ارزیابی اثر الیسیتور غیرزیستی بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه سیر

پریسا فتحی رضایی*

ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۱۲

چکیده

نانوذرات به دلیل ویژگیهای منحصربه فرد فیزیکوشیمیایی کاربرد گسترده‌ای در زمینه زیست‌فناوری دارند. سیر (*Allium sativum*) از دیرباز به صورت گسترده به عنوان دارو و ادویه استفاده می‌شود. آلیسین به عنوان مهم‌ترین ماده مؤثره سیر اثرات زیستی بسیار متنوعی دارد. هدف این پروژه، بررسی اثر دو الیسیتور غیرزیستی نانوذرات نقره و نیترات نقره بر رشد و برخی از پارامترهای بیوشیمیایی ریزنمونه‌های سیر می‌باشد. در گیاهان تیمار شده با نیترات نقره، وزن تر، میزان آلیسین و پروتئین، فعالیت آنزیمهای کاتالاز و گایاکول پراکسیداز کمتر از گیاهان کنترل اندازه‌گیری شد. در غلظت ۲۵ میلی گرم در لیتر نانوذره نقره افزایش رشد و محتوای آلیسین و پروتئین نمونه‌ها مشاهده شد. میزان آلیسین نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات نقره در هر دو غلظت بالاتر از بقیه تیمارها، گیاهان در معرض نیترات نقره ۲۵ میلی گرم در لیتر مشابه کنترل و در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر از همه تیمارها کمتر بود. به دلیل نقش مهم آلیسین در خواص دارویی سیر احتمالاً نانوذرات نقره کاندیدای خوبی برای افزایش میزان آلیسین سیر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلیسین، آنزیم آنتی اکسیدان، الیسیتور زیستی، پروتئین، سیر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱-۳۷۲۷۳۰۶۰، پست الکترونیک: parisafathirezaei@gmail.com

مقدمه

سیر با نام علمی *Allium sativum* گیاهی از راسته مارچوبه‌ایها و متعلق به خانواده لیلیاسه است. متابولیت ثانویه در سیر اسید آمینه غیرپروتئینی به نام آلئین است که تحت تأثیر آنزیم آلییناز به ترکیب فرار دی آلیل تیوسولفینات (آلیسین) تبدیل می‌شود (۱۸). آلیسین به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات ارگانوسولفوره سیر دارای خواص زیستی و دارویی وسیعی از جمله ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضدفشارخون، ضدآرتریت، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، ضدپیری، سم‌زدایی فلزات سنگین و کاهنده قند و چربی خون می‌باشد (۶).

الیسیتورها ترکیباتی هستند که از طریق القای پاسخهای دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیتهای ثانویه می‌شوند. امروزه با پیشرفت فناوری، روشهای متعددی برای تولید متابولیتهای ثانویه وجود دارد شامل استفاده از الیسیتورهای زیستی مانند الیسیتورهای قارچی، باکتریایی و مخمر و الیسیتورهای غیرزیستی مانند پلی ساکاریدها، گلیکوپروتئینها، آنزیمهای غیر فعال شده و نمکهای فلزات سنگین (۷). الیسیتورها ممکن است با فعالسازی ژنهای برخی از آنزیمها در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی کنند و باعث تشکیل متابولیتهای ثانویه شوند. میزان اثر الیسیتور بر تولید متابولیتهای ثانویه در کشت بافت به غلظت و مدت زمان تیمار وابسته است (۲۵).

نانوذرات نقره (AgNPs) حاوی یونهای نقره هستند و معمولاً دامنه اندازه آنها از ۱۰۰- ۱۰ نانومتر متغیر است. این نانوذرات، به دلیل اندازه کوچک‌شان دارای سطح تماس بالا می‌باشند. بنابراین، میزان چسبندگی آنها به

سطوح سلولی افزایش یافته و به همین دلیل کارآیی آنها نسبت به سایر ترکیبات بیشتر می‌شود (۲۳). بسته به خواص نانو ذرات، این مواد در گیاهان بسیاری از تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی را اعمال می‌کنند. اثر نانو ذرات به ترکیب شیمیایی، اندازه، پوشش سطح، واکنش-پذیری و از همه مهمتر غلظت نانوذره وابسته بوده و از گیاهی به گیاه دیگر متفاوت است (۲۴).

با این حال، گزارشهای بسیار کمی در ارتباط با تأثیر نانوذرات نقره بر عملکرد و میزان تولید متابولیتهای ثانویه گیاهی وجود دارد. با بررسیهای انجام شده در پایگاههای اطلاعاتی مختلف تاکنون گزارشی مبنی بر تأثیر نانوذرات نقره بر میزان تولید آلیسین در گیاه سیر وجود ندارد. بر همین اساس، در این تحقیق تأثیر غلظتهای مختلف نیترات نقره ($AgNO_3$) و نانوذرات نقره بر تولید آلیسین گیاه سیر در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای بررسی شده است.

مواد و روشها

کشت و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و اعمال تیمارها: صفحه پایگاهی بوته‌های سیر شهرستان آذرشهر (واقع در استان آذربایجان‌شرقی) پس از ضدعفونی سطحی با توئین و محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد و الکل اتیلیک ۷۰ درصد به ترتیب به مدت ۳۰ و ۱۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل در محیط کشت جامد موراشیگ و اسگوک (MS) کشت شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS کشت و پس از ۴ هفته به محیطهای کشت تازه حاوی غلظتهای مختلف نانوذره نقره (اندازه ۴/۵ نانومتر و کروی شکل، توسط آقای دکتر رستم‌نیا همکار محترم گروه شیمی دانشگاه سنتز شده بود) و نیترات نقره (۰، ۲۵ و ۵۰ میلی-گرم در لیتر) منتقل شدند. به مدت یک هفته تمامی ریز-نمونه‌ها در داخل فیتوترون با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری، و نمونه-های جمع‌آوری شده به منظور انجام آزمایشهای بعدی در فریزر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رشد ریزنمونه‌های سیر: قبل از جمع‌آوری، ویژگیهای مورفولوژیکی نمونه‌ها بررسی شد. میزان وزن تر نمونه‌ها با استفاده از ترازو ثبت شد.

عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی به منظور بررسی محتوی آلیسین: عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی و بررسی محتوی آلیسین به روش ایبرل انجام شد (۱۶). بدین منظور، یک گرم از بافت تر گیاهی ساییده، و با افزودن ۳۰ میلی‌لیتر آب در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با فاز متحرک به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در خاتمه محلول رویی به منظور سنجش میزان آلیسین در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. بررسی میزان آلیسین نمونه‌های سیر با استفاده از دستگاه HPLC و ستون C_{18} در طول موج ۲۵۴ نانومتر، سرعت جریان حلال ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک شامل متانول، آب و استونیتریل به نسبت ۹ : ۴۱ : ۵۰ انجام شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر عصاره گیاهی به دستگاه تزریق شد. محتوای آلیسین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس زمان بازداری به دست آمده از ترکیب استاندارد و سطح زیر منحنی پیکهای مربوط به هر نمونه، با استفاده از نمودار استاندارد آلیسین محاسبه شد.

