

## تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دو رقم شمعدانی تحت تأثیر نانوذرات نقره در شرایط تاریکی

### Changes in Antioxidant Enzymes Activity in Two *Pelargonium zonale* Cultivars by Nanosilver Particles During Dark Storage

مه‌رناز حاتمی<sup>۱\*</sup>، عبدالله حاتم‌زاده<sup>۲</sup>، محمود قاسم‌نژاد<sup>۳</sup>، رضا حسن‌ساجدی<sup>۴</sup> و منصور قربانپور<sup>۵</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۹/۳۰

#### چکیده

این پژوهش به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره در طی شرایط تاریکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌های فتوسنتزی در دو رقم شمعدانی "آنتونی" و "بلوواندر" انجام شده است. نانوذرات نقره در پنج سطح (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به صورت محلول پاشی برگی در طی شرایط تاریکی اعمال گردید. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان دو رقم، در محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید در تیمار شاهد و سایر سطوح نانوذرات نقره تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در لیتر وجود دارد. بیشترین محتوای کلروفیل a (۰/۴۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کاروتنوئید (۱/۸۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در رقم آنتونی تحت تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره در هر دو رقم افزایش یافت، اما با افزایش غلظت نانوذرات (۸۰ میلی‌گرم در لیتر) کاهش نشان داد. همچنین این دو رقم از نظر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز تفاوت معنی‌داری نشان دادند. افزایش غلظت نانوذرات نقره در بالاترین سطح، سبب تنش اکسیداتیو بیشتری در رقم بلوواندر نسبت به رقم آنتونی گردید. پراکسیداسیون لیپید در هر دو رقم در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت زیادی با تیمار شاهد نشان داد، به طوری که این شاخص در رقم آنتونی کمتر از رقم بلوواندر (به ترتیب ۱۱ و ۱۲/۲ نانومول مالون دی‌آلدئید گرم وزن تر) تحت تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر بود. بیشترین غلظت نانوذرات نقره نه تنها از تجزیه لیپیدهای غشایی جلوگیری نکرد، بلکه سبب کاهش شدیدی در ماندگاری گل‌های شمعدانی در هر دو رقم گردید.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، شمعدانی، پیری برگ، کیفیت پس از برداشت، نانوذرات نقره

- ۱ و ۵. استادیاران گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
۳. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
۴. دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Email: hatamimehrnaz@yahoo.com

\*: نویسنده مسئول

(<sup>۱۳</sup>STS)، نیترات‌نقره (کیم<sup>۱۴</sup> و همکاران، 2007) و متیل سیکلوپروپان<sup>۱۵</sup> (1-MCP)، برای بهبود کیفیت و ماندگاری گل‌های حساس به اتیلن استفاده شده است. تحقیقات کادنر و دروگه<sup>۱۶</sup> (2004) نشان می‌دهد که تیمار STS و نیترات‌نقره باعث آسیب‌های شدیدی به شمعدانی رقم "ایزابل" شده است. ترکیب 1-MCP بازدارنده عمل اتیلن است و در گونه‌های مختلف شمعدانی به منظور جلوگیری از ریزش استفاده می‌شود، ولی این اثر بازدارندگی موقتی است (کامرون و رید<sup>۱۷</sup>، 2001). بنابراین، از آنجایی که به کارگیری ترکیباتی نظیر تیوسولفات‌نقره مشکلاتی برای سلامت انسان و محیط زیست به وجود می‌آورد و همچنین با توجه به اثر موقتی متیل‌سیکلوپروپان در بازدارندگی عمل اتیلن، استفاده از یک استراتژی جدید به منظور کنترل اتیلن در گیاهان حساس به اتیلن ضروری می‌گردد.

پیشرفت‌های روز افزون در زمینه نانوفناوری و کاربردهای گوناگون و گسترده آن در گرایش‌های مختلف علمی و صنعتی، باعث شده است که در بخش کشاورزی، به خصوص در زمینه صنعت گلکاری برای بهبود محصولات، به دنبال استفاده از این فناوری باشیم. نانوذرات نقره با ویژگی‌های ضد میکروبی و ضداتیلنی در صنایع مختلف کاربردهای فراوان دارند. خصوصیات اعمال شده از طریق نانوذرات نقره در مدت زمان طولانی‌تری پایدار است (خیام نکویی و همکاران، ۱۳۸۹). اثر نانوذرات نقره بر طولانی کردن عمر برگ‌های برداشت شده مارچوبه از ۲ تا ۲۱ روز گزارش شده است، در چنین برگ‌هایی میزان آسکوربات، کلروفیل و فیبر بیشتری مشاهده گردید (ان<sup>۱۸</sup> و همکاران، 2008). مروری بر تحقیقات گذشته نشان داده است که بازدارندگی عمل اتیلن و جلوگیری از ریزش گل در ترکیبات حاوی نقره بررسی شده، اما تاکنون درباره اثر نانوذرات نقره در ارتباط با تقویت سیستم آنتی-اکسیدانی گزارشی مشاهده نشده است. لذا این پژوهش با هدف امکان استفاده از نانوذرات نقره در به تأخیر انداختن پیری برگ و حفظ کیفیت گل‌های دو رقم شمعدانی که بازار پسندهای بیشتری نسبت به سایر ارقام داشتند، در طی تاریکی با تأکید بر تغییرات فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌های فتوسنتزی انجام گردید.

