بررسی فعالیت پاداکسندهای آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاه تره تیزک (*Lepidium Sativum*L.) تحت تاثیر نانو ذرات سیلیکات و تنش اشعه فرا بنفش

[۱]*شبنم یگانه فر ، [۲]سیاوش حسینی سرقین
[۱و۲] دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم ، گروه زیست شناسی
*نویسنده مسول:yeganeh.sh17@gmail.com

چکیده

در این تحقیق تاثیرات اشعه فرا بنفش (UV-B) و نانو ذرات سیلیکات بر روی سیستم پاداکسندگی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاه تره تیزک مورد بررسی قرار گرفته است نتایج حاصل نشان داد که میزان ترکیبات جاذب اشعه فرا بنفش مانند آنتوسیانین، فلاونوئید و فنول کل افزایش یافته اند هرچند نتایج نشان داد که کاربرد نانو ذرات به تنهایی و توامان با اشعه فرا بنفش سبب تغییرات متفاوت در این ترکیبات می‌شود. در این تحقیق مشاهده شد که سیستم پاد اکسندگی آنزیمی مانند کاتالاز (CAT)، گایاکول پر اکسیداز (GPX) تحت تاثیر اشعه فرابنفش افزایش یافته اما میزان پلی فنول اکسیداز (PPO) کاهش یافته است. همچنین مشاهده شد که تحت تاثیر نانو ذرات سیلیکات میزان فعالیت CAT و PPO افزایش یافته‌اند و میزان GPX کاهش یافته است. در نهایت پاسخ های متفاوتی از این سه آنزیم تحت شرایط تیمار توامان UV-B و نانو ذرات سیلیکات مشاهده شد.

کلمات کلیدی: اشعه فرا بنفش، پاد اکسندگی، تره تیزک، نانو ذرات سیلیکات

مقدمه

امروزه فعالیت‌های صنعتی بشر باعث افزایش ترکیبات آلوده کننده‌ی اتمسفر به خصوص ترکیبات هالوژن‌دار شده است، این ترکیبات باعث تخریب لایه‌ی اوزون می‌شوند. کاهش این لایه باعث افزایش میزان اشعه‌ی UV در سطح زیست کره شده و مشکلاتی را برای موجودات زنده به وجود آورده است. اثرات اشعه‌ی UV بر گیاهان به علت نیاز دائمی آنها به نور خورشید غیر قابل اجتناب می‌باشد. افزایش در گونه‌های اکسیژن مانند O_2^-، OH^- و H_2O_2 که منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شوند تحت تأثیر اشعه فرابنفش در بسیاری از گیاهان مشاهده شده است (sada, 1999). به طور کلی سلول‌های گیاهی دارای سیستم حفاظتی پاداکسایشی می‌باشند تا اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده را برطرف کنند، این سیستم شامل فرایندهای آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد. اخیراً فن‌آوری نانو در سطح گسترده مورد توجه بیشتر پژوهشگران علوم مختلف قرار گرفته است. امروزه افزودن نانوذرات به محلول غذایی گیاهان به‌عنوان کود به دلیل داشتن اثرهای بی‌نظیر آن‌ها مانند نفوذ سریع تر و راحت تر به درون غشای سلولی، توجه زیادی را در بین تولید کنندگان به خود جلب کرده است (Kulkarni, 2007). گزارش شده است. باتوجه به اهمیت نانو ذرات در سالهای اخیر و نقش آنها در کاهش و بهبود شرایط تنش محیطی در این تحقیق سعی بررسی اثرات نانو ذرات سیلیکات بر روی گیاه تره تیزک تحت شرایط تنش اشعه فرابنفش شده است. لذا میزان فعالیت‌های پاداکسنده‌های آنزیمی مانند کاتالاز ، گایاکول پراکسیداز ، پلی فنول اکسیداز و پاداکسنده های غیر آنزیمی مانند ترکیبات جاذب اشعه فرا بنفش مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه

IrHC2019

بذرهای سالم و هم اندازه ی گیاه تره تیزک (*Lepidium sativum* L.) پس از جوانه زنی تحت شرایط کنترل شده دانه رستها به اتاقک‌های کشت انتقال داده شدند. بعد از ۳۸ روز رشد در شرایط محیطی یکنواخت، گلدان‌ها به طور تصادفی به چهار دسته تقسیم شدند. برای تیمار اشعه فرا بنفش از لامپ‌هایی با مشخصات زیر ، ۱۰ روز و به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد. علاوه بر این تیمار نانو ذرات سیلیکات با غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر نیز به صورت جدا و توامان با اشعه فرا بنفش انجام شد. زمان اعمال تیمار بین ساعت ۱۱ تا ۱۲/۳۰بود.