سنجش میزان سیستئین کل: میزان سیستئین محلول کل به روش گایتوند اندازه‌گیری شد (۱۲). به این صورت که ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی با ۱ میلی لیتر اسید پرکلریک ۵ درصد به مدت ۶ دقیقه در سونیکاتور قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده، بعد از اتمام زمان مورد نظر، محلول رویی جمع‌آوری و برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری، ابتدا ۲۰۰

میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر معرف نین هیدرین و ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از اتمام زمان مورد نظر، سریعاً به حمام آب سرد انتقال داده و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظتهای مختلف سیستئین (۱۵ و ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲، ۱ میکروگرم در میلی لیتر) رسم و در نهایت غلظت سیستئین محلول نمونه‌های گیاهی با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم بر گرم بافت‌تر گیاهی محاسبه شد.

استخراج و سنجش پروتئین محلول کل از گیاهچه‌های سیر: مقدار نیم گرم از بافت تر گیاهی در هاون چینی با افزودن ۵۰ میلی گرم پلی وینیل پیرولیدن (Polyvinylpyrrolidone) و ۱/۵ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم (pH=7) ساییده و با دور ۱۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز رویی در ویالهای کوچکتر تقسیم و ویالها در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد به منظور انجام مطالعات بعدی نگهداری شد. میزان پروتئین محلول کل در این بررسی به روش بردفورد تعیین شد (۲).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC: 1.11.1.6) به روش ابی اندازه گیری شد (۴). به این ترتیب که ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰میلی مولار (pH=7) آب مقطر استریل و پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی مولار محلول در بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (PH=7) (۷۵۰ میکرولیتر) مخلوط شدند. فعالیت آنزیم کاتالاز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اندازه-گیری شد. از مخلوط بدون عصاره آنزیمی به عنوان بلانک استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز به صورت تعداد میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

$$\text{فعالیت آنزیم (واحد در میلی لیتر)} = \frac{\Delta A_{240} \times I \times V_t \times df}{V_s \times t \times l \times \square}$$

ΔA_{240}: تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

l: ضریب پراکسیدهیدروژن در معادله، V_t: حجم مخلوط واکنش، df: فاکتور رقیق‌کننده، t: مدت زمان واکنش، V_s: حجم نمونه،

ε: ضریب خاموشی برابر ۳۹/۴ $mM^{-1}cm^{-1}$ و l: طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش.

سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POX, EC: 1.11.1.7) به روش چانس و مهلی اندازه گیری شد (۱۰). مخلوط واکنش شامل محلولهای بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (PH=7)، گایاکول ده میلی مولار محلول در آب دوبار تقطیر، پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=7)، آب دوبار تقطیر استریل و عصاره آنزیمی است. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد. از مخلوط بدون عصاره آنزیمی به عنوان بلانک استفاده شد. فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز به صورت تعداد میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

$$\text{فعالیت آنزیم (واحد در میلی لیتر)} = \frac{\Delta A_{270} \times I \times V_t \times df}{V_s \times t \times l \times \square}$$

ΔA_{270}: تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش، l: ضریب پراکسیدهیدروژن در معادله، V_t: حجم مخلوط واکنش، df: فاکتور رقیق‌کننده، t: مدت زمان

واکنش، V_s: حجم نمونه، ε: ضریب خاموشی برابر $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶ و l: طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش.

آنالیز آماری: به منظور مقایسه نتایج به‌دست آمده و تعیین اهمیت تفاوتهای مشاهده شده در آزمایشات از نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۲) استفاده شد. جهت بررسی تفاوت بین گروههای آزمایشی از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و سپس برای مقایسه میانگین گروهها از آزمون دانکن استفاده شد. نتایج آزمایشها به صورت Mean±S.D. داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزا ارائه و نتایج آنالیزهای آماری با مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. رسم نمودارها به وسیلهMicrosoft Excel انجام گرفت.

نتایج

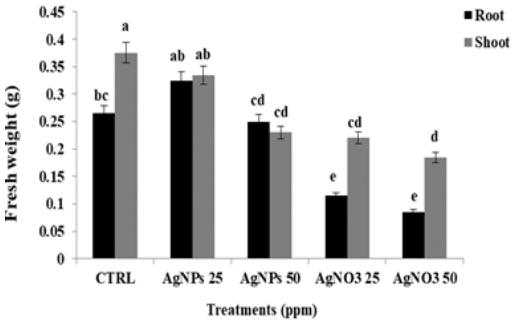
پس از اینکه نرمال بودن توزیع اشتباهات آزمایشی توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف تک نمونه‌ای و بررسی یکنواختی واریانس گروههای آزمایشی با استفاده از آزمون لون در سطح احتمال ۵ درصد، تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمون فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام پذیرفت که در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ریزنمونه‌های گیاه سیر

منابع تغییر	df	میانگین مربعات (M.S)					
		گایاکول پراکسیداز	کاتالاز	پروتئین	سیستئین	آلیسین	وزن تر
اندام	۱	۱۳/۲۷۶ **	۰/۰۷۸ n.s	۳۲/۸۹۶ **	۲۵۲۳/۳۸۱ **	۴۴/۴۳۲ **	۰/۰۱۹ **
تیمار	۴	۳/۶۶ **	۰/۱۳۸ *	۲/۶۲ **	۱۸۷۲/۳۷ **	۱۷۶/۰۷۳ **	۰/۰۳۱ **
اندام × تیمار	۴	۱۲/۳۵ **	۲/۴۴ **	۲/۲۵ **	۳۶۱/۶۶ **	۸۰/۴۵ **	۰/۰۱۵ *
خطا	۱۰	۰/۰۴۵	۰/۰۴۰	۰/۰۲۸	۶/۶۱۶	۳/۰۸۶	۰/۰۰۱

n.s، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

تأثیر نانوذره نقره و نیترات نقره بر رشد ریزنمونه‌های سیر: اثر اعمال الیسیتورها بر وزن تر گیاه در شکل ۱ آمده است.