شمعدانی یکی از مهم‌ترین گیاهان باغچه‌ای و گلدانی در جهان است و به طور عمده به صورت رویشی تکثیر می‌شود (دروگه<sup>۱</sup> و همکاران، 2004). کیفیت گل‌ها و قلمه‌های آن در طی مسافت‌های طولانی حمل‌ونقل، به دلیل عوامل تشدیدکننده پیری مانند تاریکی، تنش‌های آبی، بیماری و آلودگی محیط به اتیلن کاهش یافته و معمولاً با تخریب رنگیزه‌هایی نظیر کلروفیل و کاروتنوئیدها همراه است (فرآنته<sup>۲</sup> و همکاران، 2004). هنگامی که گل‌ها در شرایط تاریکی حمل‌ونقل می‌شوند، تنش در آن‌ها القاء می‌شود که با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (<sup>۳</sup>ROS) همراه است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن به عنوان بخشی از متابولیسم طبیعی سلول هستند، اما در زمان تنش، تعادل بین تولید و خنثی شدن طبیعی آن‌ها توسط فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از بین می‌رود و منجر به آسیب‌های اکسایشی در ترکیبات مختلف حیاتی سلول از جمله اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌گردد (تامپسون<sup>۴</sup> و همکاران، 1987). افزایش میزان رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش مهمی در پیری القاء شده توسط تاریکی دارد. گیاهان به منظور کاهش صدمات حاصل از تنش، سیستم‌های سمیت‌زدایی را جهت دفع ROS توسعه می‌دهند و با استفاده از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (<sup>۵</sup>CAT)، پراکسیداز (<sup>۶</sup>POD)، سوپراکسید دیسموتاز (<sup>۷</sup>SOD)، آسکوربات پراکسیداز (<sup>۸</sup>APX) و نیز متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی شامل گلوکاتینون، اسیدآسکوربیک، آلفا توکوفرول و کاروتنوئیدها سلول‌های خود را از اثرات سمی ROS حفظ می‌کنند (آرورا<sup>۹</sup> و همکاران، 2002). تخریب لیپیدها معمولاً به عنوان یک شاخص تخریب غشاء در مقابل اثرات ROSها می‌باشد که نه تنها ثبات و عمل غشاءها را تخریب می‌کند، بلکه به میزان زیادی آلدئیدهای سمی (مالون‌دی‌آلدئید، <sup>۱۰</sup>MDA) و کتون تولید می‌کنند (ولیکووا<sup>۱۱</sup> و همکاران، 2000). تیمارهای بسیاری با استفاده از بازدارنده‌های اتیلن نظیر یون‌های کبالت، آمینوآکسی‌استیک‌اسید (<sup>۱۲</sup>AOA)، تیوسولفات‌نقره

1. Druge *et al.*
2. Ferrante *et al.*
3. Reactive oxygen species (ROS)
4. Tampson *et al.*
5. Catalase (CAT)
6. Prexidase (POD)
7. Superoxide dismutase (SOD)
8. Ascorbate peroxidase (APX)
9. Arora *et al.*
10. Malon de aldehyde (MDA)
11. Valikova *et al.*
12. Amino oxy acetic acid (AOA)

13. Silver thio solphate (STS)
14. Kim *et al.*
15. Methyl cyclo propane (MCP)
16. Kadner and Druge
17. Cameron *et al.*
18. Ane *et al.*

در این آزمایش از دو رقم شمعدانی گروه زونال (آنتونی<sup>۱</sup> و بلو واندر<sup>۲</sup>)، که از یک گلخانه تجاری واقع در پاکدشت (ورامین) تهیه گردید، استفاده شد. از نظر مورفولوژیکی، این ارقام (آنتونی دارای گل‌های قرمز و بلوواندر با گل‌های بنفش) در مرحله‌ی ظهور اولین غنچه بودند. تا قبل از اعمال تیمارهای آزمایشی آبیاری گیاهان همراه با محلول غذایی هوگلند انجام شد. گیاهان هر دو رقم، زمانی که گل‌ها به مرحله (بلوغ تجاری) رسیدند، تحت تأثیر شرایط تاریکی در اتاقک رشد با دمای ۲۰±۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل (ارقام در دو سطح، آنتونی و بلوواندر، و نانوذرات نقره در پنج سطح) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. صفات مورد مطالعه در این آزمایش شامل محتوای کلروفیل (a, b) و کاروتنوئید، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز) و همچنین پراکسیداسون‌لیپید اندازه‌گیری شد.