UV-B =2(15_W) (LF-215m. 312nm)

اندازه گیری ترکیبات جاذب اشعه فرا بنفش (آنتوسیانین، فلاونوئید و فنول کل)

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین از روش Fulcki و همکاران (۱۹۶۸) استفاده شد. میزان فلاونوئید کل برمبنای رنگ‌سنجی آلومینیوم و با استفاده از روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) تعیین گردید. برای تعیین میزان فنل کل از روش Marinova و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد.

اندازه گیری آنزیمهای پاداکسنده (کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز)

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) انجام شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز با استفاده از روش Siriphanich و همکاران (۱۹۸۵) با اندکی تغییرات اندازه گیری شد. در نهایت آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS سری ۱۷، طی مسیر Anova one way و آزمون Tukey در سطح احتمال آماری $P<0.05$ انجام گرفت.

نتایج و بحث

بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات جاذب اشعه فرا بنفش نشان داد که میزان آنتوسیانین در تیمارهای نانو ذرات سیلیکات و تیمار توامان UV-B و نانو ذرات سیلیکات در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش یافته است ((جدول-۱)). هر چند افزایش این ترکیب در تیمار UV-B در مقایسه با نمونه‌های شاهد به صورت معنی دار نبود. ((جدول-۱)) بررسی محتوای آنتوسیانین در گیاه تره تیزک تحت تاثیر تنش اشعه فرا بنفش ، کاربرد نانو ذرات سیلیکات و توامان (نانو ذرات سیلیکات و اشعه فرا بنفش) را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان فلاونوئید کل در تیمار اشعه فرا بنفش به شدت افزایش یافته است همچنین مشخص شد که نانو ذرات سیلیکات نیز سبب افزایش معنی دار این ترکیبات در مقایسه با شاهد شده است. علاوه بر این مشاهده شد که در تیمار نانو ذرات سیلیکات و UV-B به صورت توامان سبب افزایش این ترکیبات در گیاه تره تیزک شده اند اما این افزایش معنی دار نیست. ((جدول-۱)) بیانگر تاثیرات اشعه فرا بنفش و نانو ذرات سیلیکات بر روی میزان فنول می باشد ، این نمودار نشان داد که تحت تاثیر اشعه فرا بنفش و نانو ذرات سیلیکات میزان این ترکیبات در مقایسه با نمونه‌های شاهد به صورت معنی دار افزایش یافته است. این افزایش تنها در تیمارهای اشعه فرا بنفش به صورت معنی دار می باشد. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان اشعه فرا بنفش و نانو ذرات سلیکات سبب کاهش این ترکیبات شده است اما این کاهش به صورت معنی دار مشاهده نشد.

IrHC2019

جدول-۱: تاثیرات اشعه فرا بنفش و نانو ذرات سیلیکات بر روی ترکیبات جاذب اشعه فرا بنفش

	آنتوسیانین (µmol/g fw)	فلاونوئید (µg/g fw)	فنول کل (mg/g fw)
کنترل	۱۵±۰/۶۴a	۷/۶۴±۰/۴۶a	۱/۱۹±۰/۰۱a
UV-B	۱۵/۲۶±۰/۸۸a	۲۹/۱۴±۱/۳۶b	۱/۲۱±۰/۰۰۶b
نانو ذرات Si	۱۲/۲±۰/۳۶b	۱۲/۴۴±۱/۵۷c	۱/۱۹±۰/۰۰۵a
Si+UV-B	۱۲/۹۷±۰/۵۶c	۸/۰۴±۰/۵۸a	۱/۱۸±۰/۰۰۶a

ترکیبات فنلی به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات پاداکساینده شناخته شده‌اند که مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌وار اکسیداسیون، اهدای هیدروژن، حذف اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش پاداکسایندگی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با اهدای سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می‌کنند و قادرند محصولاتی با قدرت اکسیدکنندگی کمتر از ترکیب‌های اولیه به وجود آورند. نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که محتوای فلاونوئید، فنل کل و فعالیت پاد اکسنده‌ها با قرار گرفتن در معرض سطوح کم نانو ذرات در گیاه مرزه خوزستانی در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Ghorbanpour *et al*, 2014). بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که میزان فعالیت کاتالاز در تیمارهای نانو ذرات سیلیکات و تیمار UV-B در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش یافته است (جدول-۲).