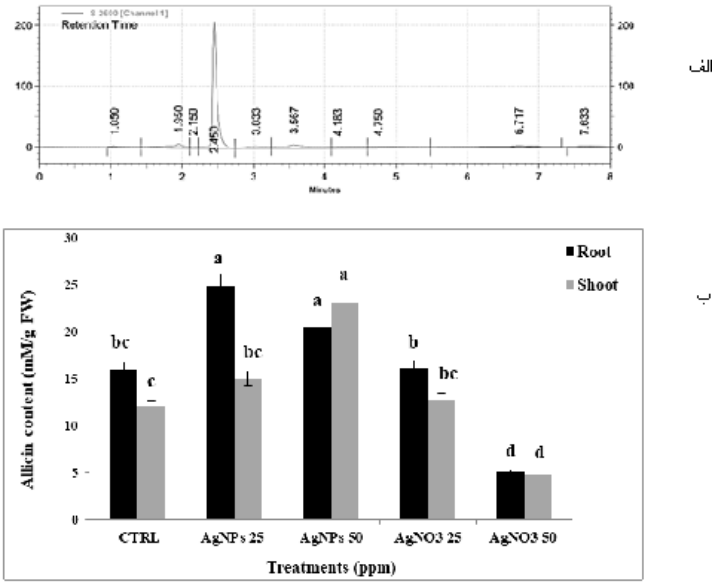


شکل ۱- تأثیر نانوذرات نقره و نیترات نقره بر وزن تر ریزنمونه‌ها. میانگینهای با حروف متفاوت بالای نمودارها در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند. CTRL: کنترل، AgNPs: نانوذرات نقره و $AgNO_3$: نیترات نقره.

کاهش معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) وزن تر در ریشه‌های تیمار شده با نیترات نقره ۲۵ و و۵۰ میلی گرم در لیتر نسبت به کنترل مشاهده شد. در بخش هوایی نمونه‌های تیمار شده با نیترات نقره ۵۰، نانونقره ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر کاهش معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) وزن تر نسبت به کنترل مشاهده شد.

تأثیر نانوذره نقره و نیترات نقره بر میزان آلیسین ریزنمونه‌های سیر: کروماتوگرام آلیسین مورد استفاده برای اندازه‌گیری میزان آلیسین بیوسنتز شده در نمونه‌های گیاهی در شکل (۲-الف) و میزان تولید آلیسین در نمونه‌های مختلف گیاهی با استفاده از این کروماتوگرام به صورت نمودار در شکل (۲-ب) نشان داده شده است. در نمونه-های تیمار شده با نانونقره ۲۵ میلی گرم در لیتر در هر دو بخش ریشه و هوایی میزان آلیسین نسبت به کنترل افزایش نشان داد که افزایش در بخش ریشه معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) بود. میزان آلیسین در نمونه‌های تیمار شده با نانونقره ۵۰ میلی گرم در لیتر در بخش ریشه و هوایی

افزایش معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) نسبت به کنترل مشاهده شد. در نمونه‌های تیمار شده با نیترات نقره ۲۵ میلی گرم در لیتر میزان آلیسین در هر دو بخش هوایی و ریشه تفاوت معنی‌دار با نمونه های کنترل مشاهده نشد، در مقابل میزان آلیسین در نمونه‌های در معرض ۵۰ میلی گرم در لیتر نیترات نقره میزان آلیسین در هر دو بخش کاهش قابل توجه و معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) نسبت به کنترل نشان داد.

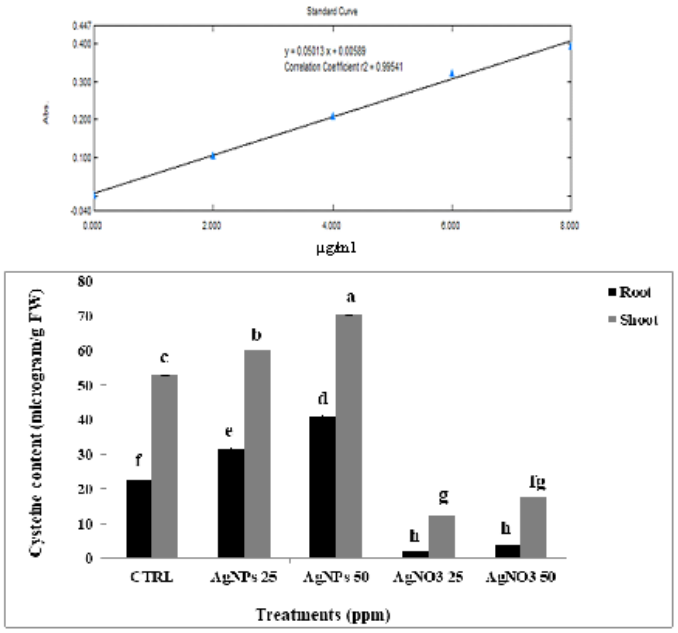


شکل ۲- اثر الیسیتور نانوذره نقره و نیترات نقره بر میزان آلیسین بخش ریشه و اندام هوایی ریزنمونه‌های سیر. الف) کروماتوگرام HPLC آلیسین. ب) میزان محتوای آلیسین تام در ریزنمونه‌های سیر تحت تیمار با نانوذره نقره (AgNPs) و نیترات نقره ($AgNO_3$) است. میانگینهای با حروف متفاوت بالای نمودارها در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

اثر الیسیتور نانوذره نقره و نیترات نقره بر محتوای سیستئین تام ریزنمونه‌های سیر: از آنجائی که اسید آمینه سیستئین پیش ماده سنتز آلیسین می‌باشد، لذا تغییرات میزان سیستئین نمونه‌های سیر در پایان بازه‌های زمانی مورد نظر مورد سنجش قرار گرفت که نتایج در شکل ۳ آمده است. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی میزان سیستئین تحت تیمارهای مختلف، بیشترین میزان اسیدآمینه سیستئین و تفاوت معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) با تمام گروهها در نمونه‌های تیمار شده با نانوذره نقره سنجش شد که در هر دو بخش ریشه و بخش هوایی مربوط به غلظت ۵۰ میلی-گرم در لیتر نانوذره نقره بود. در بخش ریشه و هوایی گیاهان در معرض نیترات نقره کمترین میزان اسیدآمینه سیستئین نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد.

تأثیر نانوذره نقره و نیترات نقره بر میزان پروتئین کل ریزنمونه‌های سیر: نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل در نمونه‌های گیاهی در شکل ۴ نشان داده شده است. میزان پروتئین کل بخش هوایی در نمونه‌های تیمار شده و نشده به طور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بیشتر از میزان آن در بخش ریشه بود. بیشترین میزان پروتئین در بخش هوایی گیاهان تیمار شده با نانو ذره نقره ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. میزان پروتئین بخش ریشه در نمونه‌های تیمار شده با نیترات نقره ۵۰ میلی گرم در لیتر کمتر از سایر تیمارها بود.