#### تیمار نانوذرات نقره

نانوذرات نقره از شرکت نانو سید-تهران<sup>۳</sup> خریداری شد. سطوح مختلف نانوذرات نقره (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، صفر میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از آب مقطر تهیه گردید و با حجم یکسان (۵۰ میلی‌لیتر) بر روی تمام گیاهان گلدانی اسپری شد. عدم استفاده از نانوذرات (سطح صفر) به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد.

#### تعیین مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی

استخراج کلروفیل از برگ به کمک استون ۸۰ درصد انجام شد. پس از ساییدن برگ، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب نوری در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵، ۶۶۳ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر (مدل PG Instruments Ltd T80+UV/VIS) اندازه‌گیری شد. مقدار کلروفیل a و b و کاروتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (لیچنتال<sup>۴</sup> و همکاران، ۱۹۸۳).

#### استخراج و اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نیم گرم نمونه برگ در هر تکرار با کمک نیتروژن مایع در داخل هاون آسیاب‌شده و به آن یک میلی‌لیتر بافر فسفات-پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH= ۷ حاوی EDTA ۰/۵ مولار اضافه گردید. محلول همگن حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی برای سنجش غلظت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی قرائت گردید.

#### فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز<sup>۵</sup> (SOD)

برای استخراج SOD در ۴ درجه سانتی‌گراد از بافر فسفات-پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷ شامل EDTA ۰/۵ میلی‌مولار استفاده شد. فعالیت SOD طبق روش گیانوپلیتیس<sup>۶</sup> و رایس<sup>۷</sup> (۱۹۷۷) و از طریق اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. ۱ میلی-لیتر محلول واکنش شامل EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، NBT ۷۵ میکرومولار، ریوبفلاوین ۰/۲۱ میلی‌مولار و رو شناور آنزیمی استخراج شده بود، محلول‌های واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در حالی که به آرامی تکان داده می‌شدند در معرض نور فلورسانس (۲ عدد لامپ ۲۰ وات فلورسانس) قرار گرفتند و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید.

#### فعالیت آنزیم پراکسیداز<sup>۸</sup> (POD)

برای بررسی فعالیت آنزیم POD از روش آبلس و بیلس<sup>۹</sup> (۱۹۹۱) استفاده شد. بافر استخراج برای این آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، شامل بافر فسفات-پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷ حاوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار بود. فعالیت آنزیم POD به مدت ۲ دقیقه در محلول واکنشی (۱ میلی‌لیتر) متشکل از ۴۷۵ میکرولیتر گایاکول ۴۵ میلی‌مولار، ۴۷۵ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۱۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر روشناور آنزیمی استخراج شده، سنجش شد و در برابر بلانک که حاوی تمام مواد به جز نمونه آنزیمی بود، قرائت شد. فعالیت POD با دنبال کردن تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر، که در

5. Superoxide dismutase

6. Giannoplitis

7. Ries

8. peroxidase

9. Abeles and Biels

1. Anthony

2. Blue Wonder

3. Nanosid- Tehran

4. Lichtentaler et al.

تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دو رقم شمعدانی ...

شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر، استفاده شد.

### آنالیز آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. محاسبات آماری و تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی<sup>۵</sup> در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### تغییر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

در طی دوره تاریکی (به مدت ۵ روز) میزان کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید در تیمار شاهد به مقدار چشمگیری در مقایسه با تیمارهای نانوذرات نقره کاهش یافتند (جدول ۱). مقایسه میانگین نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بین شاهد سطح (صفر) و سایر سطوح نانوذرات نقره تا غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر در هر دو رقم در محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید وجود دارد، ولی با افزایش غلظت نانوذرات نقره در سطح ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، محتوای کلروفیل b در رقم آنتونی و بلواندر (به ترتیب ۰/۰۱۰ و ۰/۰۱۹) به طور معنی‌داری کاهش یافته و از میزان کلروفیل a رقم آنتونی و بلواندر (به ترتیب ۰/۰۱۶ و ۰/۰۳۶) و کاروتنوئید رقم آنتونی و بلواندر (به ترتیب ۱/۰۲۱ و ۱/۲۸) نیز اندکی کاسته شد. اخیراً به کارگیری نانوذرات نقره در کشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. نانوذرات نقره ممکن است بر روی متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم‌ها تأثیر بگذارند. به طور کلی، یون نقره می‌تواند جایگزین یون‌های مس از پروتئین‌های پذیرنده شده و جذب اتیلن را مسدود کند، زیرا یون‌های مس نقش حیاتی در اتصالات اتیلن بر روی پذیرنده‌ها دارند و به این ترتیب باعث حفظ کلروفیل و کاروتنوئید می‌شوند. این اثر ضد اتیلنی یون نقره توسط محققان زیادی گزارش شده است (استرادر<sup>۶</sup> و همکاران، ۲۰۰۹؛ چنگ و چن<sup>۷</sup>، ۲۰۰۱). ولی اثر نانوذرات نقره بر بهبود کیفیت گیاهان گلدانی تاکنون گزارش نشده است.

