه نداشت. Khodakovskaya و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که نانو لوله‌های کربنی در غلظت ۴۰-۱۰ میلی گرم بر لیتر جوانه‌زنی و رشد گوجه فرنگی را افزایش داد که احتمالاً این امر در اثر توانایی نانو لوله‌های کربنی برای نفوذ به پوسته بذر و تحریک جذب آب می‌باشد. در تحقیقاتی نشان داده شده است که نانوذرات مس برای گیاه ماش و گندم سمی بوده و کاهش سرعت رشد گیاهچه را باعث شد. ماش حساس‌تر از گندم است که این تفاوت را به آناتومی و ساختار ریشه نسبت داده‌اند. همچنین نانوذرات نقره در غلظت‌های کم (کمتر از ۱ ppm) می‌تواند برای گیاهچه های *Arabidopsis thaliana* سمی باشد و به طور آشکاری رشد را متوقف کند (Lee *et al.*, 2008). گزارش‌ها اظهار کردند که اثرات منفی نانوذرات می‌تواند به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان باشد (Shaw & Hossain,

(2013). گیاهان برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد چندین مکانیسم دفاعی دارند. چندین سیستم اصلی آنزیمی جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مکان‌های تولید در گیاه وجود دارد. این سیستم‌ها عبارتند از: آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، مولکول‌هایی با وزن ملکولی پائین می‌باشند که هر یک دارای ساختار و خصوصیات شیمیایی خاص است و محل قرارگیری آن‌ها نیز متفاوت می‌باشد. این ترکیبات به واسطه‌ی دادن الکترون یا هیدروژن نقش اساسی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد دارند (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱- آنتی‌اکسیدان‌های غشایی محلول در چربی نظیر α توکوفرول، کاروتنوئید و گزانتوفیل

۲- آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب نظیر گلوکاتینون، آسکوربات و ترکیبات فنلی (Sanchez-Viveros *et al.*, 2010).

استفاده از هورمون‌های گیاهی برای حفاظت گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. در سال‌های اخیر محققین با مطالعه‌ی مکانیسم اثر باکتری‌ها و قارچ‌ها بر گیاهان، موادی را شناسایی کرده‌اند که بدلیل اثرات آنها بر رشد و سایر پارامترهای گیاه از آنها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد جدید یاد می‌کنند. کروناتین از جمله این ترکیبات جدید است که در افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌ها نقش دارد. مطالعات نشان می‌دهند کروناتین مشابه با جاسمونات اثرات حفاظتی خوبی برای گیاهان علیه تنش‌های محیطی دارد. جاسمونات‌ها معمولاً با تنظیم واکنش‌های اکسیداتیو و القای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در پاسخ به تنش‌ها عمل می‌کند. Jung (۲۰۰۴) معتقد است فعالیت اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در آرابیدوپسیس در پاسخ به متیل جاسمونات افزایش می‌یابد (Jung, 2004). کروناتین اثرات فیزیولوژیکی مختلفی بر بافت‌های مختلف گیاه دارد و این اثرات در تک‌لپه‌ای‌ها و دو‌لپه‌ای‌ها متفاوت است. گزارشات متعددی نشان می‌دهند کروناتین در پاسخ به تنش در حمله پاتوژن‌ها و علف‌خوارها نقش دارد و این مؤید این مطلب است که این ترکیب، پاسخ گیاهان در برابر تنش‌های محیطی را واسطه‌گری می‌نماید. کروناتین بر تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند پتروکارپان گلیسنولین، ساخارانین، مامی لاکتون A، آلکالوئیدها، مواد فرار و تاکسول تأثیر می‌گذارد (Mithofer *et al.*, 2005)؛ این ترکیب همچنین می‌تواند تجمع مهارکننده‌های پروتئیناز همراه با علف‌خواری و بیان ژن‌های اختصاصی مربوط به پاسخ جاسمونات JIP را در گیاه جو تحت تنش اسمزی افزایش دهد.

Yan و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند کروناتین، مقاومت گیاهچه‌ها را به تنش کم آبی را افزایش می‌دهد (Yan *et al.*, 1999).

علاوه بر این غلظت ۰/۲ نانومولار کروناتین محتوای آب برگ (RWC) در برگ گیاهچه‌های ذرت را افزایش داده است. گزارشاتی مبنی بر اثر کروناتین بر بهبود مقاومت یا تحمل گیاهان در برابر تنش‌ها مانند بیماری‌ها در شب‌بو، خشکی در ذرت (Wang *et al.*, 2008) و برنج (Ai *et al.*, 2008) وجود دارد. اکثر محققین پیشنهاد کرده‌اند کروناتین از طریق القای

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فعال کردن سیستم هضم رادیکال آزاد مقاومت گیاهان در برابر تنش‌ها را افزایش می‌دهند. Xia و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که کرونتین از طریق بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت هضم رادیکال‌های DPPH سمیت و تنش ناشی از شوری در پنبه را بهبود می‌بخشد (Xie *et al.*, 2008). این ترکیب پیچیده با برخی هورمون‌ها از جمله جاسمونات شباهت زیادی دارد (Feys *et al.*, 1994; Bender *et al.*, 1999). برخی محققین معتقدند کرونتین از طریق اثر بر القای مسیر سیگنالی جاسمونات در گیاهان عمل می‌نماید (Zhao *et al.*, 2003; Block *et al.*, 2005). کاربرد بیرونی JA، MeJA و یا OPDA (پیش‌ساز بلافاصل جاسمونیک اسید یعنی ۱۲-اگزوفیتودی‌انوئیک اسید) بیوسنتز یکسری پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه در گیاه را افزایش می‌دهد که اغلب این ترکیبات در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Mithofer *et al.*, 2005). مطالعات نشان می‌دهند کاربرد بیرونی کرونتین نیز موجب تولید ترکیب پیچیده‌ای از مواد فرار در گیاه می‌گردد که هم‌کمیت و هم‌کیفیت بالاتری نسبت به کاربرد تنهایی JA و OPDA دارد (Boland *et al.*, 1995). علاوه بر این مطالعات برخی محققین در گیاه برنج نشان می‌دهد کرونتین در تحریک پیری و تولید متابولیت‌های ثانویه مشابه با جاسمونات عمل می‌کند. یکی از این متابولیت‌ها ترکیبات ضد قارچی فیتوآلکسین‌ها مانند مامی لاکتون A و B، اریزالکسین A و ساخارانترین می‌باشند (Tamogami *et al.*, 1997). اثر کرونتین در تخفیف برخی تنش‌های محیطی از جمله شوری، خشکی، سرما و یخ‌زدگی در برخی گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Wang *et al.*, 2008). گزارشات حاکی از این مورد است که تا حدی کرونتین توانسته اثرات منفی تنش‌های محیطی را کاهش دهد (Wang *et al.*, 2008) ولی اثر آن بر کاهش تنش ناشی از نانوذرات اکسیدروی هنوز بدون پاسخ مانده است. بنابراین هدف این تحقیق، بررسی تیمار کرونتین بر تنش ناشی از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره زیتون در گیاه سویا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره برگ‌های زیتون

تهیه عصاره برگ‌های زیتون

برگ‌های زیتون از گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع‌آوری شدند. برگ‌ها دو بار با آب برای حذف ذرات گرد و غبار و آلودگی شسته شدند. ۱۰ گرم از برگ‌ها توزین و پس از قطعه‌قطعه شدن در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر قرار داده شدند. به ارلن، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و ارلن بر روی دستگاه هیتر استیرر با دمای ۸۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، محتویات ارلن سرد و سپس از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شدند. عصاره به‌دست آمده داخل شیشه‌های تیره داخل یخچال برای ادامه آزمایش قرار گرفتند.