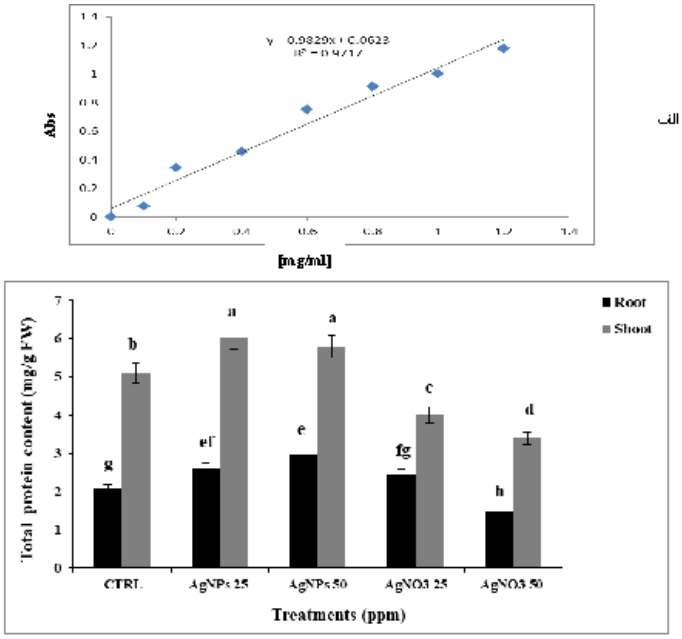
تأثیر تیمار نانوذره نقره و نیترات نقره بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ریزنمونه‌های سیر: نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در نمونه‌های گیاهی در شکل ۵ نشان داده شده است.



الف

ب

شکل ۳- اثر الیسیتور نانوذره نقره و نیترات نقره بر محتوای سیستئین تام ریزنمونه‌های سیر. الف) منحنی استاندارد سیستئین. ب) میزان محتوای سیستئین تام در ریزنمونه‌های سیر تحت تیمار با نانوذره نقره (AgNPs) و نیترات نقره ($AgNO_3$). میانگینهای با حروف متفاوت بالای نمودارها در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

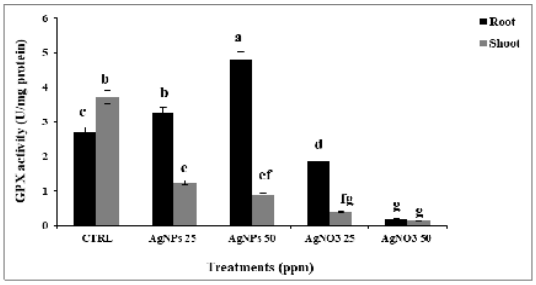


الف

ب

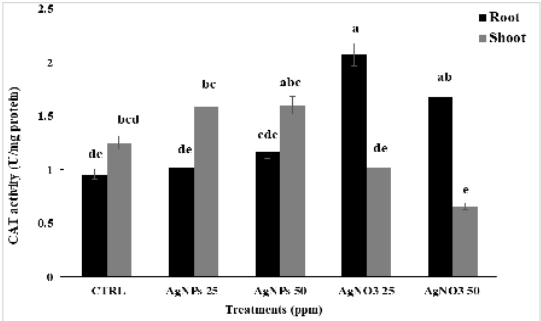
شکل ۴- اثر الیسیتور نانوذره نقره و نیترات نقره بر میزان پروتئین کل بخش ریشه و اندام هوایی ریزنمونه‌های سیر. الف) نمودار استاندارد پروتئین سرم آلبومین گاوی. ب) میزان پروتئین نمونه‌های تیمار شده با نانوذره نقره (AgNPs) و نیترات نقره ($AgNO_3$). میانگینهای با حروف متفاوت بالای نمودارها در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

با توجه به نتایج حاصل، در بخش ریشه گیاهان تیمار شده با نانوذره نقره در هر دو غلظت، فعالیت آنزیم افزایش معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) نسبت به شاهد، در مقابل در بخش اندام هوایی در هر دو غلظت نانو ذره نقره میزان فعالیت آنزیم کاهش معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) نسبت به شاهد مشاهد شد. در گیاهان تیمار شده با نیترات نقره در هر دو غلظت و در هر دو بخش کاهش معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) نسبت به کنترل مشاهده شد.



شکل ۵- اثر الیسیتور نانوذره نقره و نیترات نقره بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) بخش ریشه و اندام هوایی ریزنمونه‌های سیر. میانگینهای با حروف متفاوت بالای نمودارها در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

تأثیر تیمار نانوذره نقره و نیترات نقره بر فعالیت آنزیم کاتالاز ریزنمونه‌های سیر: با توجه به نتایج بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز (شکل ۶) فعالیت آنزیم در بخش ریشه گیاهان تیمار شده با نیترات نقره نسبت به کنترل به طور معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) نسبت به شاهد افزایش اما در بخش هوایی نسبت به شاهد کاهش مشاهده شد. در بخش ریشه و هوایی گیاهان تیمار شده با نانوذره نقره تفاوت معنی‌دار نسبت به کنترل مشاهده نشد.



شکل ۶- اثر الیسیتور نانوذره نقره و نیترات نقره بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بخش ریشه و اندام هوایی ریزنمونه‌های سیر. میانگینهای با حروف متفاوت بالای نمودارها در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

بحث

تجمع نقره در غلظتهای بالا، احتمال اثرات کشنده آن را افزایش می‌دهد. سمیت نقره در محیطهای آبی به غلظت یونهای نقره آزاد وابسته است و کاهش میزان دسترسی زیستی به یون نقره از سمیت آن می‌کاهد. به طور کلی در میان ترکیبات نقره‌دار، ترکیبات قابل حل مانند نیترات نقره سمیت بیشتری نسبت به اشکال غیرقابل حل نقره دارند. حساسیت گونه‌های عالی خشکی‌زی گیاهی در برابر سمیت ناشی از نقره متنوع است (۱).

بر اساس گزارش سیف سهندی و همکاران، پاشش برگی نیترات نقره (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی مولار) و نانوذره (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی مولار) بر ویژگیهای رویشی و فیتوشیمیایی گیاه گل گاوزبان در مرحله گل‌دهی، به طور معنی‌داری ویژگیهای رشدی (مانند تعداد برگ، سبزینگی برگها، وزن خشک گیاه، وزن خشک گل آذین و ریزش گلبرگ) و فیتوشیمیایی (محتوای فنول، تانن و آلکالوئید، درصد موسیلاژ و شاخص تورم) را افزایش داد. که از میان تیمارهای استفاده شده، تیمار ۰/۶ میلی مولار نانوذرات نقره از بقیه تیمارها کارآیی بیشتری داشت (۲۸). در مطالعه استامپلیس و همکاران، نانوذرات اکسید روی تفاوت معنی-داری در جوانه‌زنی بذر گیاه کدو سبز و رشد طول ریشه این گیاه ایجاد نکرد، درحالی که اعمال غلظت مشابه نانوذرات مس و نقره باعث مهار رشد ریشه شد (۳۱). نانوذرات نقره با اندازه متفاوت (۸۰-۲۰ نانومتر) در گیاه شاهی تاله حتی در غلظت بسیار پایین، منجر به کاهش رشد این گیاه در مقایسه با گروه شاهد شد. در این آزمایش افزایش غلظت نانوذرات نقره، همراه با کاهش وزن تر ریشه و طول ریشه بوده است که این نتیجه می‌تواند به