نتیجه اکسیداسیون گایاکول ایجاد می‌گردد، اندازه‌گیری شد. برای محاسبه فعالیت آنزیمی از ضریب خاموشی (۲۶/۶ میلی-مولار بر سانتی‌متر) استفاده شد، هر واحد آنزیمی عبارت است از مقداری از آنزیم که سبب افزایش یک صدم درصد جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در هر دقیقه می‌شود.

#### فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز<sup>۱</sup> (APX)

به منظور تعیین فعالیت APX از روش ناکانو<sup>۲</sup> و آسادا<sup>۳</sup> (۱۹۸۱) (۱۹۸۱) با استفاده از اسپکتروفوتومتر انجام شد. برای تهیه روشنای آنزیمی، از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۱ میلی‌مولار و PVPP ۲ درصد، استفاده شد. ۱ میلی-لیتر محلول واکنشی برای تعیین فعالیت APX، متشکل از پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و اسید آسکوربیک (ASA) ۰/۵ میلی-مولار با pH=۷ است. فعالیت APX به دنبال اکسیداسیون آسکوربات به دی‌هیدروآسکوربات با ضریب خاموشی ۲/۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر به مدت ۲ دقیقه در ۲۹۰ نانومتر محاسبه شد.

#### پراکسیداسیون لیپید

اندازه‌گیری درجه پراکسیده شدن غشاء با تعیین غلظت مالون-دی‌آلدئید به عنوان محصول واکنش پراکسیداسیون اسیدهای چرب استفاده گردید (هس و پکر<sup>۴</sup>، ۱۹۶۸). برای این منظور به نیم گرم برگ کاملاً آسیاب شده با نیتروژن مایع، ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱ درصد اضافه شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌فیوژ گردید. آن گاه ۵۰۰ میکرولیتر محلول رویی به ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیو باربیوتریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله در یخ سرد شد. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، ماده قرمز رنگ مالون‌دی‌آلدئید تیوباربیوتریک اسید (MDA-TBA) تولید شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد و جذب سایر رنگیزه‌های اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کم

5. Tukey  
6. Strader et al.  
7. Chang and Chen

1. Ascorbate peroxidase  
2. Nakano  
3. Asada  
4. Heath and Packer

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف تیمار نانوذرات نقره بر روی رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئید) در برگ‌های دو رقم شمعدانی در طول تاریکی بعد از ۵ روز

Table 1: Effect of different concentrations of nanosilver particles on photosynthetic pigments (Chl a, b and carotenoid) in leaves of two *Pelargonium* varieties during dark storage for 5 days

| NS<br>(mg. L <sup>-1</sup> )<br>نانو ذرات نقره (میلی گرم بر لیتر) | Pigments<br>(mg.g <sup>-1</sup> fw)<br>رنگدانه‌ها (میلی گرم بر گرم وزن تر) | Anthony<br>آنتونی | Bluewonder<br>بلو واندر |
|---|--|-------------------|-------------------------|
| 0   | Chla   | 0.032±0.0014      | 0.012±0.0021            |
|   | Chlb   | 0.020±0.0023      | 0.010±0.0024            |
|   | Carotenoid   | 1.32±0.033        | 1.028±0.0054            |
| 20  | Chla   | 0.038±0.0024      | 0.029±0.0043            |
|   | Chl b  | 0.033±0.0027      | 0.031±0.0021            |
|   | Carotenoid   | 1.57±0.050        | 1.23±0.1021             |
| 40  | Chla   | 0.039±0.0028      | 0.035±0.0038            |
|   | Chlb   | 0.029±0.0023      | 0.015±0.0042            |
|   | Carotenoid   | 1.77±0.076        | 1.21±0.1029             |
| 60  | Chla   | 0.048±0.0037      | 0.044±0.0028            |
|   | Chlb   | 0.039±0.0021      | 0.040±0.0030            |
|   | Carotenoid   | 1.82±0.018        | 1.32±0.1097             |
| 80  | Chla   | 0.036±0.0076      | 0.016±0.0012            |
|   | Chlb   | 0.019±0.0023      | 0.010±0.0011            |
|   | Carotenoid   | 1.28±0.014        | 1.021±0.0051            |

### تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، تغییر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در دو رقم "آنتونی" و "بلوواندر" بعد از پنج روز در شرایط تاریکی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) داشت (شکل ۳). در تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات، فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در رقم آنتونی و بلوواندر افزایش یافت، (به ترتیب ۴۲ و ۵۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و سپس با افزایش غلظت نانوذرات در سطح ۸۰ میلی‌گرم در لیتر در رقم آنتونی و بلوواندر، (به ترتیب ۱۷ و ۳۸ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) کاهش نشان داد. اما کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در رقم "بلوواندر" بیشتر از رقم "آنتونی" دیده شد. فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد در رقم آنتونی بیشتر از رقم بلوواندر بود. آنزیم سوپراکسیددیسموتاز تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن که یک مولکول غیررادیکالی است را به عهده دارد. پراکسید هیدروژن در غلظت بالا سمی بوده ولی در غلظت پایین به‌عنوان یک پیام، در ظهور ژن‌های مقاومت و تولید