تهیه نانوذرات اکسیدروی

مقادیر ۸۰ میلی‌لیتر از عصاره در داخل بشر روی هیتر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۵ گرم نمک نیترات روی به عصاره ها اضافه شد و روی هیتر که قبلا در دمای هیتر استیرر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد (سرعت rpm ۴۰۰ استیرر) به مدت نیم ساعت تنظیم گردیده بود، قرار داده شدند. بعد از این مدت زمان، مخلوط واکنش حالت خمیری پیدا کرده، خمیر بدست آمده در داخل آون در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط بدست آمده به‌وسیله هاون چینی پودر شد و پودر حاصل برای خالص‌سازی ۳ بار سانتریفوژ گردید و سپس برای تعیین مشخصات آماده گردید.

آماده سازی نمونه برای طیف سنجی فرابنفش/مرئی (UV-visible)

برای طیف سنجی فرابنفش/مرئی ۰/۱ گرم پودر نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاهان زیتون را به طور جداگانه با ۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کردیم و با توجه به اینکه نانوذرات اکسیدروی دارای پیک حداکثر در محدوده ۳۰۰-۵۵۰ نانومتر می‌باشد، جذب آن در طول موج‌های ۳۰۰-۵۵۰ نانومتر برای بررسی بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی اندازه‌گیری گردید. سپس نمودارهای طیف جذبی نمونه‌های مورد مطالعه توسط نرم افزار اکسل رسم گردید.

بررسی تصویر نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

نمونه‌ها ابتدا به مدت ۵ دقیقه با ریتم خاموش/روشن ۱۵ به ۱۵ ثانیه با امواج فراصوت تیمار شدند و سپس بر روی گرید میکروسکوپ قرار گرفته و تصاویر با بزرگ‌نمایی‌های در مقیاس متفاوت گرفته شد. میکروسکوپ‌های استفاده شده در این پژوهش Carl zeiss, Philips و مدل LE0912-AB ساخت شرکت آلمان بود.

مطالعه اثر نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زیتون در گیاهان سویا همراه با پیش‌تیمار کروناتین

بعد از سنتز نانوذرات و تعیین مشخصات فیزیکوشیمیایی، مطالعه اثر نانوذرات بر روی پارامترهای پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید و برخی از آنزیم‌های گیاه سویا بررسی شد. نمونه بذرهای سویا (*Glycine max*) از شرکت بذر اهواز تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت.

پیش‌تیمار دانه های سویا با کروناتین

بذرهای سویا پس از ضدعفونی با وایتکس ۳۰ درصد به مدت یک دقیقه، ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس دانه‌های ضدعفونی شده سویا به پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی انتقال داده شدند و داخل این پتری دیش‌ها ۲۰ میلی‌لیتر

آب مقطر (به‌عنوان شاهد) و ۲۰ میلی لیتر کروماتین ۵۰ نانومولار ریخته شد. دانه‌های سویا به مدت ۷۲ ساعت تحت تیمار کروماتین و آب مقطر بودند و هر روز کاغذ صافی و محلول تعویض شد. بعد از این مدت، دانه‌های جوانه زده داخل پتری دیش های جدید حاوی کاغذ صافی انتقال داده و به مدت ۴۸ ساعت گیاهچه ها با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر آبیاری شدند .

تیمار گیاهچه های سویا توسط نانوذرات سنتز شده اکسیدروی

به‌منظور تیمار، گیاهچه‌ها به شیشه‌هایی به ابعاد 10×8 سانتی‌متر حاوی آگار، محلول هوگلند ۵۰ درصد و نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون در غلظت‌های مختلف ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm انتقال داده شدند. سپس شیشه ها به اتاق کشت با شرایط کشت ۱۶ ساعت روشنایی (دما 28°C) و ۸ ساعت تاریکی (دما 22°C) انتقال داده شدند. بعد از یک هفته گیاهان به لیوان های حاوی پرلیت در شرایط گلخانه منتقل شدند. به مدت یک ماه گیاهان داخل شرایط گلخانه نگهداری و هر هفته ۳ بار تنها با محلول هوگلند آبیاری شدند. بعد از یک ماه گیاهان برای سنجش جمع‌آوری شدند.

پراکسیداسیون لیپیدها و پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دآلدئید که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشند، اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری مالون‌دآلدئید (MDA) با توجه به روش Heath و Packer (۱۹۶۹) اندازه‌گیری شد. ۰/۲ گرم از بافت فریز شده برگ، وزن و با ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه عصاره ی حاصل در دور 10000g سانتریفوژ شد. ۴ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، به یک میلی لیتر از محلول روئی حاصل از سانتریفوژ، اضافه شد. مقدار مالون‌دآلدئید بر حسب نانومول بر گرم وزن تر بیان شد. اندازه‌گیری محتوای پراکسید هیدروژن بر طبق روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. طبق این روش، ابتدا برگ گیاه با محلول تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در حمام یخ سائیده شد و سپس ب مدت ۱۵ دقیقه عصاره در سانتریفوژ یخچال دار (Centrifuge 5804R, Germany) از شرکت Eppendorf، در 10000g سانتریفوژ گردید.

اندازه گیری فعالیت آنزیم با روش اسپکتروفتومتری

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

به‌این منظور یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با $\text{pH } 7/2$ سائیده شد که شامل اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی مولار و

پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر طبق روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) و براساس کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Dhindsa et al., 1981).

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)، مخلوط واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، آسکوربات ۵ / ۰ میلی‌مولار، بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مول با $pH=7.4$ ، H_2O_2 ۰/۱۵ میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار بود (Nakano & Asada, 1981). سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوترازولیم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار ($pH=7.4$)، NBT ۰/۰۷۵ میکرومولار، ۰/۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۷۵ میکرومولار ریوفلاوین، ۱۳ میلی‌مولار متیونین و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. (Giannopolotis & Ries, 1977).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا‌لیاز (PAL)

برای تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-HCL (۵۰ میلی‌مولار) حاوی بتامرکاپتواتانول (۱۵ میلی‌مولار) در هاون سرد شده سائیده شد. سپس سانتریفوژ عصاره بدست آمده با دور ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. برای سنجش فعالیت آنزیم محلول رویی مورد استفاده قرار گرفت.