دلیل افزایش سمیت نانوذره بوده باشد (۲۲). خاصیت ضد قارچی و باکتریایی نانوذرات نقره ـ سیلیکات در گیاهان نشان داده شده است. علاوه بر این، این ترکیب بدون عوارض سمی در گیاهان مورد آزمایش، به عنوان عامل کنترل کننده بیماری در گیاه نیز معرفی شده است (۱۹). با افزایش غلظت نانوذرات نقره، رشد ریشه گیاه *Lolium multiflorum* کاهش یافت که می‌تواند بیانگر افزایش سمیت نانوذرات باشد (۳۴). بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، تیمار نانوذره در هر دو غلظت و در هر دو بخش اثر کاهشی معنی‌دار بر میزان وزن تر ریزنمونه‌های سیر نسبت به شاهد نداشته، در مقابل، هر دو غلظت نیترات نقره در هر دو بخش موجب کاهش معنی‌دار میزان وزن تر نمونه‌ها نسبت به شاهد شده است که احتمالاً می‌تواند ناشی از اثر نیترات نقره باشد.

طی پژوهشهای متعددی، دانشمندان اقدام به اندازه‌گیری ترکیبات دارویی موجود در گیاه سیر و موسیر، به ویژه ترکیب دارویی آلیسین نموده‌اند و بدین منظور روشهای متعددی نیز پیشنهاد شده است. در روش HPLC مقدار آلیسین گزارش شده، بسته به محیط رشد گیاه، شرایط استخراج، روش سنجش، طول موج اندازه‌گیری، فاز متحرک و شدت جریان حلال نتایج مختلفی گزارش شده - است. در عصاره‌گیری موسیر با استفاده از اتانول و اتیل‌اتر و HPLC با فاز متحرک دی‌هیدروژن فسفات، اسید هپتان سولفونیک و استونیتریل، مقدار آلیسین را ۵/۷۸ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده است (۱۳). در حالی که میزان آلیسین در عصاره کلروفرمی موسیر به روش HPLC با فاز موبایل متانول، آب، اسید فرمیک، ۰/۱ ± ۳/۴ میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک تعیین شده است (۱۴).

مقدار آلیسین در عصاره آبی گیاه سیر به روش HPLC با فاز موبایل آب و متانول، ۰/۰۱ ± ۰/۴۸ میلی‌گرم در میلی-لیتر گزارش شده است (۸). مطالعه۲۴ واریته سیر جمع-آوری شده از نقاط مختلف ایران که با استفاده از اسید فرمیک، متانول و آب عصاره گیری شده بودند، میزان آلیسین به روش HPLC با فاز موبایل متانول و آب در تمام اکوتیپهای بررسی شده، بیشتر از استانداردهای بین‌المللی (۴/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گزارش شده است (۹).

در بررسی سیرهای کشت شده در آرژانتین، چین، ایتالیا و اسپانیا به ترتیب، میزان ۳/۶، ۳/۴،۷/۴، ۴/۵ میلی‌گرم آلیسین در یک گرم وزن‌تر گیاه گزارش شده است (۱۶). افزایش میزان آلیین در نمونه‌های سیر کشت شده در مزرعه تحت تأثیر کود سولفات کلسیم (۲۰۰ کیلوگرم در هکتار) گزارش شده است (۱۷). برخی از مطالعات نیز تأثیر شرایط محیطی بر محتوای آلیسین را اثبات کرده است. برای مثال مشخص شده که میزان آلیسین سیر نگهداری شده در مقایسه با سیر تازه برداشت شده بیشتر است و همچنین مشخص شده که دمای پایین محیط (۶-۴ درجه سانتی گراد) و رطوبت بالا باعث افزایش چشمگیر میزان آلیسین می‌شود. طبق گزارشهای انجام شده، دلیل این افزایش فعالیت حداکثری آنزیم گاما-گلوتامیل ترانس پپتیداز (آنزیم مرحله نهایی تشکیل آلیین) در دمای ۴ درجه سانتی گراد است (۳۲). در مرور منابع، گزارشی در مورد اثر نانوذرات بر میزان آلیسین گیاه سیر مشاهده نشد. میزان آلیسین نمونه‌های در معرض نانونقره در هر دو بخش نسبت به کنترل بیشتر بود، قابل ذکر است که در بخش ریشه و اندام هوایی به ترتیب کاهش و افزایش میزان آلیسین با افزایش غلظت مشاهده شد. در نمونه‌های تیمار شده با نیترات نقره ۲۵ میلی گرم در لیتر میزان آلیسین در هر دو بخش نسبت به کنترل تفاوت غیر معنی‌دار بود، اما در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کاهش شدید نسبت به کنترل مشاهده شد.

میزان پروتئین کل اندام هوایی در نمونه‌های در معرض نانوذرات نقره ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در مقابل میزان پروتئین کل هر دو بخش در گیاهان در معرض نیترات نقره کاهش معنی‌دار نسبت به کنترل نشان داد که نتایج با نتایج مربوط

به سنجش آنزیمی در ارتباط می‌باشد. در معرض قرار دادن گیاهان با فلزات سنگین موجب القای پاسخهای زیادی در سطح فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌گردد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که فلزات سنگینی مانند کادمیوم، سرب، نیکل و نقره موجب تغییر در مقدار پروتئین کل گیاهان می‌شوند (۳۳).

در مطالعات دیگری مشخص شده که نانوذرات نقره اعمال شده بر گیاه *Bacopa monnieri* باعث کاهش محتوای پروتئین و از طرفی، باعث افزایش میزان کربوهیدرات کل این گیاه شده است. گزارش شده که این نتایج، نشان دهنده برهمکنش این نانوذرات با پروتئینهای مرتبط با فتوسیستمها، مکانیسمهای سنتز نشاسته و یا انتقال کربوهیدراتها در گیاه بوده است (۲۱).

در تنش اکسیداتیو تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) باعث آسیب به DNA، پروتئینهای ساختاری و لیپیدها می‌شوند و همچنین می‌توانند واکنشهای زنجیره‌ای غیرقابل کنترل مثل واکنشهای اکسیداسیون و پراکسیداسیون را موجب شوند. از مهمترین عواملی که تنش اکسیداتیو در گیاهان را القاء می‌نمایند می‌توان به فلزات سنگین از قبیل کبالت، مس، آلومینیوم، نیکل و نقره اشاره کرد. گیاهان از طریق دو مسیر سیستم آنتی اکسیدان؛ آنزیمی و غیرآنزیمی سمیت این رادیکالها را کاهش می‌دهند. در شرایط‌کنترل شده از این‌فلزات می‌توان به عنوان محرک برای تولید متابولیتهای ثانویه که ارزش دارویی بسیاری دارند مورد استفاده قرار داد (۳). حفظ سطح مناسب و صحیح گونه‌های واکنشگر اکسیژن برای رشد و سیگنالینگ مهم می‌باشد، به عنوان مثال، گونه‌های واکنشگر اکسیژن در رشد قطبی سلول، مسیر سیگنالیگ اسید آبسیزیک و در پاسخ به پاتوژنها دخالت دارند (۱۱).