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش دارد (کک‌مک و هورست<sup>۱</sup>، ۱۹۹۱). کاهش فعالیت آنزیم ممکن است باعث تجمع زیاد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در گیاهان شود که این عمل باعث پراکسیداسیون لیپید گشته و در نهایت منجر به تخریب سیستم‌های غشایی می‌شود (بیس<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۳). در آزمایش حاضر تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز بین دو رقم "آنتونی" و "بلوواندر" دیده شد. همچنین افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بین دو رقم در غلظت-های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نقره مشاهده گردید. اما افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در رقم آنتونی بیشتر از بلوواندر بوده است (شکل ۲ و ۱) و در بالاترین غلظت نانوذرات نقره (۸۰ میلی‌گرم در لیتر) از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در دو رقم "آنتونی" و "بلوواندر" کاسته شد. بنابراین فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ممکن است نسبت به فعالیت آنزیم

1. Cakmak and Horst
2. Bais et al.

هر دو رقم به کار رفته شده در آزمایش شد. این نتایج ممکن است به کاربرد نانوذرات نقره در غلظت مناسب مرتبط باشد که با جلوگیری از گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در طی تنش، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تقویت نموده و از این طریق توانسته از پراکسیداسیون لیپید ممانعت به عمل آورد.

### نتیجه‌گیری

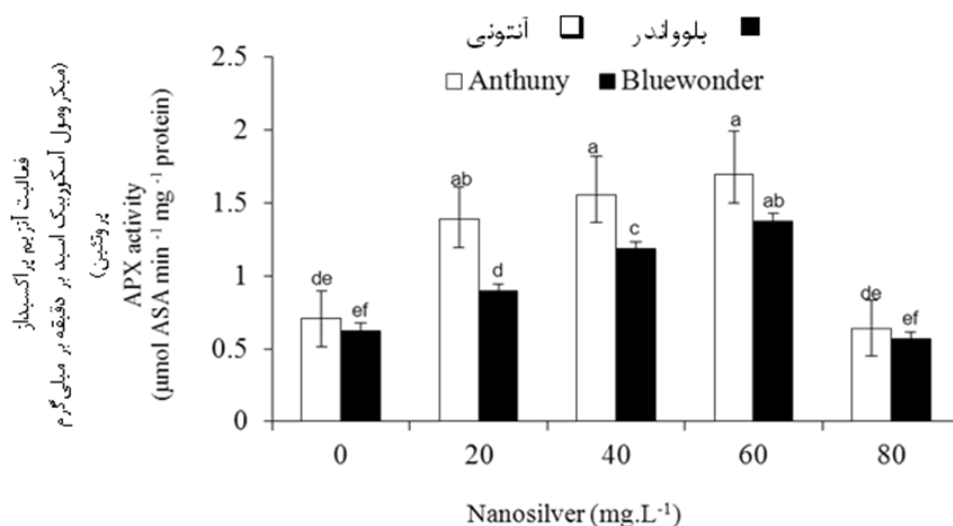
نتایج در این مطالعه نشان داد که تفاوت‌های مهمی در تنش اکسیداتیو القاء شده توسط شرایط تاریکی در دو رقم شمعدانی وجود دارد و همچنین واکنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بین این ارقام متفاوت بود. فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) در رقم آنتونی نشان می‌دهد که این رقم در غلظت بهینه نانوذرات نقره در شرایط تاریکی می‌تواند به طور چشمگیری رادیکال‌های آزاد را خنثی کند. بنابراین نانوذرات نقره در غلظت مناسب (۶۰ میلی‌گرم در لیتر) می‌توانند از طریق بهبود کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی تا حدودی از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو ممانعت به عمل آورند.

آسکوربات پراکسیداز در حذف رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاهان مؤثرتر باشد. گزارش محققین حاکی از آن است که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط تنش‌های مختلف به طور نسبی در گونه‌های مقاوم بالاتر از گونه‌های حساس است (بور<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که افزایش غلظت نانوذرات نقره سبب تنش اکسیداتیو بیشتری در رقم بلواندر گردید. در مقابل، تفاوت اندکی در میزان پراکسیداسیون لیپید در رقم آنتونی مشاهده شد که ممکن است نشان‌دهنده یک مکانیسم محافظتی بهتر در این رقم باشد. مکانیسم‌های محافظتی سازگار شده توسط گیاهان، برای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها شامل چندین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف است. به طور کلی، فعالیت یکی و یا تعداد بیشتری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان زمانی که با شرایط تنش‌زا روبرو شوند افزایش می‌یابد و تغییرات این فعالیت به منظور افزایش مقاومت به تنش در نظر گرفته می‌شود (ماژودی<sup>۲</sup> و همکاران، ۱۹۹۷). مطالعات پیشین توسط محققین نشان می‌دهد که که فلز مس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز را افزایش می‌دهد (راما دوی<sup>۳</sup> و همکاران، ۱۹۹۸)، ولی واکنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به فلز مس و یا به طور کلی به فلزات مبهم است و می‌تواند بین گونه‌های گیاهی و بین بافت‌های مختلف متفاوت باشد (ماژودی و همکاران، ۱۹۹۷).

