اثرات نانوذرات گوگرد برمقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گیاه رازیانه*Foeniculume vulgar*

رقیه اسکندری، سید مهدی. رضوی، پریسا نصرالهی ،

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه محقق اردبیلی ، اردبیل

۲-استاد زیست شناسی ، فیزیولوژی گیاهی،دانشکده علوم،دانشگاه محقق اردبیلی ، اردبیل

۳-دانشجوی دکترای رشته فیزیولوژی گیاهی،دانشگاه محقق اردبیلی،اردبیل

چکیده

رازیانه با نام علمی (*Foeniculum vulgare Mill.*) گیاهی دو ساله یا چند ساله از جنس رازیانه (*Foeniculum*)،تیره چتریان (*Apiaceae*)و راسته آپیالس(*Apiales)* است که در حالت وحشی، به صورت گیاهی چند ساله بوده ولی نوع اهلی آن، گیاهی دو ساله است. نانوذرات گوگرد به عنوان رایج ترین نانوساختار مورد استفاده در مزارع به عنوان عوامل ضد قارچی در نظر گرفته می شوند. کاربردهای مهم دیگری مانند کودها، داروسازی و صنایع نیز دارد. هدف این مطالعه بررسی پارامترهای فیتوشیمیایی گیاه رازیانه تیمار شده با دوزهای مختلف نانوذرات گوگرد سنتز شده سبز (۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر)است. نانوذرات گوگرد از طریق یک سنتز سبز از عصاره پوست درخت دارچین *Cinnamomum Zeylanicum*و تیوسولفات سدیم سنتزشد.نتایج ما نشان داد که در غلظت ۱میلی گرم بر میلی لیتر نانوذرات گوگرد، برخی خصوصیات فیتوشیمیایی مانند محتوای فنل،فلاونوئید،تانن و آنتوسیانین افزایش یافت و این افزایش قابل توجه در سطوح برخی متابولیت ها،گیاه را قادر به تحمل تنش های محیطی می کند.

کلمات کلیدی: نانوذرات گوگرد، رازیانه، دارچین، فیتوشیمیایی

۱-مقدمه

فناوری نانو علمی در مورد دستکاری و مهندسی مواد درمقیاس ۱۰۰-۱نانومتر است(Dudo et al., 2011, Khot et al.,2012) .

به علت اندازه کوچک نانوذرات و سطح تماس بیشتری که دارند، میزان چسبندگی به سطح سلولی افزایش می یابد که منجر به افزایش کارایی آنها میشود (shah and Belozerova; ۲۰۰۹) کاهش اندازه مواد در حد نانومتر به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم باعث تغییر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها شده، به گونه ای که ویژگی های مواد در ابعاد نانومتری با خصوصیات آنها در ابعاد بزرگتر از نانومتر بسیار متفاوت خواهد بود(Cho et al; 2005) .

فناوری نانو تقریبا در تمام زمینه های علمی کاربرد دارد. از نانوذرات برای رشد گیاهان و کنترل بیماری های گیاهی استفاده می شود(Park et al; ۲۰۰۶)نانوذرات اثرات مثبت و منفی بر عملکردهای مختلف گیاهان دارند۲۰۱۱ ;Rico et al)اثر نانوذرات روی عملکرد هر سیستم زیستی، از جمله گیاهان در درجه اول به خواص فیزیکی نانوذرات، مانند اندازه، شکل، وزن، ترکیب شیمیایی، تغییرات سطح، واکنش پذیری (Khodakovskaya et al ;2012)و غلظت نانوذرات بستگی دارد و از یک گیاه به گیاه دیگر متفاوت است. به طور کلی مطالعات محدودی در زمینه اثر نانوذرات بر گیاهان دارویی و به ویژه نانوذرات سنتز شده به روش زیستی وجود دارد(Gruyer et al ;2013) .

گوگرد یکی از مواد مغذی ضروری است که برای رشد و نمو کافی گیاهان موردنیاز است. گوگرد جزئ ساختاری پیوندهای دی سولفیدی پروتئین، اسیدهای آمینه، ویتامین ها وکوفاکتورهاست.

بیشتر گوگرد موجود در خاک در موادآلی وجود داردو از این رو برای گیاهان قابل دسترسی نیست.شکل آنیونی گوگرد(-SO42) منبع اصلی گوگرد برای گیاهانی است که عمومادر مقادیر کم در خاک وجود دارند.محلول در آب است، بنابراین به راحتی از خاک خارج می شود.گوگرد و ترکیبات حاوی گوگرد به عنوان مولکول های سیگنال در مدیریت استرس و همچنین فرایندهای متابولیک طبیعی عمل می کنند. آنها همچنین در تداخل شبکه سیگنالینگ پیچیده به عنوان یک مولکول واسطه شرکت می کنند. گیاهان با استفاده از ناقل سولفات اختصاصی خود، سولفات را مستقیما از خاک جذب می کنند. علاوه براین،گیاهان همچنین از ناقل گوگرد یک ارگانیسم مرتبط با همزیستی مانند باکتری ها و قارچ ها برای جذب گوگرد از خاک به خصوص در شرایط کم گوگرد استفاده می کنند. بنابراین گوگرد جزئ بسیار مهمی از متابولیسم گیاهان است و تجزیه و تحلیل آن با ابعاد مختلف برای بهبود سلامت کلی