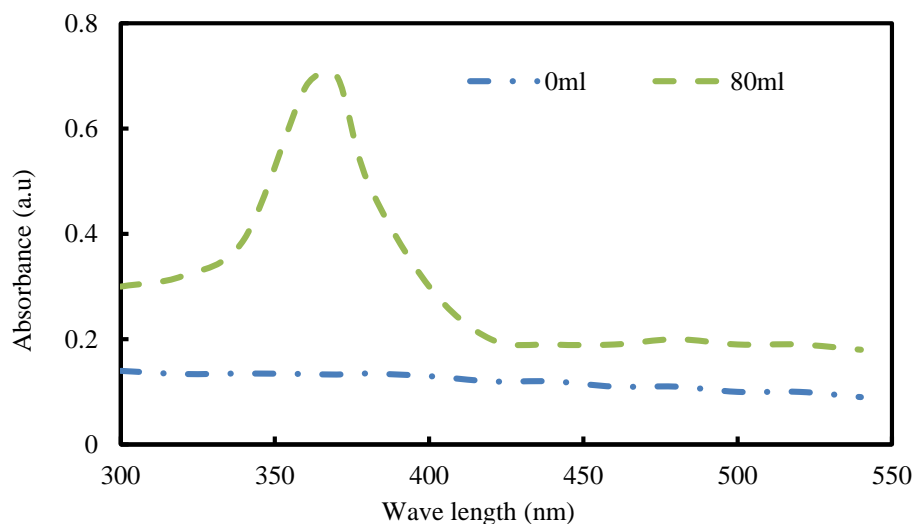
واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیا‌لیاز کاتالیز می‌شود. بر اساس سرعت تشکیل اسید سینامیک، فعالیت آنزیم PAL تعیین می‌گردد. به ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج شامل ۰/۵ میلی‌لیتر ال-فنیل آلانین (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۴ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری گردید. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (۱۰ درصد) پایان می‌پذیرد. میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از ضریب خاموشی $9500 M^{-1}cm^{-1}$ غلظت سینامیک اسید بدست آمد (Hahldbrock & Rogg, 1975).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش بر اساس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16) و مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج آنالیز جذب اسپکتروفوتومتری UV-visible نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون

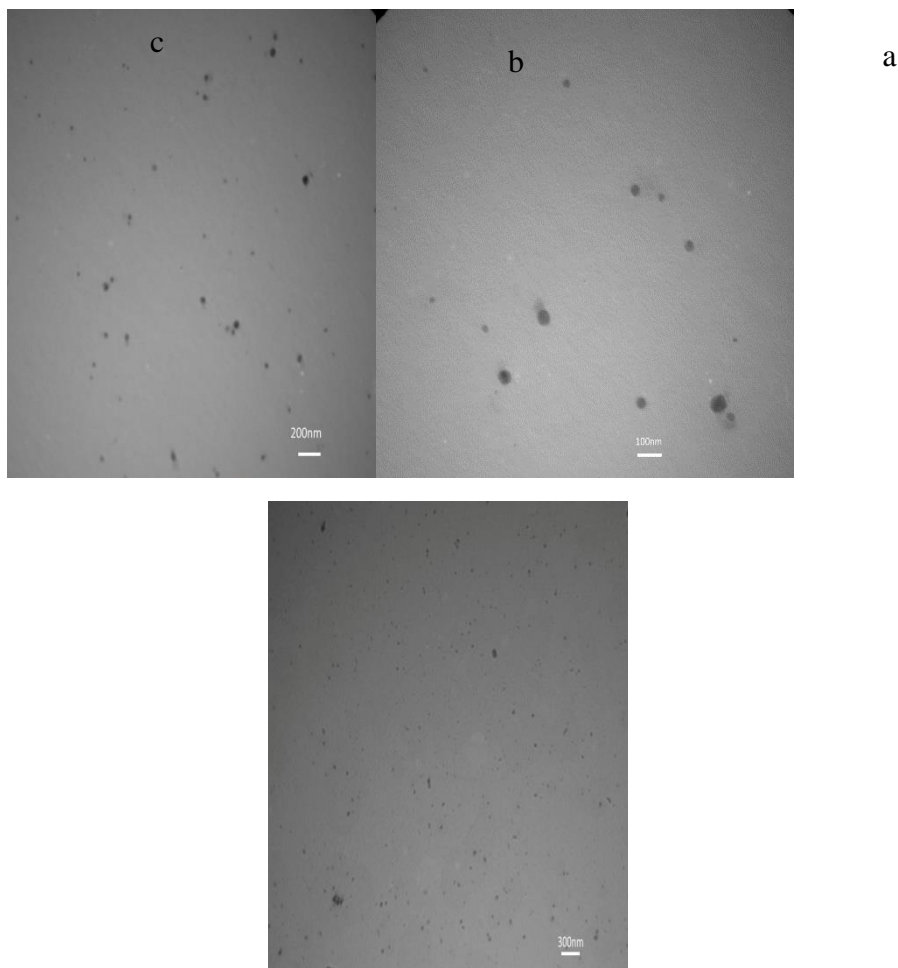
نتایج آنالیز نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط گیاه زیتون با دستگاه اسپکتروفوتومتری UV-visible در غلظت ۸۰ میلی‌لیتر عصاره، در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به طیف مشاهده می‌شود که ماکزیمم جذب نانوذرات اکسیدروی سنتز شده ۳۶۰ نانومتر می‌باشد.



شکل ۱. نمودار طیف جذبی UV-visible نانوذرات اکسیدروی سنتز شده در عصاره زیتون.