### تغییرات لیپیدهای غشاء

پراکسیداسیون لیپید در برگ‌های دو رقم شمعدانی با اندازه‌گیری مقدار MDA سنجش شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که پراکسیداسیون لیپید در هر دو رقم "آنتونی" و "بلواندر" در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) با تیمار شاهد داشت. غلظت MDA در رقم آنتونی به طور معنی‌داری کمتر از رقم بلواندر در تمامی تیمارها بود، به طوری که بالاترین غلظت MDA در رقم آنتونی (۱۵ نانومول مالون‌دی‌آلدئید در گرم وزن تر) در تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر و در رقم بلواندر (۱۷/۵ نانومول مالون‌دی‌آلدئید در گرم وزن تر) در تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید (شکل ۴). تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات نه تنها از تجزیه لیپیدهای غشایی جلوگیری نکرد، بلکه سبب سمیت و سوختگی برگ‌ی در

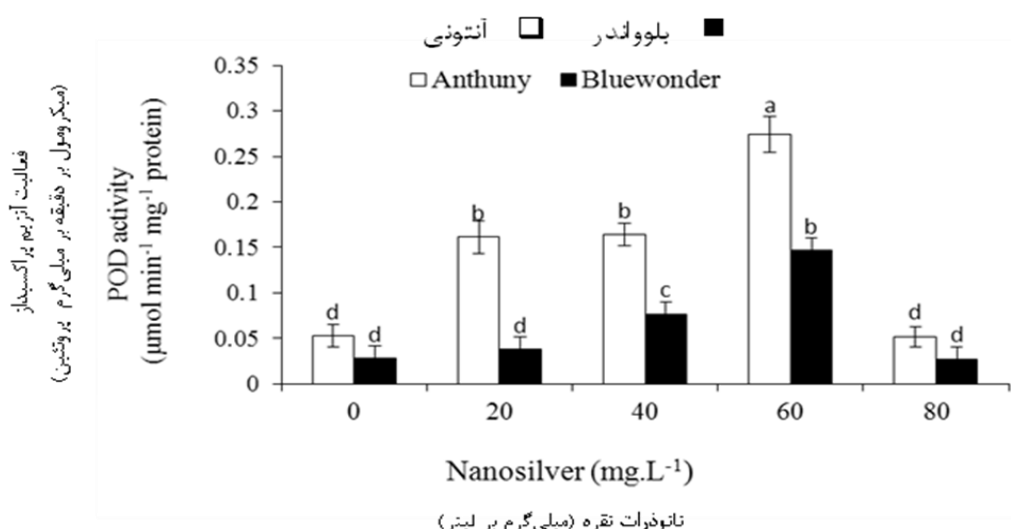
3. Bor *et al*
4. Mazhodi *et al*
5. Ramadoy *et al*



نانوذرات نقره (میلی گرم بر لیتر)

شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف تیمار نانوذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) در برگ‌های دو رقم شمعدانی در طول تاریکی بعد از ۵ روز. حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند

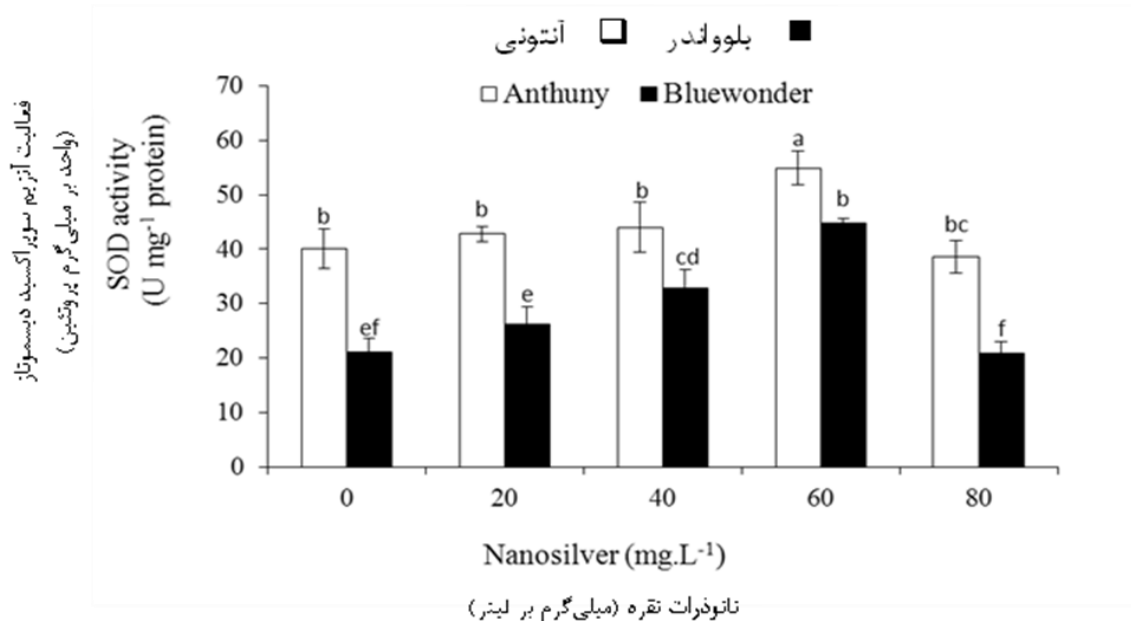
Fig.1: Effect of different concentrations of nanosilver particles on ascorbate peroxidase (APX) activity in leaves of two *Pelargonium* varieties during dark storage for 5 days. The same letters are not significantly different at 5%