گیاهان و حیوانات وابسته و همچنین انسان بسیار ضروری است. کمبود گوگرد منجربه توقف رشد گیاهان و در نهایت کاهش عملکرد می شود(Om Prakash et al .,2022). واکنش های شیمیایی که در گیاهان روی می دهد به عنوان متابولیسم شناخته می شوند. سلول ها خصوصا سلول های گیاهی دو دسته از ترکیبات را تولید می کنند. متابولیت های اولیه و متابولیت های ثانویه. متابولیت های اولیه مستقیما در رشد و متابولیسم درگیر هستند و شامل کربوهیدرات ها، لیپیدها،پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می باشند. در گیاهان متابولیت های اولیه طی فرایند فتوسنتز تولیدشده و سپس در ساخت ترکیبات سلول نقش آفرینی می کنند. این ترکیبات در حجم زیاد و با ارزش اقتصادی پایین تولید می شوند و عمدتا به عنوان ماده خام صنعت، موادغذایی و افزودنی ها کاربرد دارند.(Van Etten h et al., 2001).متابولیت های ثانویه از بیوسنتز متابولیت های اولیه به دست می آیند و به عنوان ترکیبات فرعی و انتهایی متابولیسم اولیه در نظر گرفته می شوند. همچنین این ترکیبات در فرایندهای متابولیسمی وارد نمی شوند.مهم ترین متابولیت های ثانویه آلکالوئیدها، فنولیک ها، روغن های ضروری، استروئیدها، لیگنین ها، تانن ها و فلاوونوئیدها هستند. متابولیت های ثانویه عمدتا در گونه ها و خانواده های خاصی از سلسله گیاهان تولید می شوند.این ترکیبات به مقدار کمی در سلول ذخیره شده وعمدتا در سلول های تخصصی ودر مرحله خاصی از چرخه زندگی گیاه تولید می شوند و همین امر استخراج و تخلیص آن ها را در مقایسه با متابولیت های اولیه که در تمام سلول ها تولید می شوند ، دشوار می کند. گیاهان دارویی از لحاظ میزان متابولیت های ثانویه بسیار غنی هستندو ترکیبات آنها را در انگلیسی Medicinal یاOfficinalمی نامند(Van Etten h et al ,2001).

۲-موادوروش ها

۲-۱-سنتز نانوذرات گوگرد

به منظوربه دست آوردن نانوذرا ت گوگرد،ابتدا۱۰۰ گرم پودردارچین(C.zeylanicum)را وزن کرده و۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر اضافه می کنیم بعد از جوشاندن به مدت ۱۰ دقیقه و عبود دادن ازکاغذ صافی سانتریفیوژبادور ۲۰۰۰به مدت ۲۰دقیقه انجام داده سپس به ۱۰۰ میلی لیترمحلول رویی، تیوسولفا ت سدیم(Na2s2o3) تحت هم زدن به مد ت ۱۵ دقیقه در دما ی اتاق اضافه شد وسپس با آب مقطر استریل تا ۱۰۰میلی لیتر رقیق شد.برای ته نشینی یکنواخت گوگرد، اسید کلریدریک (٪۳۲، HCl)قطره قطره به محلول تحت هم زدن ملایم(تا مشاهده شدن رسوب) اضافه شد.پس از اولتراسیون به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفیوژبا دور ۸۰۰۰به مد ت ۱۵ دقیقه انجام گرفت وپس از دورریختن مایع رویی، رسوبا ت چندین باربا اتانول مطلق و آب مقطر شسته شدند. نانوذرا ت گوگرد خالص شده درواکیوم در دما ی ۶۰درجه سانتی گرادبه مدت ۲۴ساعت خشک شدند. محصول به صور ت پودر زرد روشن ظا هرشد که توسطTGA ، XRD،DLS آنالیز شد.اندازه ذرات نانو ۶۳ نانومتر بود.