نتایج مطالعات میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

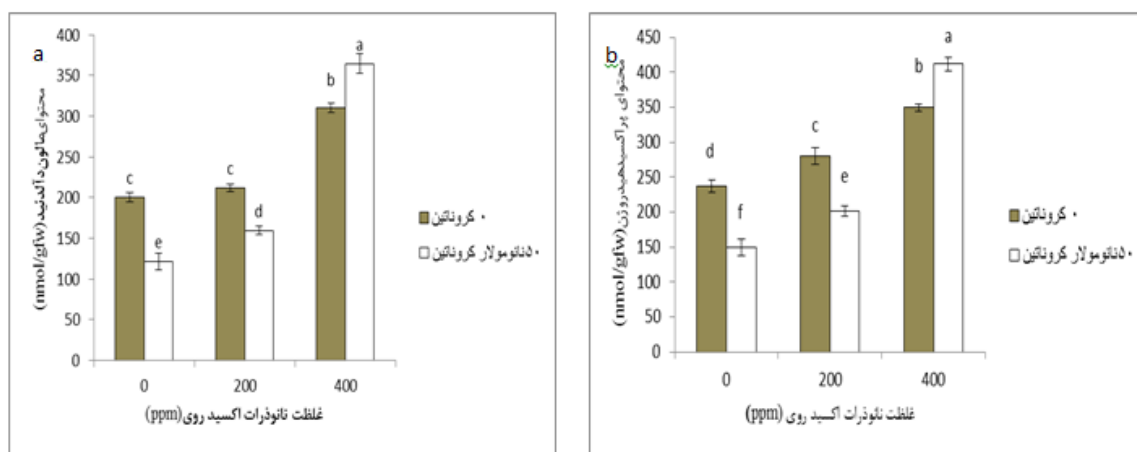
به منظور بررسی شکل، اندازه دقیق نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. میانگین اندازه نانوذرات زیتون ۴۱ نانومتر بدست آمد (شکل ۲). همچنین توسط میکروسکوپ مشاهده شد که شکل نانوذرات کروی می‌باشد.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط عصاره زیتون. (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی با مقیاس ۱۰۰ نانومتر، (b) مقیاس ۲۰۰ نانومتر و (c) مقیاس ۳۰۰ نانومتر.

نتایج محتوای مالون دآلدئید و محتوای پراکسید هیدروژن

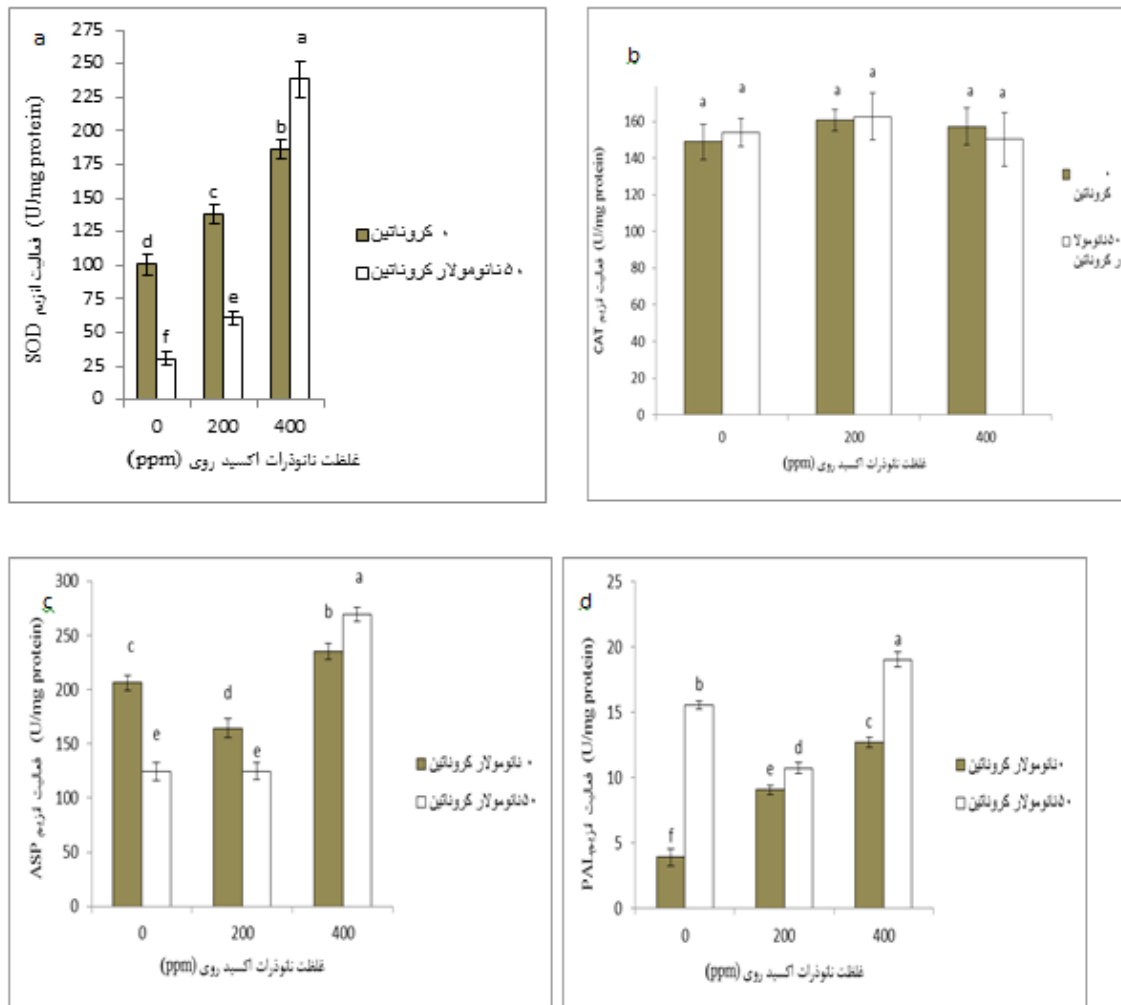
محتوای مالون دآلدئید در تیمار نانوذرات با غلظت ۲۰۰ ppm تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت اما در غلظت ۴۰۰ ppm محتوای مالون دآلدئید افزایش یافت (3a). تیمار کروناتین در حضور نانوذرات در غلظت ۲۰۰ ppm باعث کاهش محتوای مالون دآلدئید و در غلظت ۴۰۰ ppm باعث افزایش شد. محتوای پراکسید هیدروژن تحت تیمار با نانوذرات اکسیدروی در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm باعث افزایش محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد گردید (3b). تیمار کروناتین در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی به ترتیب باعث کاهش و افزایش محتوای پراکسید هیدروژن شده است. کروناتین در شرایط بدون تنش منجر به کاهش محتوای پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد گردید.



شکل ۳. اثر نانوذرات اکسیدروی و کروماتین بر محتوای مالون‌دآلدئید (a)، پراکسید هیدروژن (b) در سویا (میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری و بر اساس آزمون دانکن، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند).