نانوذرات نقره (میلی گرم بر لیتر)

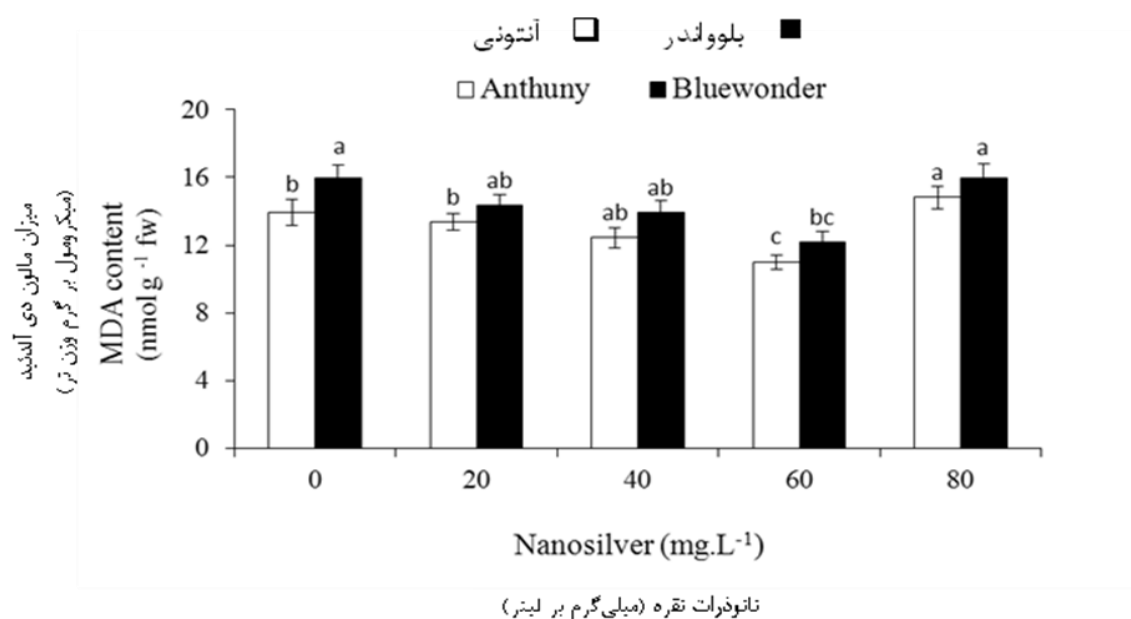
شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف تیمار نانوذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در برگ‌های دو رقم شمعدانی در طول تاریکی بعد از ۵ روز. حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند

Fig. 2: Effect of different concentrations of nanosilver particles on peroxidase (POD) activity in leaves of two *Pelargonium* varieties during dark storage for 5 days. The same letters are not significantly different at 5%



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف تیمار نانوذرات نقره بر روی فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در برگ‌های دو رقم شمعدانی در طول تاریکی بعد از ۵ روز. حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 3: Effect of different concentrations of nanosilver particles on superoxide dismutase (SOD) activity in leaves of two *Pelargonium* varieties during dark storage for 5 days. The same letters are not significantly different at 5%



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف تیمار نانوذرات نقره بر روی پراکسیداسیون لیپید (MDA) در برگ‌های دو رقم شمعدانی در طول تاریکی بعد از ۵ روز. حروف مشابه، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Fig. 4: Effect of different concentrations of nanosilver particles on lipid peroxidation (MDA) in leaves of two *Pelargonium* varieties during dark storage for 5 days. The same letters are not significantly different at 5%



خیام‌نکویی، م.، بی‌آزار، ا. و صالحی جوزانی، غ. ل. (۱۳۸۹). فناوری نانو در علوم کشاورزی. صفحات ۸-۱۴.