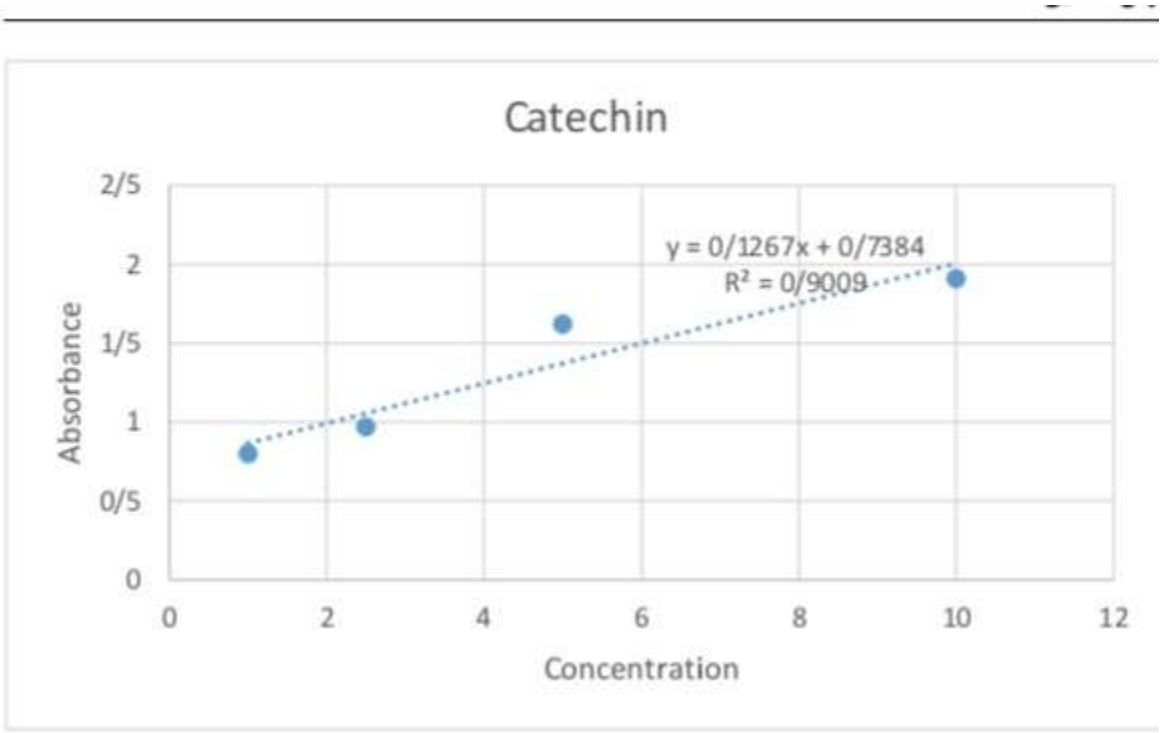
۲-۲-مراحل کشت وتیمار

پس از تهیه خاک گلدان ها ، بذور رازیانه مورد کشت قرارگرفتند. بعداز آبیاری و رسیدگی ، محلول نانوذرات گوگرد در غلظت های مختلف(۱و۰/۱و۰/۰۱میلی گرم بر میلی لیتر)بر روی گیاهان رشد کرده در شرایط گلخانه ای، به مدت۲هفته اسپری شدند ودر این مدت آبیاری گلدان ها با آب مقطر انجام گرفت. پس ازبرداشت اندام هوایی گیاه، پارامترهایی نظیر میزان پروتئین، میزان آنزیم های آنتی اکسیدانت (آنزیم کاتالاز،آسکوربات پراکسیداز ،پلی فنل اکسیداز)مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲-سنجش های فیتوشیمیایی

۱-۳-۲-سنجش میزان فلاونوئید ها

میزان فلاونوئید های کل در نمونه مورد بررسی به روش رنگ سنجی توسط آلومینیوم کلراید اندازه گیری شد.۰,۲ گرم از نمونه گیاهی در۱۰میلی لیتر متانول کوبیده و عصاره گیری شد .به ۰,۵میلی لیتر از عصاره حاصل، ۴,۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد تا حجم۵ میلی لیتر بدست آید. به محلول رقیق شده حاصل،۰,۳میلی لیتر ۲□□□□۵ درصد و پس از۵ دقیقه، ۰,۵میلی لیتر از ۳□□□□ ۱۰ درصد اضافه گردید. در انتها ۲ میلی لیتر NaOH ۱مولار و ۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و شدت جذب محلول در طو ل موج ۵۱۰نانومتر اندازه گیری شد .برای بررسی غلظت فلاوئید ها، از منحنی استاندارد کاتچین استفاده شد .



شکل ۱-۱-منحنی استاندارد کاتچین

۲-۳-۲-سنجش میزان آنتوسیانین ها

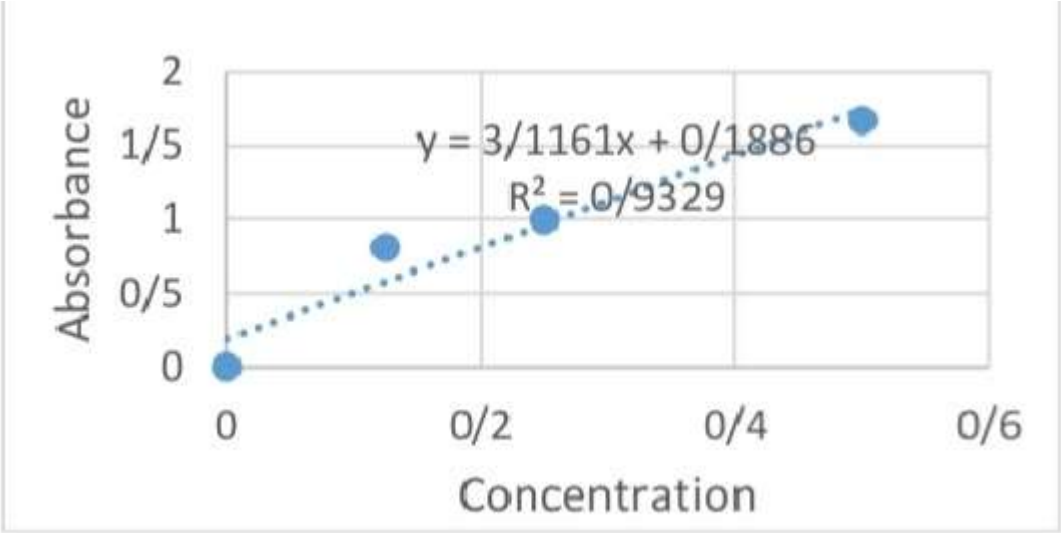
۰،۵ گرم برگ تازه با مقداری متانول اسیدی به نسبت۱به ۹۹ کاملا ساییده شده و عصاره به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دردمای ۲۵ درجه سیلیسیوس قرار گرفته شد. سپس به مدت ۱۰دقیقه با سرعت۱۰۰۰دور در دقیقه در سانتریفیوژ ، ساتریفیوژ شد و جذب محلول رویی در طول موج۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت، از فرمول A=ƐBCاستفاده شد که A ،جذب محلول ، ɛبرابر با ۳۳۰۰۰ بر سانتی متر در مول ، Bمساوی با عرض کووت که مساوی با۱ سانتی متر بود و C ،غلظت کمپلکس بر اساس µg.g-1FWمی باشد.