نتایج فعالیت آنزیم‌ها

با توجه به شکل ۴a با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنزیم SOD نیز افزایش می‌یابد. تیمار کروماتین نیز به‌تنهایی باعث کاهش فعالیت آنزیم SOD نسبت به شاهد شد. تیمار کروماتین به همراه نانوذرات در غلظت ۲۰۰ ppm باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD نسبت به تیمار تنها نانوذرات گردید. تیمار نانوذرات در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm بر فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد تاثیر معنی‌داری نداشت (۴b). تیمار کروماتین تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد نداشت. تیمار کروماتین به همراه نانوذرات در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به تیمار تنها نانوذرات نداشت (۴b). فعالیت آنزیم ASP در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm به ترتیب نسبت به شاهد کاهش و افزایش یافت. تیمار کروماتین باعث کاهش فعالیت آنزیم ASP نسبت به شاهد گردید. تیمار کروماتین به همراه نانوذرات در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm به ترتیب باعث کاهش و افزایش فعالیت آنزیم ASP نسبت به تیمارهای تنها نانوذرات گردید (۴c). تیمار نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد گردید که در غلظت ۴۰۰ ppm فعالیت بیشتری نسبت به غلظت ۲۰۰ ppm دارد. تیمار کروماتین به‌تنهایی باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد گردید و تیمار کروماتین توأم با نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL گردید.



شکل ۴. اثر نانوذرات اکسیدروی و کروناتین بر فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، ASP، PAL در سویا (میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری و بر اساس آزمون دانکن، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند).

بحث و نتیجه‌گیری

نانومواد توده‌های اتمی یا ملکولی با اندازه‌ی ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. سنتز نانوذرات فلز در سال‌های اخیر توجه دانشمندان را در زمینه‌هایی به ویژه در صنایع شیمیایی، فیزیکی، مواد، بیولوژیکی و پزشکی، نوری، مهندسی و علوم مکانیکی به خود جلب کرده است. برخی از روش‌های مصنوعی مانند روش سل ژل، تکنیک‌های کاهش و الکتروشیمیایی هستند (Jain et al., 2009). این روش‌ها پر هزینه، سمی و خطرناک هستند و نیاز به انرژی و فشار بالا دارند (Rajiv et al., 2013). امروزه فناوری نانو نیاز به سنتز نانومواد با ترکیب، اندازه و مورفولوژی مختلف همراه با کنترل عالی بر این ویژگی‌ها دارد (Jain et al., 2009). توسعه فرآیندهای سنتز نانومواد بدون آلودگی و سازگار با محیط زیست یک جنبه مهم از فناوری نانو است. با توجه به نیاز برای

به حداقل رساندن و یا حذف استفاده از مواد مضر زیست محیطی به عنوان اصول شیمی سبز، سنتز نانوذرات با استفاده از روش زیستی توجه فراوانی را به خود جلب کرده است. سنتز زیستی (بیولوژیکی) نانوذرات یک جایگزین ساده برای بیشتر روش‌های سنتزی پیچیده فیزیکی و شیمیایی است. روش بیوسنتز زیستی شامل موجودات زنده، مانند باکتری‌ها، قارچ (Nejad *et al.*, 2016) و گیاهان و عصاره‌های گیاهی (Rajiv *et al.*, 2013) می‌باشد.

در میان روش‌های سنتز سبز نانوذرات، سنتز توسط عصاره مقبولیت بیشتری نسبت به بقیه روش‌های سنتز سبز دارد و آن به دلیل کنترل آسان‌تر رشد نانوذرات و همچنین عدم نیاز به خارج کردن باقیمانده موجودات از مواد سنتز شده است. سنتز نانوذرات از عصاره گیاهان حنا (Kumar *et al.*, 2011)، برگ چای (Bar *et al.*, 2009) استفاده شده است. در این پژوهش نیز نانوذرات اکسیدروی توسط عصاره زیتون سنتز شد. تایید سنتز نانوذرات اکسیدروی توسط آنالیزهای UV-visible و میکروسکوپ TEM صورت گرفت. اولین آزمایشی که برای تایید نانوذرات صورت می‌گیرد، آنالیزهای UV-visible می‌باشد. نانوذرات سنتز شده توسط عصاره زیتون دارای حداکثر جذب در طول موج ۳۶۰ نانومتر بود. مشابه با نتایج ما Rajiv و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانوذرات اکسیدروی را توسط عصاره گیاه *Parthenium hysterophorus* سنتز کردند که حداکثر جذب در طول موج ۳۵۸ نانومتر بود (Rajiv *et al.*, 2013). از طرف دیگر، نانوذرات به دلیل اثرات خاص و ویژگی‌های منحصر به فردشان، ورود گسترده‌ای به دنیای کشاورزی و بیولوژی داشته‌اند. این ذرات به اشکال مختلف در محیط زیست آزاد شده و تاثیرات ناشناخته آنها بر موجودات زنده و اکوسیستم، موجبات نگرانی‌های بسیاری را فراهم آورده است (Lin & Xing, 2007). گیاهان جز اساسی و ضروری تمام اکوسیستم‌ها می‌باشند و نقش اساسی در سرنوشت و جابه‌جایی نانومواد در محیط، از طریق جذب ایفا می‌کنند. یکی از آسیب‌های جدی ناشی از حضور نانوذرات به گیاه، خسارت به غشاء است. این پدیده نتیجه تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که منجر به پراکسیداسیون لیپید، افزایش نفوذ پذیری غشاء و خسارت به سلول می‌شود (Cui *et al.*, 2010). غشاهای سلولی به عنوان اولین جایگاه تخریب نانوذرات بررسی شده‌اند و مطالعات نشان داده است که تخریب غشاهای سلولی به علت پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌باشد که می‌تواند ناشی از تولید ROS و یا تحریک آنزیم لیپواکسیژناز باشد (Halliwell, 1987). افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو در اکثر تنش‌های محیطی نظیر حضور نانوذرات گزارش شده است. بنابراین اندازه‌گیری مالون دآلدئید‌های تولید شده در طی پراکسیداسیون لیپیدها شاخص خوبی برای تخمین میزان آسیب اکسیداتیو وارد شده به غشای سلول‌ها می‌باشند (Sun *et al.*, 2007). در این مطالعه مقدار مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن در سویا در غلظت بالای نانوذرات (۴۰۰ ppm) افزایش یافت. چنین به نظر می‌رسد، افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن در سطح بالای نانوذرات اکسید روی تا حدی زیاد بوده است که حذف آن‌ها با سیستم‌های دفاعی آنزیمی خارج از توان گیاه بوده است. بنابراین مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو ایجاد شده کافی نبوده و این امر موجب خسارات بیشتر در بسیاری از فاکتورهای مورد