- Abeles, F. B. and Biles, C. L. 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Journal of Plant Physiology*, 95: 269-273.
- An, J., Zhang, M., Wang, S. H. and Tang, J. 2008. Physical, chemical and microbiological change in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticle-pvp, *LWT*, 41: 1100-1107.
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. *Current Science*, 82: 1227-1238.
- Bais, H. P., Vepechedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M. and Vivanco, J. M. 2003. Allelopathy and exatrac palnt invasion: from molecules and genes to species interactions, *Science*, 301: 1377-1380.
- Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima*. *Plant Science*, 164:77-84.
- Cakmak, L. and Horst, W. 1991. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Review of Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cameron, A. C. and Reid, M. S. 2001. 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. *Postharvest Biology and Technology*, 22: 169-177.
- Chang, Y. S. and Chen, H. C. 2001. Variability between silver thiosulfate and 1-naphthaleneacetic acid applications in prolonging bract longevity of potted bougainvillea. *Scientia Horticulturae*, 87: 217-224.
- Druege, U., Zerche, S. and Kadner, R. 2004. Nitrogen- and storage-affected carbohydrate partitioning in high-light-adapted *Pelargonium* cuttings in relation to survival and adventitious root formation under low light. *Annals of Botany*, 94: 831-842.
- Ferrante, A., Vernieri, P., Serra, G. and Tognoni, F. 2004. Changes in abscisic acid during leaf yellowing of cut stock flowers. *Plant Growth Regulation*, 43: 127-134.
- Giannopolities, C. N. and Rise, S. K. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 304-309.
- Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- Kadner, R. and Druege, U. 2004. Role of ethylene action in ethylene production and poststorage leaf senescence and survival of pelargonium cuttings. *Plant Growth Regulation*, 43: 187-196.
- Kim, H., Craig, R. and Brown, K. M. 2007. Ethylene resistance of Regal *Pelargonium* is complemented but not replaced by 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 45: 66-72.
- Koroi, S. A. A. 1989. Gele electrophores tische and spectrophoto metrscho unter uchungen zomeinfluss der tempelature auf straktur der amylase and peroxidase isoenzyme. *Physiologie Vegetale*, 20: 15-23.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellbum, A. R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 1: 591-592.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H. and Ferja-Cu, E. E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Science*, 127:129-137.
- Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867-880.
- Rama Devi, S. and Prasad, M. N. V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, 138: 157-165.
- Strader, L. C., Beisner, E. R. and Bartel, B. 2009. Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. *Plant Cell*, 21: 3585-3590.
- Thompson, J. E. and Legge, R. L. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 105: 317-334.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plant. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.

## Changes in Antioxidant Enzymes Activity in Two *Pelargonium Zonale* Cultivars by Nanosilver Particles During Dark Storage

Hatami<sup>1\*</sup>, M., Hhatamzadeh<sup>2</sup>, A., Ghasemnezhad<sup>3</sup>, M., Hasan sajadi<sup>4</sup>, R. and Ghorbanpour<sup>5</sup>, M.

### Abstract

This investigation was carried out to study of nanosilver particles application on antioxidant enzymes activity and photosynthetic pigments during dark storage in two *Pelargonium* varieties "Anthuny" and "Bluewonder". Treatments with nanosilver particles was done by foliar spraying in five levels (0, 20, 40, 60, 80 mg.L<sup>-1</sup>) during dark storage. Results showed that there were significant different between the two varieties in Chl a and b and carotenoids contents under control and nanosilver particles up to 60 mg.L<sup>-1</sup>. The highest content of Chl a (0.048 mg.g<sup>-1</sup> fw) and carotenoids (1.72 mg.g<sup>-1</sup> fw) were observed in 60 mg L<sup>-1</sup> nanosilver particles in Anthuny variety. Activity of SOD enzyme was increased in both varieties under 60 mg.L<sup>-1</sup> nanosilver application but was decreased with increasing the concentration to 80 mg L<sup>-1</sup>. Also, these two varieties showed a significant difference between APX and POD enzyme activities. Increasing of nanosilver particles concentration in higher level caused to more oxidative stress in Bluewonder variety compare to Anthuny variety. Lipid peroxidation in both varieties in different concentrations of nanosilver up to 60 mg L<sup>-1</sup> showed a significant difference compared to control variety, as this index in Anthuny variety were lower than Bluewonder variety (respectively 11 and 12.2 nmol MDA/g.fw<sup>-1</sup>), under 60 mg. L<sup>-1</sup> nanosilver treatment . The highest concentration of nanosilver not only didnt lipid peroxidation, but also caused severe diminish in longevity of *Pelargonium* flowers in both varieties.

**Keywords:** Antioxidant enzyme, *Pelargonium*, Leaf senescence, Post harvest quality, Nanosilver

---

1 and 5. Assistant Professors Department of Medicinal Plants, Arak University, Arak

2. Associate Professor, Department of horticultural sciences, Guilan University, Rasht

3. Associate Professor, Department of horticultural sciences, Guilan University, Rasht

4. Associate Professor, Department of biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran

\*: Corresponding author Email: hatamimehrnaz@yahoo.com