۳-۳-۲-سنجش تانن کل

۱ میلی لیتر از عصاره متانولی گیاه را با۱۰۰ میلی گرم PVPP(پلی وینیل پلی پیرولیدون)مخلوط شده و به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچا لدار با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شده و جذب آن در ۷۶۰نانومتر اندازه گیری شد. تانن موجود در نمونه، توسط PVPP رسوب داده شده است. بنابراین برای اندازه گیری مقدار تانن کل، باید میزان فنول از میزان تانن کل کم شود. منحنی استاندارد نیز همان منحنی استاندارد گالیک اسید می باشد.

٤-۳-۲-سنجش فنل کل

۰،۱ گرم از هر نمونه در ۱۰میلی لیتر اتانول۹۶ درصد کوبیده و عصاره آن بدست آمد. عصاره بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفت. به محلول حاصل۱میلی لیتر اتانول ۹۵درصد، ۰،۵ میلی لیتر فولین۵۰ درصدو۱میلی لیتر کربنات سدیم۵ درصد اضافه شد. شدت جذب در طول موج۷۲۵ نانومتر پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی، خوانده شد. منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت ترکیب های فنلی کل، نمودار گالیک اسید می باشد.



۲-۱-منحنی استاندارد گالیک اسید

۳-یافته های پژوهش

۳-۱-فلاوونوئید کل

نتایج به دست آمده از جذب طول موج و بررسی آن ها با معادله منحنی استانداردکاتچین ، نشان داد میزان فلاوونوئید کل ، با اعمال تیمار نانوذرات گوگرد با غلظت۰,۰۱در مقایسه با تیمار شاهدکاهش می یابد ولی این کاهش معنادار نیست ودر غلظت ۰,۱و۱نانوذرات میزان فلاونوئید افزایش معنادار دارد(جدول ۱-۳). تجمع فلاوونوئیدها نوعی مکانیسم دفاعی در گیاهان می باشد.این پدیده در بسیاری از گیاهان مشاهده می شودو باعث افزایش ترکیبات فنلی در پاسخ به تنش در گیاه می شود .

(Inse et al.2002) بنابراین افزایش فلاوونوئیدهادراین پژوهش نوعی مکانیسم دفاعی گیاه در تنش اکسیداتیو به حساب می آید.

۳-۲-فنل کل

نتایج حاصل از بررسی داده ها نشان می دهد که مقدار فنول کل در گیاه تحت تیمار نانوذرات گوگرددر غلظت ۰,۰۱ افزایش ودر غلظت ۰,۱ کاهش یافت ولی این افزایش و کاهش در غلظت های مربوطه معنادار نبودوغلظت ۱میلی گرم بر میلی لیتر نانوذرات

تاثیر بسیار خوبی در افزایش میزان فنل کل گیاه داشت.کاهش میزان فنول کل در غلظت ۰,۱ می تواند نشان دهنده کاهش تنش اکسیداتیو در اثر عملکرد فنل در غلظت ۰,۰۱ باشد(جدول ۱-۳).

۳-۳-تانن

بررسی داده های حاصل از جذب طول موج تیمارهای مختلف تحت آزمایش با معادله منحنی استاندارد گالیک اسید نشان دهنده تفاوت معنادار داده ها در سطح احتمال ۰,۰۵ بود.غلظت ۰,۰۱و۰,۱میلی گرم برمیلی لیتر نانوذرات گوگردباعث کاهش محتوای تانن کل نسبت به تیمار شاهد شدکه این کاهش در غلظت ۰,۰۱ معنادار نبودو در غلظت ۰,۱ معنادار بود(جدول۱-۳).تانن همانند فنول جاروب کننده گونه فعال اکسیژن می باشدتغییرات محتوای تانن در غلظت۰,۱همانند فنول نشان دهنده نقش مثبت نانوذرات در کاهش رادیکال های آزادو بهبود شرایط رشد گیاه است.با این حال غلظت بالای نانوذرات گوگرد (۱میلی گرم بر میلی لیتر)به میزان قابال توجهی محتوای تانن کل را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش دادواین نشانگر استرس اکسیداتیو در گیاه رازیانه می باشد.

۴-۳-آنتوسیانین

نتایج بررسی ها نشان دادکه در غلظت ۰,۰۱ نانوذرات گوگرد مقدار آنتوسیانین کاهش یافت که این کاهش نسبت به تیمار شاهد معنادار نبودوبا افزایش غلظت نانوذرات گوگرد (۰,۱و۱میلی گرم بر میلی لیتر) مقدار آنتوسیانین نسبت به گروه شاهدافزایش معنی داری داشته اندکه این تغییرات هم سو با تغییرات فلاوونوئید ها می باشد(جدول ۱-۳).گیاهان برای مقابله با تنش از سازو کارهای مختلفی مانندافزایش متابولیت های ثانویه شامل فلاوونوئیدها و آنتوسیانین ها استفاده می کنند،این ترکیبات نقش آنتی اکسیدانی دارندوجاروب کننده گونه های فعال اکسیژن هستند (Ali et al.,2006) .