سنجش در این پژوهش گردیده است. گزارشات متعددی نشان می‌دهند که در حضور نانوذرات اکسیدروی مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی در گیاهان حساس افزایش می‌یابد. القای تنش اکسیداتیو و افزایش MDA در اثر تیمار نانوذرات اکسید مس و آهن در گیاهان برنج (Shaw & Hossain, 2013)، کدو تنبل (Wang *et al.*, 2011) نیز گزارش گردیده است. تیمار برنج با نانوذرات اکسید مس (Shaw & Hossain, 2013) و روی (Dimkpa *et al.*, 2012) نیز منجر به پراکسیداسیون لیپید غشا گردید. همچنین محتوای پراکسید هیدروژن در گیاهان تیمار شده با نانوذرات سزیم دی اکسید نسبت به شاهد افزایش یافت (Rico *et al.*, 2013). نانوذرات اکسیدروی دارای فعالیت فوتوکاتالیستی است و قادر به تولید رادیکال‌های آزاد است (Xia *et al.*, 2008). نتایج استفاده از پیش تیمار کروناتین روی سویا نشان داد که کروناتین موجب کاهش پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها در سویا گردیده است. شاید کروناتین از طریق افزایش وضعیت ثبات و تمامیت غشای سلولی موجب بهبود رشد گیاهچه‌ها شده است. Wang و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی اثر پیش تیمار کروناتین بر گیاهچه‌های ذرت تحت تنش خشکی، مطرح کردند کروناتین با کاهش تنش اکسیداتیو موجب افزایش محتوای کلروفیل و ثبات غشا در گیاهچه‌ها می‌گردد (Wang *et al.*, 2008). مطالعه اثر کروناتین بر گیاه خیار در معرض دمای پایین نیز نشان داده شده است که غلظت‌های ۱ و ۱۰ نانومولار کروناتین با افزایش ثبات غشا، رشد گیاهچه‌های تحت تنش را بهبود می‌بخشد. محققین بیان کرده‌اند که مشابه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد، اثر کروناتین بر متابولیسم گیاهان نیز بسیار وابسته به غلظت می‌باشد.

برای مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده در اثر نانوذرات در گیاهان یکسری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با کارایی بالا وجود دارند که توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را دارند. ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و فلاونوئیدها از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند. ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، شلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با دادن سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می‌کنند و قادرند که محصولاتی با قدرت اکسید کنندگی کمتر از ترکیبات اولیه به وجود بیاورند (Roback & Gryglewski, 1988; Chu *et al.*, 2000).

نتایج مشابه مربوط به افزایش سطح ترکیبات فنلی در گیاهان گندم (Anderson *et al.*, 2012) و گیاه *Arabidopsis thaliana* (Kumar *et al.*, 2013) به ترتیب در پاسخ به مس و طلا مشاهده شده است. همچنین، Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که نانوذرات نقره زیستی باعث افزایش محتوای ترکیبات فنلی *Bacopa monnieri* شد. از آنجا که همه این ترکیبات از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و سینامیک اسید خود محصول عمل دامیناز آنزیم PAL روی فنیل آلانین می‌باشند، به نظر می‌رسد که تغییرات در فعالیت PAL می‌تواند یکی از دلایل برای تغییر مقدار این ترکیبات در گیاهان باشد. فنیل آلانین

آمونیاک‌آزیم اصلی مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که با دامیناسیون تبدیل L-فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید را انجام می‌دهد. سینامیک اسید اولین حدواسط برای سنتز ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، فلاونوئیدها، تانن و لیگنین می‌باشد (Solecka, 1997; Singh *et al.*, 2009). تغییرات در فعالیت PAL و سایر آنزیم‌های دخیل در مسیر فنیل پروپانوئید و تجمع انواع ترکیبات فنلی می‌تواند جزء اولین مراحل پاسخ به تنش‌ها باشد (Wen *et al.*, 2008, Solecka, 1997). در نتیجه افزایش فعالیت و بیان PAL، ترکیبات فنلی نظیر فنلیک اسیدها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در بافت‌های تحت تنش تجمع می‌یابند و گیاهان را علیه تنش‌های زنده و محیطی محافظت می‌نمایند (Dixon & Paiva, 1995). در این مطالعه فعالیت PAL در نمونه‌های در معرض غلظت پایین و بالای نانوذرات اکسیدروی افزایش داشت. افزایش فعالیت PAL در گیاه خردل در معرض نانوذرات روی نیز گزارش شده است (Rao & Shekhawat, 2015). بنابراین در تنش‌ها محتوای فنل افزایش می‌یابد تا اثرات مضر تنش را کاهش دهد. با این وجود تنش خشکی بیان ژن PAL در گیاه چای را کاهش داده است (Singh *et al.*, 2009). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که گیاهان در شرایط مختلف و بسته به شدت تنش‌ها پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند. در این پژوهش گیاه سویا در غلظت پایین نانوذرات اکسیدروی (۲۰۰ ppm) فعالیت PAL را افزایش داد که این ترکیبات بخشی از اثرات سمیت نانوذرات اکسیدروی را مهار نموده است. ولی افزایش فعالیت PAL و ترکیبات فنلی در غلظت بالای نانوذرات (۴۰۰ ppm) نتوانسته اثرات مخرب نانوذرات اکسیدروی را بهبود دهد. پیش تیمار گیاهان با کروماتین در این تحقیق فعالیت آنزیم PAL را بطور معنی‌داری افزایش داده است. نتایج بررسی اثر کروماتین در افزایش تحمل به یخ‌زدگی در خیار حاکی از این مطلب است که ترکیب کروماتین با فعالیتی مشابه با جاسمونات از طریق افزایش فعالیت PAL، مقاومت خیار به آسیب‌های ناشی از یخ‌زدگی در گیاه را افزایش می‌دهد (Wang *et al.*, 2009). در حالت طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت جاروب کردن و نابودی آن‌ها از سطح سلولی تعادل وجود دارد که این گیاه را در حالت نسبتاً پایدار نگه می‌دارد. در یک تعریف کلی تنش اکسیداتیو زمانی بروز پیدا می‌کند که میزان رادیکال‌های آزاد موجود در سلول از مقدار ترکیبات سم‌زدا و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه تجاوز کند (Maksymiec, 2007; Garg & Singla, 2011). آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز به همراه آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌باشند. آنزیم SOD اولین خط دفاعی در برابر گونه‌های فعال اکسیژن است و باعث حذف گونه‌های سوپر اکسید (O_2^-) می‌شود و تولید آب اکسیژنه (H_2O_2) و اکسیژن ملکولی می‌کند. از طرف دیگر آنزیم‌های CAT و آسکوربات پراکسیداز مسئول جاروب کردن H_2O_2 اضافی در بافت‌های گیاهی هستند (Prasad & Strzatka, 2002). در پژوهش حاضر، تیمار نانوذرات اکسیدروی منجر به افزایش فعالیت آنزیم SOD در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm نانوذرات شده است و فعالیت آنزیم ASP در غلظت ۴۰۰ ppm در گیاه سویا افزایش یافت اما تیمار نانوذرات بر روی فعالیت آنزیم CAT تاثیر معنی‌داری نداشت. گیاه سویا برای جاروب کردن H_2O_2 تولید شده توسط نانوذرات تنها