هر چند افزایش فعالیت این آنزیم تنها در تیمار UV-B در مقایسه با نمونه‌های شاهد به صورت معنی دار بود. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان نانو ذرات و تیمار اشعه فرا بنفش سبب تغییر معنی داری در فعالیت این آنزیم نشده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر اشعه فرابنفش در گیاهان مختلف متفاوت می‌باشد.

جدول-۱: تاثیرات اشعه فرا بنفش و نانو ذرات سیلیکات بر روی آنزیم های پادکسنده

	کاتالاز	**گایاکول پراکسیداز**	**پلی فنول اکسیداز**
کنترل	۱۹۳/۵۷±۳۵/۵۴a	۲/۲۷±۰/۲۵a	۶۲/۶۵±۶/۳۷a
UV-B	۲۹۷/۲۴±۲۰/۸۸b	۳/۹۵±۰/۳۹b	۳۶/۱۴±۱/۶۴b
نانو ذرات Si	۲۴۷/۲۴±۴۰/۱۳c	۱/۰۲±۰/۵۸c	۶۹/۸۷±۸/۶۸a
Si+UV-B	۱۸۷/۸۹±۳۷/۸۳a	۲/۳±۰/۷a	۲۴/۰۹±۴/۸۱c

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گایاکول پر اکسیداز کل در تیمار اشعه فرا بنفش به شدت افزایش یافته است همچنین مشخص شد که نانو ذرات سیلیکات نیز سبب افزایش فعالیت این آنزیم شده است اما این افزایش به صورت معنی دار نیست. در این تحقیق مشاهده شد که کاربرد نانو ذرات سیلیکات سبب کاهش معنی دار فعالیت گایاکول پر اکسیداز در مقایسه با شاهد شده است. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده، دارای سیستم دفاعی با کارائی بالائی هستند که می تواند رادیکالهای آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم دفاعی شامل آنزیم‌های پاداکسنده سوپر اکسید دسموتاز (SOD) ، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پر اکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) است و سیستم غیر آنزیمی شامل آسکوربات ، توکوفرول، کاروتنوئیدها و ترکیبات پاداکساینده از جمله فلاونوئیدها ، مانیتول‌ها و پلی فنول‌ها می باشد. تعدد و کثرت سیستم‌های دفاعی به این خاطر است که انواع اکسیژن‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌ها و بخش‌های زیر سلولی مختلف تولید می‌شوند و هم چنین دارای توانائی انتشار، حلالیت و تمایل به واکنش با مولکول‌های بیولوژیک مختلف هستند. بنابراین به مجموعه‌ای بهم پیوسته از مولکول‌های دفاعی برای عمل در هر دو مرحله آلی و غشائی در تمام بخش‌های سلول برای غیر فعال کردن رادیکال‌ها به همان سرعتی که آن‌ها شکل می‌گیرند، نیاز است.گایاکول‌پراکسیداز یکی از مهمترین پراکسیدازها می‌باشد. نتایج بررسی فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز نشان داد که تحت تاثیر تنش اشعه فرا بنفش و تیمار توامان اشعه فرا بنفش و نانو ذرات سیلیکات میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با نمونه‌های شاهد به صورت معنی داری کاهش