Parameters / Sulfur Nanoparticle	Total Tannin (µgr/grFW)	Total Phenol (µgr/grFW)	Anthocyanin (µgr/grFW)	Flavonoids (µgr/grFW)
Control	۰.۵۰۲۳۳□۰.۰۲۷۱۸۰□	۰.۵۳۰۰۰□۰.۰۲۴۱۷۳□□	۰.۰۷۲۶۷□۰.۰۰۲۰۲۸□	۴.۹۱۲۰۰□۰.۰۵۲۶۹۱□

۰,۰۱ (mg/ml)	۰,۴۳۳۰۰±۰,۰۰۷۲۱۱	۰,۵۵۵۰۰±۰,۰۰۵۷۷۴	۰.۰۷۰۳۳±۰.۰۰۰۸۸۲	۴.۸۹۳۳۳±۰.۱۱۶۲۴
۰,۱ (mg/ml)	۰,۳۲۸۶۷±۰,۰۲۳۳۹۰	۰.۴۳۲۰۰±۰.۰۲۳۶۲۹	۰.۱۱۲۳۳±۰.۰۰۲۶۰۳	۵.۱۹۶۰۰±۰.۰۴۱۷۶۵
۱ (mg/ml)	۰,۶۷۶۶۷±۰,۰۵۹۳۰۸	۰.۷۶۴۰۰±۰.۰۵۷۰۱۲	۰.۱۳۱۳۳±۰.۰۰۲۱۸۶	۵.۰۸۵۶۷±۰.۰۰۴۳۳۳

جدول ۱-۳-نتایج حاصل از آنالیز آماری یک فاکتوریل پارامترهای فیتوشیمیایی

اعداد، میانگین ۳ تکرار±انحراف معیار،حروف متفاوت نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است($P<0.05$)

۴-بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان دادکه سنتز سبز نانوذرات گوگرداز تیوسولفات سدیم از طریق عصاره پوست درخت دارچین که دارای ترکیبات پلی فنلی به عنوان عوامل احیاکننده موثر است، انجام شد.بدیهی است که پوست درخت دارچین دارای مقدار قابل توجهی آنتی اکسیدان قوی مانند ترکیبات پلی فنلی است(Krishnakumar et al.2014)

به خوبی شناخته شده است که عنصر گوگرد به عنوان یک ماده مغذی ضروری در گیاهان، عملکردهای مختلفی ایفا می کنندو به خاطر اهمیت ویژه ای که در ساختار و عملکرد برخی کوآنزیم ها دارد، نقش مهمی در فرایندهای متابولیکی برعهده دارد.علاوه بر این ، این ماده در ساختار برخی اسیدهای آمینه ضروری و متابولیت ها نیز به کار می رود (Hasanuzzaman et al .2018)بنابراین گوگردعلاوه بر تاثیرش بر رشد گیاه در شرایط طبیعی ، در پاسخ به شرایط نامطلوب و القای مکانیسم دفاعی گیاه تحت تنش های محیطی نیز می تواندنقش مهمی داشته باشد(Capaldi et al.2015)

با افزایش غلظت موادمغذی مانند گوگرد، انواع رادیکال های آزاد تولید می شودکه باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می شود.تجمع ترکیبات فنلی مکانیسمی برای افزایش سازگاری و بهبود رشد گیاه در شرایط محیطی نامساعد است. نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات گوگرد (۱میلی گرم بر میلی لیتر)باعث افزایش معنی دار فلاونوئیدها، فنل کل ، تانن و محتوای آنتوسیانین گیاه رازیانه در مقایسه با تیمار شاهد می شود.که مطابق با نتایج به دست آمده از اثر نانوذرات گوگرد برگیاه کاهو(Najafi et al.2020)واثر نانوذرات نقره روی سیب زمینی(Bagherzadeh Homaee وEhsanpour،۲۰۱۵) و آرابیدوپسیس(Nair وChung،۲۰۱۴)است.ترکیبات فنلی در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول گیاهی سنتزمی شوند، با وجود این ، تنش های محیطی مختلف مقدار آنها را در سلول تغییر می دهند.(Kliebenstein,2004)ترکیبات فنلی دارای ویژگی آنتی اکسیدانی هستند که با

جمع آوری و احیای گونه های فعال اکسیژن از اکسیداسیون متابولیت های حیاتی سلول پیشگیری کرده و مانع بروز تنش اکسیداتیو در سلول های گیاهی می شود(Rice-Evans et al.,1997;Myung.Min et al.,2009)

گیاهان برای مقابله با تنش ها از سازو کارهای مختلفی مانند افزایش متابولیت های ثانویه شامل فلاونوئیدو آنتوسیانین استفاده می کنند. این ترکیبات نقش آنتی اکسیدانی دارندو جاروب کننده گونه های فعال اکسیژن هستند(Ali et al,2006)

فلاونوئیدها به عنوان جاروب کننده های رادیکال های آزاد هستند و همچنین قادرندبسته به ساختار مولکولی خود به عنوان کلاتورهای فلزی عمل کنند(Soczynska-Kordala et al.,2001)

در مطالعه حاضر، تحت غلظت۰,۰۱میلی گرم برمیلی لیتر نانوذرات گوگرد، محتوای فلاونوئید کاهش و در غلظت (۰,۱و۱ نانوذرات گوگرد)افزایش داشت. افزایش مقدار فلاونوئیدها توسط فلزات نقره وکروم در گیاه *Ononis arvensis*(Tumova and Polivkova,2006)و نیز توسط فلز مس در گیاه *Digitalis lanata* گزارش شده است(Bota and Deliu,2011).فلاونوئیدها دارای گروه های هیدروکسیل و کربوکسیل هستندکه قادرندبه طور اختصاصی به عناصر سنگین پیوند برقرار کنند(jung et al,2003). تغییرات میزان فلاونوئید همسو با تغییرات آنتوسیانین در غلظت های مربوطه میباشد.افزایش محتوای آنتوسیانین و فلاونوئیددر گیاه کاهو تحت تیمار نانوذرات گوگرد (Najafi et al,2020) گزارش شده است.