فعالیت آنزیم ASP را افزایش داده و آنزیم CAT نقش چندانی در جاروب کردن H_2O_2 نداشته است. به نظر می‌رسد فعالیت آنزیم ASP برای جاروب کردن H_2O_2 موثر نبوده است و محتوای H_2O_2 در شرایط تیمار نانوذرات بالاست. موافق با نتایج ما، تحقیقات انجام شده روی اثر نانوذرات نقره بر گیاه *Arabidopsis thaliana* اثر افزایشی فعالیت آنزیم‌های SOD را گزارش کردند (Nair & Chung, 2015). همچنین Cecilia Barrios و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که هیچ کدام از غلظت‌های نانوذرات اکسید سزیم بر فعالیت آنزیم CAT در مقایسه با شاهد تاثیر معنی داری نداشته اما بر فعالیت آنزیم ASP اثر کاهشی داشته است. Servin و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات اکسید تیتانیوم منجر به افزایش فعالیت آنزیم ASP در گیاه مورد مطالعه شد. با وجود مطالعات متعدد فعالیت‌های آنزیم در سمیت نانوذرات در گیاهان مختلف در معرض نانوذرات، فعالیت متفاوتی را نشان می‌دهد. مطالعات، اثرات نامنظم و غیر قابل پیش‌بینی از نانوذرات در فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد؛ به‌عنوان مثال، نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید فعالیت‌های SOD, CAT, APOX را در اسفناج (Lei *et al.*, 2008) افزایش داده اما فعالیت آنزیم GR و APOX در باقلا کاهش یافته است (Foltete *et al.*, 2011). Zhao و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که فعالیت ASP در ذرت در معرض نانوذرات اکسید سزیم افزایش یافت. از مطالعات فوق، می‌توان به این نتیجه رسید که گیاهان می‌توانند در غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات، تعادل گونه‌های فعال اکسیژن را با افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان برقرار کنند. با این حال، غلظت‌های بالاتر نانوذرات به شدت سمی هستند و موجب اکسیداتیو شدید در گیاهان و در نتیجه، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان می‌شوند. علیرغم اینکه تیمار نانوذرات در غلظت ۴۰۰ ppm در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD و ASP در گیاه سویا را افزایش داده است، با این وجود، چنین به نظر می‌رسد که این افزایش برای جبران تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در اثر سمیت نانوذرات کافی نبوده و میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان بیشتر بوده است. بنابراین در گیاهان در معرض نانوذرات بخصوص در غلظت بالای آن، تنش اکسیداتیو (پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به غشاء) رخ داده است. در این پژوهش، پیش‌تیمار گیاهان با کروناتین موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های APX و SOD در گیاهان گردید و تغییر معنی داری بر فعالیت آنزیم CAT نداشت.

نتیجه‌گیری

عصاره گیاه زیتون به‌عنوان یک عامل کاهنده و پایدار کننده برای سنتز زیستی نانوذرات اکسیدروی در محلول آبی استفاده شد. میانگین اندازه نانوذرات زیتون توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری ۴۱ نانومتر بدست آمد. همچنین توسط میکروسکوپ مشاهده شد که شکل نانوذرات کروی می‌باشد. تیمار نانوذرات اکسیدروی سنتز شده توسط زیتون با پیش‌تیمار کروناتین باعث تغییر پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه سویا شد. بررسی نانوذرات اکسیدروی بر گیاه سویا نشان داد که فعالیت آنزیم‌های ASP, PAL, SOD، پراکسید هیدروژن و مالون دالدئید افزایش یافت. محتوای مالون دالدئید در غلظت ۲۰۰

ppm نانوذرات اکسیدروی تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت اما فعالیت آنزیم SOD افزایش معنی داری نسبت به شاهد یافت. پیش تیمار کروناتین تنها در غلظت ۲۰۰ ppm نانوذرات اکسیدروی تنش‌های ایجاد شده را بهبود بخشد.

منابع

- Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, HJ., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S. & Panneerselvam, R. 2009. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiol Plant*, 31, 427-436.
- Ai, L., Li, Z.H., Xie, Z.X., Tian, X.L., Eneji, A.E. & Duan LS. 2008. Coronatine Alleviates Polyethylene Glycol-induced Water Stress in Two Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *J Agric Crop Sci*, 194, 360-36.
- Anderson, & A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J Nano Res*, 14(9), 1-15.
- Bar, H., Bhui, D.K. & Sahoo, G.P. 2009. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids Surf A*, 339,134-139.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F. & Gross, D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 266-292.
- Block, A., Schmelz, E., Jones, J.B. & Klee, H.J. 2005. Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Mol plant pathol*, 6(1), 79-83.
- Boonyanitipong ,L. P., Kositsup, B., Kumar, P., Baruah, S. & Dutta, J. 2011. Toxicity of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germinating rice seed. *Int J Biosci Biochem*, 1, 282-285.
- Cecilia Barrios, A., Cyren, M., Trujillo-Reyes, J. & Medina-Velo, A. 2015. Effects of uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate, and citric acid on tomato plants. *Science of the Total Environment*, 1-9.
- Cui, X.M., Zhang, Y.K., Wu, X.B. & Liu, CS. 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. *Plant Soil Environ*, 56 (6), 274-281.

- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. & Thrope, T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid per oxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J Exp Bot*, 32(1), 93-101.
- Dimkpa, C.O., McLean, J.E., Latta, D.E., Manangon, E., Britt, D.W., Johnson, W.P., Boyanov, M.I. & Anderson, A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J Nanoparticle Res*, 14,1-15.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenyl propanoide metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. & Turner, J.G. 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, 6, 751-759.
- Foltete, A.S., Masfaraud, J.F. & Bigorgne, E. 2011. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environ Pollut*, 159,2515-2522.
- Garg, N. & Singla, P. 2011. Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ Chem Let*. 9, 303-321.
- Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol*. 59, 309-314.
- Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem Phys Lipids*. 44, 327-340.
- Heath, R.L. & packer, L. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189-198 .
- Jain, D., Daima, H.K. & Kachhwaha, S. 2009. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Dig J Nanomater Bios*, 4,557-563.
- Jung, S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or morflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiol Biochem*, 42, 225-31.

- Khodakovskaya ,M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F. & Biris, A.S. 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*, 3(10), 3221-7.
- Krishnaraj, C., Jagan, E.G. & Ramachandran, S.M. 2010. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem*, 47,651–658.
- Kumar, P.K., Paul, W. & Sharma, PC. 2011. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: characterization and blood compatibility. *Process Chem*, 46, 2007–2013.
- Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V., Yadav, S.K. 2013. Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Total Environ*, 461,462–468.
- Lee ,C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y., Braam, J. & Alvarez. P.J.J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem*, 29, 669-675
- Lee ,W.M., An, Y.J., Yoon, H. & Kwbon, H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiates*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environment Toxicology Chemistry*, 27,1915-1921.
- Lei, Z., Mingyu, S. & Xiao, W. 2008. Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biol Trace Elem Res*, 121,69–79.
- Lin ,B.S., Diao, S.Q., Li, C.H., Fang, L.J., Qiao, S.C. & Yu, M. 2004. Effects of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai Larch seedlings. *J Res*, 15,138-140.
- Lin ,D. & Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut*, 150, 243-250.
- Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant*, 29, 177-187.
- Mithofer, A., Maitrejean, M. & Boland W. 2005. Structural and biological diversity of cyclic octadecanoids, jasmonates, and mimetics. *Plant Growth Reg*, 23, 170-178.
- Nair, P.M.G. & Chung, I.M. 2015. Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiol Plant*, 37(1), 1719.