در مطالعه یوسفی و همکاران، فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار با غلظت ۲۵ میکرومولار الیسیتور نقره به صورت معنی‌دار نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان می‌دهد. ولی با افزایش غلظت الیسیتور در محیط (در تیمار با غلظتهای ۵۰ و ۱۰۰میکرومولار) فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی دار یافته است. کمترین میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار گزارش شد. اما کاهش فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار و افزایش جزئی آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. در مقابل، الیسیتور مس باعث افزایش منظم فعالیت این آنزیم در هر سه غلظت مورد استفاده گردید به طوری‌که با افزایش غلظت الیسیتور در محیط، فعالیت کاتالاز در کلیه تیمارها افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد نشان داد. غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار الیسیتور نقره باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با نمونه شاهد و تیمار با غلظت میکرومولار ۲۵ شد. بیشترین افزایش فعالیت این آنزیم در غلظت میکرومولار ۱۰۰ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با سایر غلظتها داشت. آنها بیان کردند که افزایش فعالیت پراکسیداز و کاتالاز که نقش مکمل در جاروب کردن و پاکسازی H_2O_2 دارند در گیاهچه‌های تیمار شده با الیسیتور نقره نسبت به گیاه شاهد، بیانگر اعمال تنش توسط این عنصر در گیاه می باشد. از طرف دیگر افزایش محتوای پروتئینهای محلول در گیاهچه‌های تیمار شده نسبت به گروه شاهد می‌تواند به دلیل افزایش مقدار آنزیمهای تعدیل کننده شرایط تنش از قبیل آنزیمهای آنتی‌اکسیدان و آنزیمهای درگیر در بیوسنتز ترکیبات آنتی اکسیدانی باشد (۳).

گزارش شده نانوذرات نقره در دانه‌رستهای *Brassica juncea* موجب کاهش تولید پر اکسیدهیدروژن و افزایش کارآیی واکنشهای ردوکس شدند. همچنین غلظتهای بالای نانونقره موجب افزایش فعالیت آنزیمهای متابولیزه کننده پراکسید هیدروژن شد (۲۹).

برگهای *Bacopa monnieri* (Linn.)Wettst. تحت تأثیر نانوذرات نقره، فعالیت بالای کاتالاز و پراکسیداز، کمترین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه کمترین میزان سمیت را نشان دادند. کاتالاز و پراکسیداز نقش مهم و اصلی را در حفاظت از گیاهان در معرض نانوذرات نقره در مقابل آسیب اکسیداتیو برعهده دارند. اثبات شده است که کاهش فعالیت توأم آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز موجب افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن درون سلولی که به طور مستقیم یا غیر مستقیم در پراکسیداسیون لیپیدها، پیری و مرگ سلولی گیاهی نقش دارند، می‌شود (۲۱).

در این مطالعه در بخش ریشه نمونه‌های تیمار شده با نانو نقره ۵۰ میلی گرم در لیتر افزایش قابل توجه فعالیت GPX نسبت به شاهد مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تولید ROS و حذف آنها و کاهش سمیت این ترکیبات می‌باشد. اما کاهش بسیار قابل توجه فعالیت آنزیم در نمونه‌های تیمار شده با نیترات نقره به احتمال به دلیل اثر مهاری این ترکیبات بر تولید پروتئین و در نتیجه آنزیمها می‌باشد. شایان ذکر است که کاهش معنی‌دار رشد نیز در تیمار نیترات نقره نسبت به شاهد نیز مشاهده شد.

همچنین، اضافه کردن نیترات نقره و نانوذرات نقره به محیط کشت گیاه شابیزک موجب تغییر فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان تحت شرایط کشت درون شیشه‌ای شده است. فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای نانوذرات نقره افزایش و در بقیه موارد فعالیت آنزیمها با کاهش مواجه شده است. این نتایج بیانگر آن است که کاربرد نانوذرات نقره در گیاه شابیزک، بیان برخی از پروتئینهای خاص را تنظیم می‌کند. در تحقیقی که بر روی گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* انجام شده است، ژنهای زیادی در پاسخ به نانوذرات نقره واکنش نشان دادند. یون نقره موجب افزایش بیان ژنهای دخیل در تنش اکسیداتیو نظیر سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز شده و از طرف دیگر، کاهش بیان ژنهای درگیر در پاسخ به پاتوژنها و هورمونها را به دنبال داشت (۲۰).

تغییر در میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت می‌تواند به عنوان سیگنالی برای تنظیم مکانیسمهای پاکسازی کننده گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمل نماید. نفوذپذیری غشایی نانوذرات نقره به مراتب نسبت به نیترات نقره بیشتر است. علت این امر به اندازه بسیار کوچک نانوذرات نقره مربوط است که موجب اتصال بیشتر به بافتهای گیاهی می‌گردد. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که تحرک یونهای نقره در نانوذرات نقره بسیار بالاتر از نیترات نقره و تیوسولفات نقره می‌باشد (۳۳).

نانوذره نقره تیمار شده با عصاره آبی برگهای *Acalypha indica* Linn. در گیاه *Bacopa monnieri* (Linn)*Wettst*، افزایش فعالیت پراکسیداز و کاتالاز را موجب شد و هیچگونه اثر سمی در مطالعات مورفولوژی مشاهده نشد. علاوه براین، انتقال نقره در ریشه و ساقه *B. monnieri* (Linn.) *Wettst* به وسیله اسپکتروفتومتر جذب اتمی تأیید شد. تیمار نانوذره نقره با عصاره *Acalypha indica* Linn موجب کاهش قابل توجه اثر سمی نانوذره بر جوانه زنی و رشد گیاه *B. monnieri* گردید (۲۱).

در گیاهان، نقش آنزیمهای کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به عنوان تنظیم‌کننده میزان پراکسید هیدروژن داخل سلولی بسیار مهم است، به طوریکه افزایش فعالیت این آنزیمها در تیمارهای مختلف، نشان‌دهنده کارآمدی مهار فعالیت ROS توسط سیستم آنتی اکسیدانی عنوان شده است (۱۵).