آنتوسیانین ها از مهم ترین ترکیبات آنتی اکسیدانی در گیاهان هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکال های آزاد را ازبین می برند، بلکه ازتولید بیشترآنهادر گیاه جلوگیری می کنند.آنتوسیانین ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول ها و در نتیجه جمع آوری آنها از سایر بخش ها می شوند (Tripathi et al.,2006) .بیشتر مطالعات اخیر نشان داده است که آنتوسیانین ها در پاسخ به انواع تنش، از جمله تنش فلزات سنگین، سنتز شده اند (Hale et al., 2001). Kalantariو □□□۰□۰(۲۰۰۵)گزارش کردند که کادمیوم در غلظت های بالا باعث افزایش آنتوسیانین در گیاه کلزا شده است. Marrs و Walbot(۱۹۹۷) بیان کردند که کادمیوم میتواند سنتز آنزیم گلوتاتیون-S-ترانسفراز(GST) را تحریک و به تولید آنتوسیانین منجر شود. GST،آنزیم کلیدی در مرحله نهایی بیوسنتز آنتوسیانین است. (Schreder et al.,2003)هچنین، گزارش شده است که مولیبدن باعث افزایش میزان آنتوسیانین در گیاه کلزا (Kutchan,1995) وفلز مس باعث افزایش آنتوسیانین در گیاه شیرین بیان می شود(سلطانی نژاد و همکاران.۱۳۹۲). با توجه به مطالعات یاد شده میتوان احتمال داد که در پژوهش حاضر نیزنانوذرات گوگرد با تحریک بیان ژن های درگیر در تولید متابولیت ثانویه از جمله GSTبه افزایش تولید آنتوسیانین منجر شده باشد.

فعالیت ترکیبات فنلی مربوط به خواص اکسیداسیون -احیاء آنهاست که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی رادیکال های آزاد، فرونشانی اکسیژن های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارد(Javanmardi et al,2002).

نتایج حاصل از اندازه گیری ترکیبات فنلی کل نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات گوگرد(۱میلی گرم بر میلی لیتر) میزان ترکیبات فنلی بطور معنی داری افزایش می یابدو بیشترین میزان ترکیبات فنلی در گیاه رازیانه در غلظت۱ میلی گرم بر میلی لیتر نانوذرات

گوگرد مشاهده می گردد. ترکیبات فنلی به عنوان یکی از ترکیبات آنتی اکسیدان شناخته شده اند که با مکانیسم های متعدد مثل ربایش رادیکال های آزاد، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلاته کردن یون های فلزی و یا قرارگرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم های پراکسیداز، نقش آنتی اکسیدانی خود را ایفا می کنند .این ترکیبات همچنین با انتقال سریع هیدروژن به رادیکال های لیپید، از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها ممانعت می کنند (Chu and chang ,2000)ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می گردند، اما تنش های محیطی مقدار آنها را در سلول تغییر میدهند. تغییر در بیوسنتز آنزیم های بیوسنتزکننده یا تجزیه کننده این ترکیبات بر مقدار آنها در سلول تأثیر می گذارد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین ها، تانن ها، هیدروکسی سینامیک استرها و لیگنین ها از ترکیبات فنلی و جزء متابولیت های ثانویه حاصل از مسیر فنیل پروپانوئید هستند که در بافت های گیاهی به وفور یافت می شوند. آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)آغازگر مسیر فنیل پروپانوئید است که L-فنیل آلانین را با دآمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می کند (Solecka, ۱۹۹۷).فنیل آلانین آمونیالیاز یک آنزیم کلیدی است که نقش موثری در تغییر مسیر کربن از متابولیسم اولیه به سمت تولید ترکیبات فنلی دارند(Hopkins,1999)افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز که اولین آنزیم مسیر بیوسنتز فنل ها است، در پاسخ به برخی تنش های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است. آنزیم PALمی تواند به عنوان آنزیم آنتی اکسیدان در نظر گرفته شود، زیرا دارای خاصیت به دام اندازی رادیکال های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (Tian and Li,2007). در گیاه بابونه تحت تنش کادمیوم و مس نیز افزایش فعالیت آنزیم PAL گزارش شده است (Kovacik and Backor, 2007) . افزایش میزان ترکیبات فنلی در گیاه بادرنجبویه تحت تأثیر سلنیوم نیز گزارش شده است(حبیبی و همکاران، ۱۳۹۵). ب