- Nakano, V. & Asada, K. 1981. Hydrogen Peroxide is scavenged by ascorbate-specific Peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22, 867-880.
- Nejad, M.S., Khatami, M. & Bonjar, G.H.S. 2016. Extracellular synthesis gold nanotriangles using biomass of streptomyces microflavus. *IET Nanobiotechnol*, 10 (1), 33–38.
- Pandey ,A. C., Sanjay, S. S. & Yadav, R. S. 2010. Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum* L. *J Exp Nanosci*, 5, 488-497.
- Prasad, M.N.V. & Strzatka, K. 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. (Eds.). *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 15,423- 432.
- Prasad, T.N.V.K.V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Reddy, K.R., Sreeprasad, T.S., Sajanlal, P.R. & Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr*, 35(6),905–927 .
- Rajiv, P., Rajeshwari, S. & Venckatesh, R. 2013. Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 112, 384–387.
- Rao, S. & Shekhawat, G.S. 2015. Toxicity of ZnO engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in *Brassica juncea*. *J Environ Chem Engin*, 2, 105–114.
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J., Peralta-Videa, J.R., Rico, C.M., Hong, J. & Morales, M.I. 2013a. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging, *Environ Sci Technol*, 47,5635–5642.
- Roback, J. & Gryglewski, R. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharma*, 37, 837-841.
- Sanchez-Viveros, G., Ferrera-Cerrato, R. & Alarcon, A. 2010. Short term effects of As-induced toxicity on growth, chlorophyll and Carotenoid contents and total content of phenolic compounds of *Azolla filiculoides*. *Water Air and Soil Pollut*, 217(1-4), 455-462.
- Servin, A. D., Morales, M. I., Castillo-Michel, H., Hernandez-Viezcas, J. A., Munoz, B., Zhao, L. J., Nunez, J.E., Peralta-Videa, J.R. & Gardea-Torresdey, J. L. 2013. Synchrotron verification of TiO₂ accumulation

- in Cucumber fruit: A possible pathway of TiO₂ nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environ Sci Technol*, 47(20), 11592-11598.
- Shaw, A.K. & Hossain, Z. 2013. Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 93,906–915.
- Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A. & Ahoja, P.S. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavon-3-ols) accumulation in tea. *Funct Integr Genom*, 9(1), 125-134
- Solecka, D. 1997. Role of phenyl propanoid compounds in plant responses to different stress factor. *Acta Physiol Plant*, 19(3), 257-268.
- Sun, B., Jing, Y., Chen, K., Song, L., Chen, F. & Zhang, L. 2007. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). *Plant Physiol*, 164, 536-543.
- Tamogami, S. & Kodama, O. 2000. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochem*, 54, 689-694.
- Velikova, V., Yordanov, I. & Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci*, 151, 59-66.
- Wang, B., Zhaohu, L., Eneji, E., Tian, X., Zhai, Z. Li. J. & Duan, L. 2008. Effects of coronatine on growth, gas exchange traits, chlorophyll content, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in maize (*Zea mays* L.) seedling under simulated drought stress. *Plant Prod Sci*, 11, 283-290.
- Wang, H., Kou, X. & Pei, Z. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita maxima*) plants. *Nanotoxicology*, 5,30–42.
- Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q.H. & Hung, W.D. 2008. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Reg*, 55(1), 1-10.
- Xia, T., Kovochich, M. & Liong, M. 2008. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, 2,2121–2134.

Yan, Z.F., Wei, J.K. & Zhou, X. 1999. Effects on the resistance water stress for India millet seedling by coronatine treatment. *Chin Agric Sci Bull*, 15, 11-14.

Zhao, L., Peng, B., Hernandez-Viezcas, J.A., Rico, C., Sun, Y., Peralta-Videa, J.R., Tang, X., Niu, G., Jin, L., Varela, A., Zhang, J. & Gardea-Torresdey, J.L. 2012. Stress response and tolerance of Zea mays to CeO₂ nanoparticles: cross talk among H₂O₂, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS Nano*, 6, 9615–9622.

Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.B, Schaller, A., He, S.Y & .Howe, G.A. 2003. Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv .tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J*, 36, 485-499.

Zhu, H., Han, J. & Xiao, J.Q. 2008. Uptake, translocation and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *J Environ Monit*, 10,713–717.

Evaluation the Effect of Coronatine Pretreatment on Zinc Oxide Stress Synthesized by Olive on Soybean plant

Sh. Hashemi Shahraki¹, F. Mohamadhasani^{2*}

Received:2020.7.27
Accepted:2020.11.25

Abstract

Green synthesis of nanoparticles by plants extract has achieved a growth in interest. In the present study, Zinc oxide nanoparticles were synthesized by Olive extract. Morphological and structural properties of the synthesized Zinc oxide nanoparticles have been characterized using UV-Vis spectrophotometer, TEM analysis. Then, the effect of Zinc oxide nanoparticles at concentrations of 0, 200 and 400 ppm with pretreatment Coronatine (0 and 50 nM) on the parameters of Hydrogen peroxide and Malondialdehyde and Catalase (CAT) enzymes, Ascorbate peroxidase (ASP), superoxide dismutase (SOD), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) was investigated. Synthesized Zinc oxide nanoparticles were confirmed by maximum absorption at wavelength of 360 nm. TEM image revealed that Zinc oxide nanoparticles were spherical with average size 41 nm. Investigation of Zinc oxide nanoparticles on Soybean showed that at concentrations of 400 ppm Zinc oxide nanoparticles, enzyme activity of ASP, PAL, SOD, Hydrogen peroxide and Malondialdehyde increased. The content of Malondialdehyde at a concentration of 200 ppm of Zinc oxide nanoparticles did not change the activity significantly compared to the control, but the activity of the SOD enzyme increased significantly compared to the control. Pretreatment of Coronatine improved stress at 200 ppm Zinc oxide nanoparticles and reduced the content of Hydrogen peroxide and Malondialdehyde, but Coronatine increased this content at 400 ppm Zinc oxide nanoparticles.

Keywords: *Coronatine, Hydrogen peroxide, Malondialdehyde, Zinc oxide nanoparticles.*

1- Assistant professor, Biology Department, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

2- Assistant professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

*(Corresponding author: fereshtehmhasani@yahoo.com)