IrHC2019

یافته است. هر چند نتایج نشان داد که تغییر معنی دار خاصی در اثر کاربرد نانو ذرات سیلیکات به صورت تنها در مقایسه با نمونه‌های شاهد ایجاد نشده است ((جدول-۲)). اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کوئینون‌ها به وسیله آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیدازها (PPO) برای پلیمریزاسیون رنگدانه‌های تیره رنگ انجام می‌شود. این رنگدانه‌های تیره رنگ به گیاهان در آسیب‌های سطحی کمک می‌کنند. چندین مشاهده نقش آنزیم PPO در پلیمریزاسیون مونولیگنول‌ها به اولیگنول‌ها را تشخیص داده‌اند. مطالعات بسیاری به منظور کاهش تنش‌های محیطی به واسطه ترکیبات مختلف صورت گرفته است و کاربرد نانو ذرات در بین این ترکیبات جایگاه ویژه ای دارد، به عنوان مثال افزایش در سطوح آنزیمهای پاداکسندهای القا شده توسط نانوذرات، نشان دهنده مکانیسم دفاعی ثانویه علیه تنش اکسیداتیو است . Lu و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که ترکیبی از نانو SiO_2 و نانو TiO_2 باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های POD، SOD و CAT در سویا شده است که در پی آن، موجب جوانه زنی و رشد گیاه سویا نیز می‌شود. Hong و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان دادند که در حضور نانو اکسید تیتانیوم، میزان تولید H_2O_2 و به دنبال آن فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در برگ گیاه اسفناج افزایش می‌یابد.

منابع

Aebi, H. 1984. Catalase in Vitro. Journal of Meth Enzymol 105: 121–126.

Asada, K. 1999. The Water–Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygen and Dissipation of Excess Photons. Journal of Plant Physiology, 50: 601 – 639.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. 2002. Estimation of Total Favonoid Content in Propolis by Two Complemen-Tary Colorimetric Methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10:178-182.

Fulcki, T. and Francis, F.J. 1968. Quantitative Metod For Anthocyanins Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. Journal of food science. 33:72-77.

Ghorbanpour, M. and Hatami, M. 2014. Spray treatment with silver nanoparticles plus thidiazuron increases antioxidant enzyme activities and reduces petal and leaf abscission in four cultivars of Geranium (*Pelargonium zonale*) during storage in the dark. Juornal Horticance Science Biotechnolgy. 89: 712 - 8.

Hong, F., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L and Yang, P. 2005. Effect of nano-TiO2 on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. Biological trace element research. 105(1-3): 269-279. 2

Kulkarni, S. K. 2007. Nanotechnology: principles and practices, Capital publishing company

Lu, C. M., Zhang, C. Y., Wen, J. Q., Wu, G. R. and Tao, M. X. 2002. Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of Glycine max and its mechanism. Soybean Science. 21(3): 168-172.

Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. 2005. Total phenolics and Total Flavonoids in Bulgaria Fruits and Vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40: 255-260.

Siriphanich, J. and Kader, A.A, Amer, J. 1985. *Journal of Soc. Hort. sciences*. 110-249.

Updhyaya, A., Sankhla, D., Davis, TD., Sankhla, N. and Smidth, BN. 1985. Effect of Paclobutrazol on The Activities of Some Enzymes of Activated Oxygen Metabolism and Lipid Peroxidation in Senescing Soybean Leaves. Journal of Plant Physiology 121: 453-461.

IrHC2019

Investigating the Activity of Enzymatic and Non-Enzymatic Dietary Oxidation in Garden cress (*Lepidium sativum* L.) Under the Effect of Silica Nano Particle and Ultraviolet Radiation

Shabnam Yeganeh Far[1*] , Siavash Hosseini Sarghein[2]
[1and2]Urmia University, Faculty of Science, Department of Biology
Corresponding author:yeganeh.sh17@gmail.com

Abstract

in this study, the effects of ultraviolet radiation (UV-B) and silicate nanoparticles on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system of the plant have been investigated. The results showed that the amount of ultraviolet absorbing compounds such as anthocyanins, flavonoids and total phenol has increased, although the results showed that the application of nanoparticles alone and in combination with ultraviolet radiation causes different variations in these compounds. In this study, an enzymatic anti-oxidation system such as catalase (CAT), guaiacol oxidase (GPX) has been enhanced by ultraviolet radiation, but the amount of polyphenol oxidase (PPO) has decreased. It was also observed that the effect of CAT and PPO activity on the silicate nanoparticles has been increased and the amount of GPX has decreased. Finally, different responses of these three enzymes were observed under the conditions of ultraviolet and nanoparticle coexistence.

Keywords: ultraviolet radiation, antioxidants, garden cress, silica nanoparticles

IrHC2019