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و افزایش میزان ترکیبات فنلی کل در گیاه رازیانه تحت تیمار نانوذرات گوگرد، به نظر می رسد که افزایش ترکیبات مختلف فنلی (به عنوان یک جزء آنتی اکسیدان غیرآنزیمی) نقش بسیار مهمی در پاسخ گیاه رازیانه به تنش ایجاد شده ایفا می کند. این ترکیبات آنتی اکسیدان های نیرومندی در بافت های گیاهی تحت شرایط تنش می باشند و این خاصیت به دلیل ساختار اسکلتی و گروه فنل این متابولیت ها است. گروههای هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به وسیله جاروبگری رادیکال ها و سایر مکانیسم ها مانند فروکشی اکسیژن یکتایی ، آسیب های اکسیداتیو را کم کرده و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از تأثیرات منفی تنش محافظت می کنند و همچنین با عمل لیپواکسیژناز از اکسیداسیون لیپید جلوگیری می کنند. گزارش مشابهی مبنی بر افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی تحت شرایط تنش اکسیداتیو توسط Mohdaly و همکاران (۲۰۰۹)ارائه گردید. در سال های اخیر ترکیبات فنلی به دلیل داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی به شدت مورد توجه قرار گرفته است.

تانن هااز جمله ترکیبات فنلی موجود در گیاه هستند که دارای عمل آنتی اکسیدانی نیز هستند . گیاهان غنی از تانن نظیر چای که به زیادی منگنز مقاوم هستند، توسط کلاته شدن مستقیم فلز منگنز با ترکیبات فنلی در برابر مقدار زیاد آن محافظت می شوند . کلاته شدن مستقیم با اتصال باپلی فنل ها در گیاهان تیره *Nympheace* که در تنش بافلزات سنگین کادمیوم، سرب و جیوه قرار گرفتند نیزگزارش شده است (Lavid et al., 2002).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق ، میزان تانن کل تحت تیمار نانوذرات گوگرد در غلظت ۰,۰۱ و ۰,۱میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت که این کاهش در غلظت ۰,۰۱ معنادار نبود ودر غلظت ۰,۱ کاهش معناداری در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد.بیشترین میزان تانن کل در بالاترین غلظت نانوذرات گوگرد(۱میلی گرم برمیلی لیتر)مشاهده شد. محتوی تانن کل گیاه هم از اعضای سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی در گیاه می باشند که با جاروب کردن گونه های فعال اکسیژن، مکانیسم دفاعی گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو آماده می کند.کاهش محتوای تانن کل در غلظت ۰,۱ نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیمی گیاه در کنار فعالیت سیستم غیرآنزیمی می باشد.این تغییرات می توانند نشان دهنده تاثیر تیمار نانوذرات گوگرد در مکانیسم دفاعی و بهبود عملکرد آن باشد.

۶- نتیجه گیری کلی

در این پژوهش، محلول پاشی نانوذرات گوگرد با اندازه متوسط ۶۰ نانومتر با غلظت های مختلف بر روی اندام هوایی گیاه رازیانه باعث بهبود برخی پارامترهای فیتوشیمیایی در این گیاه شد.موثرترین غلظت این نانوذرات برای بهبود ویژگی های فیتوشیمیایی رازیانه ، ۱میلی گرم بر میلی لیتر که بالاترین غلظت اعمال شده بود، تعیین شد.به عنوان نتیجه گیری کلی ، استفاده از نانوذرات گوگردبا غلظت ۱میلی گرم بر میلی لیتر ، برای افزایش میزان متابولیت های ثانویه به هدف استفاده در صنایع دارویی و نیز بهبود رشد وویژگی های فیتوشیمیایی این گیاه پیشنهاد می شود

۷- منابع

- حبیبی، ق.، قربانزاده، پ. و عابدینی، م.)۱۳۹۵)تأثیر سلنیوم بر برخی ویژگیهای فیزیولوژیک گیاه دارویی بادرنجبویه. نشریه علمی تحقیقاتی گیاهان دارویی و معطر ایران ۷۸ :۶۹۸- ۸۱۵

- Ali, M. B., Khatun, S., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. (2006) Enhancement of phenylpropanoid enzymes and lignin in Phalaenopsis orchid and their influence on plant acclimatisation at different levels of photosynthetic photon flux. Plant Growth Regulation 49: 137-146.

-- Bagherzadeh Homaee M, Ehsanpour AA (2015) Physiological and biochemical responses of potato (Solanum tuberosum) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under in vitro conditions. Indian J Plant Physiol 20(4):353–359

- Bota, C. and Deliu, C. (2011) The effect of copper sulphate on the production of flavonoids in Digitalis lanata cell cultures. Farmacia 59: 113-118.

- Capaldi FR, Grata˜o PL, Reis AR, Lima LW, Azevedo RA (2015) Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. Tropical Plant Biol 8:60–73

- Cho, K. H., Park, J. E., Osaka, T. and Park, S. G. (200۵) □□□ □□□□□ □□ □□□□□□□□□□□□□ □□□□□□□□ and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta 51: 956-9۶۰.

- Chu, Y. H. and Chang, C. L. (2000) Flavonoid contents of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Science 80: 561-566.

- Dudo, A., Choi, D. and Scheufele, D. A. (2011) Food nanotechnology in the news. Coverage patterns and thematic emphases during the last decade. Appetite 56: 78-89.

- Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N. and Triffault-Bouchet, G. (2013) Interaction between sliver nanoparticles and plant growth. In: International symposium on new technologies for environment control, energysaving and crop production in greenhouse and plant factory–greensys, Jeju, Korea, 6–11 Oct.