در مطالعات متعددی عنوان شده که آنزیم گایاکول پراکسیداز در مقایسه با کاتالاز حساسیت کمتری به وضعیت تنش دارد، در بیشتر موارد، سطح پایین پراکسیداز نشان دهنده شروع پاسخ غیراختصاصی گیاه به تنش است. نتایج برخی از مطالعات نیز نشان داده است که فعالیت پراکسیداز با افزایش غلظت نانوذرات اعمال شده کاهش

یافته است، کاهش معنی‌دار فعالیت گایاکول پراکسیداز در تیمارهای نانوذرات نقره و نیترات نقره در بخش هوایی ریزنمونه‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد. این نتایج به احتمال به دلیل غیر فعال شدن مولکولهای پراکسیداز توسط نانوذرات به دلیل جذب و یا سایر فعل و انفعالات شیمیایی و یا کاهش تولید آنزیم مربوط می‌شود (۳۰).

در مطالعه شبانی و همکاران، فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار نیترات نقره در تمام غلظتها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌مولار نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تنها در تیمار ۰/۱ میلی مولار کاهش معنی داری نسبت به شاهد نشان داد. فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش و در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار کاهش معنی‌داری نشان داد. آنها بیان کردند افزایش فعالیت آنزیمهای کاتالاز و گایاکول پراکسیداز توسط نیترات نقره نشان می‌دهد که این آنزیمها با همکاری هم در حذف پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند و نیز دلیلی بر شروع دفاع آنتی اکسیدان می‌باشد به طوری که به عنوان مثال پاسخ ناکافی یک آنزیم به نیترات نقره توسط افزایش فعالیت آنزیمی دیگر جبران می‌شود. کاتالاز در پراکسی‌زوم سلولهای گیاهی حضور دارد و مهمترین آنزیم برای حذف پراکسید هیدروژن است. این آنزیم سلولها را از اثرات سمی پراکسید هیدروژن از طریق تجزیه آنها به اکسیژن مولکولی و آب، بدون تولید رادیکالهای آزاد حفاظت می‌کند (۱).

طبق نتایج گزارش شده توسط Schutzendubel و همکاران، افزودن کادمیوم ۵۰ میکرومولار به کشت هیدروپونیک ریشه‌های *Pinus sylvestris* در ۶ ساعت اول باعث افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز می‌شود، و بعد از ۱۲ ساعت کاهش می‌یابد. در این تحقیق با توجه به اینکه فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام تیمارها افزایش یافته گزارش کردند که حذف اکسیژنهای فعال بیشتر از سایر آنزیمها بر عهده کاتالاز بوده و پاسخ ناکافی سایر آنزیمها را جبران کرده است. سایر آنزیمها در تمام تیمارها یا تغییر معنی‌داری نداشته یا کاهش یافتند (۲۷). تغییرات ایجاد شده در فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان ممکن است در ارتباط با تنش اکسیداتیو وارده به گیاه در اثر تجمع ROS ها در پی تیمار فلز سنگین نقره و همچنین تشدید فرآیند پراکسیداسیون لیپیدهای همسو با این تنش باشد. در کل افزایش فعالیت آنزیمی می‌تواند برابر با افزایش سرعت سمیت‌زدایی ROS ها در گیاه باشد. احتمالا علت کاهش فعالیت آنزیمها می‌تواند به دلیل تشدید اثرات مخرب نقره و یا ROS های القاء شده بر ساختار و فعالیت این آنزیمها باشد. مشخص شده که نقره می‌تواند جانشین فلزاتی که به عنوان کوفاکتور آنزیمی در ساختار آنزیم قرار دارند، گردد و به این ترتیب بر فعالیت آن اثر منفی داشته باشد (۲۶). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش نیز کاتالاز بیش از گایاکول پراکسیداز در حذف تنش حاصل از تیمارها موثر می‌باشد.

سیستئین نقش بسیار مهمی در ساختمان فضایی پروتئینها برعهده دارد چرا که عامل تیول سیستئین در یک زنجیره پلی پپتیدی با از دست دادن هیدروژن، پیوند کووالانس تشکیل می‌دهند و موجب پایداری واحدهای پروتئین می‌گردند. سیستئین یک اسید آمینه تیول‌دار در گیاهان می‌باشد که در تولید چند ترکیب سلولی مهم از جمله گلوتاتیون، متالوتیونینها، فیتوکلاتینها و هیدروژن سولفید به عنوان مولکول علامت دهنده شرکت دارد. همه این ترکیبات نقش مهمی در افزایش تحمل به تنشها ایفاء می‌کنند. غلظت سیستئین آزاد در گیاهان پایین بوده ولی فرآورده‌های حاصل از متابولیسم آن در گیاه متعدد است که ناشی از تقاضای بالا برای این فرآورده‌ها در شرایط عادی و تنش می‌باشد. با بررسی غلظتهای مختلف مس بر روی دو رقم ذرت گزارش دادند که تنش ایجاد شده موجب تجمع فلز در

قسمت اندام هوایی بوده و تفاوتهایی در مرحله جوانه‌زنی مشاهده شده است. با بررسی برخی پارامترهای بیوشیمیایی سطح گلوتاتیون، سیستئین و پراکسیداسیون لیپیدی با افزایش غلظت تنش مس افزایش یافت (۵).

در بررسی حاضر نیز میزان سیستئین در هر دو بخش با اعمال نانوذره نقره افزایش و در مورد تیمار نیترات نقره در هر دو بخش کاهش قابل توجه نسبت به کنترل مشاهده شد.

به طور کلی رفته می‌توان گفت ریزنمونه‌های سیر به تیمار نانوذرات نقره و نیترات نقره حساس است و میزان حساسیت به نیترات نقره بیشتر از نانوذرات نقره است. الیسیتور نیترات نقره بر خلاف نانوذره نقره در غلظتهای مشابه اعمال شده در زمان تیمار اثر منفی بر گیاه دارد که با کاهش معنی‌دار رشد، میزان آلیسین و سیستئین قابل مشاهده است. براساس نتایج، نانوذره نقره به دلیل نداشتن اثر سمی بر رشد و همچنین میزان پروتئین کل ریزنمونه-های سیر در غلظتهای به کار رفته در این بررسی و القاء افزایش میزان تولید آلیسین می‌تواند محرک خوبی برای افزایش تولید آلیسین با خواص ارزشمند دارویی باشد.

قدردانی و تشکر

این مقاله از طرح پژوهشی خاتمه یافته (به شماره ۹۴/د/۱۴۷۸) از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه مراغه مستخرج شده است. همچنین نویسنده از دانشگاه مراغه به دلیل حمایت مالی به منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱- شبانی، ل و صغیرزاده، ب. ۱۳۹۶. بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی اکسیدانی در کشت ساقه *Artemisia annua* L. تحت تنش نیترات نقره. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) شماره ۱ ، جلد ۳۰، صفحه ۱۳۱-۱۱۹.

