

القاء تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های جو (*Hordeum vulgare* L.) در پاسخ به نانوذره نقره

مریم نوروزی^{۱*}، محمود رضا تدین^۲ و سعید نوروزی^۳

چکیده

تنش‌های محیطی سبب تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان شده که به نوبه خود سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، تخریب غشای سلول و تخریب پروتئین‌ها می‌شوند. برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که نانوذرات، همانند سایر تنش‌های غیرزیستی، تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القاء می‌کنند که در غلظت‌های بالا برای سلول زیان‌آور هستند. هدف از این پژوهش، بررسی اثر نانو ذره نقره بر فعالیت سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدان در گیاه جو بوده است. در این پژوهش گلدانی، تأثیر نانوذرات نقره در ۴ غلظت صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی روی گیاه جو انجام شد و پس از ۴۰ روز، تغییرات میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون‌دآلدهید (MDA)، پروتئین و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان پرولین در برگ‌های جو ارزیابی شدند. بر اساس نتایج، با افزایش غلظت نانوذره نقره، میزان H_2O_2 ، MDA، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پرولین برگ افزایش پیدا کرد در حالیکه میزان پروتئین برگ کاهش یافت. نانوذرات نقره از طریق فعال‌سازی و تحریک تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل پراکسید هیدروژن اثرات مخربی بر ماکرومولکول‌هایی مثل لیپیدها، پروتئین و سایر ترکیبات داشته و سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش مالون‌دآلدهید، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، می‌شود و گیاه برای مقابله با اثرات مضر این ذرات، شروع به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پرولین می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداسیون لیپیدی، پراکسید هیدروژن، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، نانوذرات.

ارجاع: نوروزی م. تدین م. ر. و نوروزی س. ۱۳۹۵. القاء تنش اکسیداتیو در گیاهچه‌های جو (*Hordeum vulgare* L.) در پاسخ به نانوذره نقره. نشریه گیاه زراعی و تنش‌های محیطی. (۱۱): ۱۹-۱۱.

۱- دانشجوی دکتری رشته فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران.

۲- دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.

۳- کارشناس ارشد آگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.

* نویسنده مسئول: M.norouzi1366@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰

مقدمه

نانوذرات، موادی در اندازه‌های یک تا صد نانومتر هستند (نل و همکاران، ۲۰۰۶). این مواد به میزان زیادی در طبیعت وجود دارند و در بسیاری از فرآیندهای طبیعی مثل واکنش‌های فتوشیمیایی، فوران‌های آتشفشانی، آتش‌سوزی جنگل‌ها، فرسایش و همچنین با ریختن پوست گیاهان و موی جانوران تولید می‌شوند (بوزا و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین، اکثر موجودات و به‌ویژه آن‌هایی که به شدت با محیط‌های اطراف خود تعامل دارند، انتظار می‌رود که به دلیل قرارگرفتن در معرض نانوذرات تحت تأثیر قرار گیرند (مونیکا و کرمونینی، ۲۰۰۹). اگرچه ساز و کار سمیت ذرات نانو تا حدودی ناشناخته است؛ ولی برخی پژوهش‌گران بیان داشته‌اند که این عمل، شدیداً به ترکیبات شیمیایی، ساختار شیمیایی، اندازه و سطح نانوذرات وابسته است و چگونگی اثر ذرات نانو تحت تأثیر دو ماهیت مختلف شیمیایی ترکیب از قبیل رهاسازی یون‌ها و تنش یا تحریک ایجاد شده به وسیله سطح، اندازه یا شکل نانوذرات نسبت داده می‌شود (برونر و همکاران، ۲۰۰۶).

برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که نانوذرات، همانند سایر تنش‌های غیرزیستی، تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القاء می‌کنند که در غلظت‌های بالا برای سلول زیان‌آور هستند (هانگ و همکاران، ۲۰۰۵ و لو و همکاران، ۲۰۰۲). تولید این ترکیبات مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) سبب پراکسیداسیون چربی‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها و تخریب غشاهای سلول می‌شود (بیلی، ۲۰۰۴ و مک دونالد، ۱۹۹۹). همچنین، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط گونه‌های فعال اکسیژن منجر به خسارت به غشاها، افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش شاخص پایداری غشاء می‌شود (دیندا، ۱۹۹۱).