- Hale, K. L., McGrath, S. P., Lombi, E., Stack, S. M., Terry, N., Pickering, I. J., George, E. A. and Pilon-Smits, E. A. H. (2001) Molybdenum sequestration in Brassica species. a role for anthocyanins? Plant Physiology 126: 351-358.

- Hasanuzzaman M, Hossain MS, Bhuyan MHMB, Al Mahmud J, Nahar K, Fujita M (2018) The role of sulfur in plant abiotic stress tolerance: molecular interactions and defense mechanisms. In: Hasanuzzaman M, Fujita M, Oku H, Nahar K, HawrylakNowak B (eds) Plant nutrients and abiotic stress tolerance. Springer, Singapore, pp 221–252

- Inze D, Montagu M V. (2000) Oxidative stress in plants.TJ International Ltd, padstow, Cormawall.Great Brotaon :321.

- Javanmardi J; Khalighi A; Khashi A; Bais HP and Vivanco JM. Chemical characterization of Basil (Ocimum basilicum L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. J. Agricultural and Food Chem. 2002; 50: 5878 - 83.

- Jung, C. H., Maeder, V., Funk, F. and Frey, B. (2003) Release of phenols from Lupinus albus L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. Plant and Soil 252: 301-312.

- Kalantari, M. K. and Oloumi, H. (2005) Study the effects of CdCl2 on lipid peroxidation and antioxidation compounds content in Brassica Napus. Iranian Journal of Science and Technology ۲۹: ۲۰۱-۲۰۸.

- Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E. and Villagarcia, H. (2012) Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano 6:2128.

- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., and Schuster, E. W. (2012) Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. Crop protection 35: 64-۷۰.

- Kliebenstein, D. J. (2004) Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinged glasses. Plant Cell and Environment 27: 675-684.

- Kovacik, J. and Backor, M. (2007) Phenylalanine ammonialyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. Water, Air and Solil Pollution 185: 185-۱۹۳

- Krishnakumar IM, Issac A, Johannah NM, Ninan E, Maliakel B, Kuttan R (2014) Effects of the polyphenol content on the anti-diabetic activity of Cinnamomum zeylanicum extracts. Food Funct 5:2208-20

- Kutchan, T. M. (1995) Anthocyanin biosynthesis (maize and Arabidopsis genes) secondary metabolite derivatives. Plant Cell 7: 1059-1070

- Lavid, N. S., Yarden, O. and Tel-Or, E. (2002) The involvement of polyphenols and peroxidase acitivities in heavy metal accumulation by epidermal glands of waterlily (Nymphaeceaea). Planta 212: 323- 328

- Marrs, K. A. and Walbot, V. (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. Plant Physiology 113: 93-۱۰۲

- Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A. and Smetank, I. (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 218-226.

- Myung-Min, H., Trick, H. N. and Rajasheka, E. B. (2009) Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of Plant Physiology 166: 180-191.

- Nair PMG, Chung IM (2014) Assessment of silver nanoparticleinduced physiological and molecular changes in Arabidopsis thaliana. Environ Sci Pollut Res 21:8858–۸۸۶۹

- Najafi S, Razavi SM, Khoshkam M, Asadi A (2020) Effects of green synthesis of sulfur nanoparticles from Cinnamomum zeylanicum barks on physiological and biochemical factors of Lettuce (Lactuca sativa). Physiol Mol Biol Plants 26:1055-1066

- Om Prakash Narayan, Paras Kumar, Bindu Yadav, Meenakshi Dua & Atul Kumar Johri (2022): Sulfur nutrition and its role in plant growth and development, Plant Signaling & Behavior, DOI: ۱۰.۱۰۸۰/۱۵۵۹۲۳۲۴.۲۰۲۲.۲۰۳۰۰۸۲

- Park, H. J., Kim, S. H., Kim, H. J. and Choi, S. H. (2006) A new composition of nanosized silica-silver for control of various plant diseases. The plant pathology journal 22: 295-302.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Science 2: 152-159.

- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M, Peralta-Videa, J. R. and GardeaTorresdey, J. L. (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. Journal of agricultural and food chemistry 59:3485–3498.

- Schreder, P., Fischer, C., Debus, R. and Wenzel, A. (2003) Reaction of detoxification mechanism in suspension cultured spruce cells (picea abies L.) to heavy metals in pure mixture and in soil elutes. Environmental Science and Pollution Research 10: 225-234

- Shah, V. and Belozerova, I. (2009) Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. Water, Air, and Soil Pollution 197: 143-148.

- Chu, Y. H. and Chang, C. L. (2000) Flavonoid contents of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Science 80: 561-566.

- Soczynska-Kordala, M., Bakowska, A., Oszmianski, J. and Gabrielska, J. (2001) Metal ion flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. Cellular and Molecular Biology Letters 6: 277-281

- Solecka, D. (1997) Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factor. Plant Physiology 19: 257-268.

- Tian, X. and Li, Y. (2007) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologa Plantarum 50: 775-778.

- Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. and Gaur, J. P. (2006) Oxidative stress in scenedemus sp. during short and long-term exposure to Cu and Zn. Chemosphere 62: 538-544.

- Tumova, L. and Polivkova, D. (2006) Effect of AgNO3 on the production of flavonoids by the culture of Ononis arvensis L. in vitro. Ceska Slovenska Farmacie 55: 186-188.

- Van Etten H, Temporini E, Wasmann C, 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? Physiological and Molecular Plant Pathology, 59: 83 -93 .