۲- فتحی رضایی، پ و راکعی، ا. ۱۳۹۶. بررسی اثر ساکارز بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها و چندین پارامتر بیوشیمیایی گیاه تاتوره در شرایط کشت درون شیشه‌ای. دوره ۳۰، شماره ۴ زمستان، صفحه ۵۷۱-۵۵۸.

۳- یوسفی، ک.، ریاحی مدوار، ع و باقی‌زاده، ا. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر الیسیتورهای نقره و مس بر بیان ژن فلاون سینتاز و برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاهچه های زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) بومی ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۲۲۳-۲۱۰.

4-Aebi H. 1984. Catalase in vitro. Methods in enzymology. 105:121-6.

5-Aly, A. A., and Mohamed, A. A. 2012. The impact of copper ion on growth, thiol compounds and lipid peroxidation in two maize cultivars (*Zea mays* L.) grown in vitro, Australian Journal of Crop Science, 6(3), 541.

6-Amagas, H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic, Journal of Nutrition, 136, 716S-725S.

7-Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W. 2006. Elicitation of plants. Biotechnology & Biotechnology Equipment, 20(2), 72-83.

8-Arzanlou, M., and Bohlooli, Sh. 2010. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin, Food Chemistry, 120, 179–183.

9-Baghalian, K., Ziai, S.A., Naghavi, M.R., Khalighi, A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes, Scientia Horticulturae, 103(2), 155-166.

10-Chance B, Maehly A. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in enzymology, 2:764-75

11-Colville, L., and Smirnoff, N. 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficientArabidopsis thaliana vtcmutants, Journal of xperimental Botany, 59(14), 3857–3868.

12-Gaitonde, M. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Biochemical Journal 104(2): 627.

13-Ghani, M. 2010. Determination of alliin and allicin in different types garlic using high performance liquid chromatography, Journal of University of Anbar for Pure Science, 4(2).

14-Ghodrati Azadi, H., Ghaffari, S.M., Riazi, G.H., Ahmadian, S., Azadi, F.A. 2008. Antiproliferative activity of chloroformic extract of Persian Shallot, *Allium hirtifolium*, on tumor cell lines, Cytotechnology, 56(3), 179-185.

15-Hosseini, Z. and L. Poorakbar. 2013. Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH, Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 9(1), 66-73.

16-Iberl, B., Winkler, G. and Knobloch, K. 1990. Products of allicin transformation: ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. Planta Medica 56(02): 202-211.

17-Ilić, D. P., Nikolić, V. D., Nikolić, L. B., Stanković, M. Z., Stanojević, L. P. 2010. Thermal degradation, antioxidant and antimicrobial activity of the synthesized allicin and allicin incorporated in gel, Hemijska Industrija, 64(2), 85-91.

18-Jones, M. G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A. B., & Collin, H. A. 2004. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic, Journal of Experimental Botany, 55(404), 1903-1918.

19-Jun, P.K., Sung-Ho, K., Hwa-Jung, K., Choi, S.H. 2006. New Composition of Nanosized Silica-Silver for Control of Various Plant, Plant Pathology Journal, 22(3), 295.

20-Kaveh, R., Li, Y.S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L., Aken, B.V. 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions, Environmental Science and Technology, 47(18), 10637-44.

21-Krishnar, C., Jagan, E.G., Ramachandran, R., Abirami, S.M., Mohan, N., Kalaichelvan, P.T. 2012. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism, Process Biochemistry, 47(4), 651-658.

22-Ma, X., Geiser-Lee, G., Deng, Y., Kolmakov, A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation, Science of the Total Environment, 408(16), 3053-3061.

23-Mahna, N., Zununi Vahed, S., and Khani, S. 2013. Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants, Nanomedicine & Nanotechnology, 4 (2), 1-4.

24-Nair, R. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science, 179(3), 154-163.

25-Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, Pharmacognosy Reviews, 1 (1), 69-79.

26-Rotilio, G., Rossi, L., De Martino, A., Da Costa Ferreira, A. M. and Ciriolo, M. R. 1995. Free radicals, metal ions and oxidative stress: chemical mechanisms of damage and protection in living systems. Journal of The Brazilian Chemical Society, 6(3), 221-227.

27-Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L. and Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogenperoxide content, and differentiation in *Scots pine* roots. Plant Physiology, 127(3), 887-898.

28-Seifsahandi, M., and Sorooshzadeh, A. 2013. Comparison between the influences of silver nanoparticles and silver nitrate on the growth and phytochemical properties of borage (*Borago officinalis* L.), Current Nanoscience, 9, 241-247.

29-Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G.H., Saradhi, P., Khanna, P.K., Arora, S. 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 167(8), 2225-2233.

30-Smirnova, E., Gusev, A., Zaytseva, O., Sheina, O., Tkachev, A., Kuznetsova, E., Lazareva, E., Onishchenko, G., Feofanov, A., Kirpichnikov, A. 2012. Uptake and accumulation of multiwalled carbon nanotubes change the morphometric and biochemical characteristics of *Onobrychis arenaria* seedlings, Frontiers of Chemical Science and Engineering, 6(2), 132-138.

31-Stampoulis, D., Sinha, S.K., and White, J.C. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants, Environmental Science & Technology, 43(24), 9473-9479.

32-Sukkaew, P., and Tira-umphon, A. 2012. Effects of storage conditions on allicin content in garlic *(Allium sativum)*, Acta Horticulturae, 969, 209-212.

33-Tabatabaee, Z., Razavizadeh, R., Rostami, F. 2014. Changes occurring in canola (*Brassiac napus* L) in response silver nanoparticles treatment under in vitro conditions, Indian

Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 4 (S3), 797-807.

34-Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, BP., Auffan. M., et. al. 2011. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*, Environmental Science and Technology, 45(6), 2360-7.

Evaluation of abiotic elicitor effects on some biochemical parameters of garlic

Fathi Rezaei P.

Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Nanoparticles due to their unique physicochemical properties, are widely used in biotechnology. Garlic (*Allium sativum*) is used as spice and drug for many years. Allicin as the best known active compound of garlic has a vast variety of biological effects. In this project effect of two abiotic elicitors including silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate on growth and some biochemical parameters of garlic explants were studied. On silver nitrate-exposed samples; fresh weight, allicin, protein and cysteine contents, and catalase and guaiacol peroxidase activity was less than control. On AgNPs 25 ppm, growth, allicin, protein and cysteine contents was higher than untreated explants. Allicin content of AgNPs-treated explants was greater than the other treatments, on 25 ppm silver nitrate similar to control group and in 50 ppm-treated explants was the least. In conclusion because of the medicinal effects of allicin probably AgNPs could be a good candidate to increase allicin content.

Key words: Allicin, antioxidative enzyme, biotic elicitor, garlic, protein