برای رهایی و پاک‌سازی سلول از ترکیبات فعال اکسیژن و آسیب‌های حاصل از رادیکال‌های آزاد، سیستم‌های متفاوتی وجود دارند که سبب خروج، از بین رفتن یا محدود کردن تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول می‌شوند (قربانی‌قوجدی و لادن مقدم، ۲۰۰۶). یکی از سیستم‌های دفاعی گیاهان در برابر این تنش‌ها، از طریق فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و به دنبال آن از بین رفتن رادیکال‌های آزاد است. آنزیم‌های حفاظتی در برابر رادیکال‌های آزاد، شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)،

گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) هستند (سامی، ۱۹۹۳). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، پراکسیداز (POD)، آسکوریات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون ردوکتاز (GR) سبب حذف و غیرفعال شدن گونه‌های فعال اکسیژن و آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوریات پراکسیداز سبب حذف و کاهش خسارت پراکسید هیدروژن می‌شوند (بیلی، ۲۰۰۴). اولین آنزیم پاک‌سازی کننده گونه‌های فعال اکسیژن، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است که سبب تبدیل O_2^- به H_2O_2 می‌شود (آسادا، ۱۹۹۴).

آنزیم کاتالاز نیز یک اکسیدو ردکتاز است (اسکندالیوس، ۱۹۹۳) و القای فعالیت کاتالاز از طریق سم‌زدایی پراکسید هیدروژن، سبب غلبه بر تنش اکسیداتیو می‌شود و به همین دلیل، نقش حفاظتی برای غشاهای زیستی دارد (ماژودی و همکاران، ۲۰۰۲). افزایش در سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان القا شده توسط نانوذرات، نشان دهنده مکانیسم دفاعی ثانویه علیه تنش اکسیداتیو است (دیگزیت و همکاران، ۲۰۰۱). لو 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، جوانه‌زنی و رشد گیاه سویا نیز افزایش یافت. هانگ 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 یافت.

تان و لین (۲۰۰۹) نشان دادند که در حضور نانوتیوب‌ها، محتوای ROS افزایش یافت. میزان افزایش تولید ROS در سلول‌ها، بیانگر این است که سلول‌ها تحت تنش اکسیداتیو بوده و ممکن است سبب کاهش تکثیر سلول یا حتی مرگ سلول شوند. در پژوهشی، نل و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که القای تنش اکسیداتیو در سلول‌ها، یک جز کلیدی از اثرات زیستی بسیاری از انواع نانوذرات است.

جو با نام علمی *Hordeum vulgare*، گیاهی از خانواده غلات، یک‌ساله، تک‌پایه، روزبلند، مقاوم به شوری، خشکی و قلیائی بودن خاک (زند و لعلی‌نیا، ۱۳۹۰) و یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که توسط انسان اهلی شده است و دامنه انتشار و سازش اقلیمی وسیعی دارد و در ارقام دو ردیفه و شش ردیفه کشت می‌شود (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۸۹).

سنجش میزان H_2O_2 در اندام هوایی

اندازه‌گیری میزان H_2O_2 بر اساس روش موخرژه و چادوری (۱۹۸۵) انجام شد که 0.5 گرم نمونه برگ در 10 میلی‌لیتر استن سرد هموژنیزه شد هموژنات پشت کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. به کل عصاره 4 میلی‌لیتر کلرید تیتانیوم 1% افزوده تا رسوب هیدروپراکساید تشکیل شود. سپس 5 میلی‌لیتر محلول کنسانتره آمونیوم اضافه شد و در سانتریفیوژ با دور $10000 \times g$ قرار داده شد و سپس سوپرناتانت از محلول بالا جداسازی شد. رسوب حاصل در اسید سولفوریک 2 مولار حل شد و دوباره سانتریفیوژ شد و در نهایت میزان رنگ زرد سوپرناتانت حاصل در طول موج 415 نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم H_2O_2 تعیین و ضریب تصحیح $1 \mu M \cdot cm^{-1}$ 0.28 در نظر گرفته شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی

سنجش غلظت مالون‌دآلدهید به عنوان محصول شاخص واکنش پراکسیداسیون اسیدهای چرب، با روش هس و پاکر (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. بر اساس این روش، یک گرم برگ را برداشته و در 4 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید/ 1 (TCA) درصد به طور کامل ساییده شد. عصاره حاصل به مدت 5 دقیقه در دور $10000 \times g$ ، سانتریفیوژ شد. سپس به 1 میلی‌لیتر از محلول رویی، 4 میلی‌لیتر محلول TCA 20% درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم قرار داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت 10 دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با اسپکتروفتومتر در طول موج 532 نانومتر خوانده شد. جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی در 600 نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت MDA از فرمول $I=B \times E \times C$ استفاده شد که ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بود.

اندازه‌گیری پروتئین برگ

مقدار پروتئین برگ بر اساس روش برادفورد (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. بدین منظور 1 میلی‌لیتر از محلول برادفورد به همراه 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی پس از مخلوط شدن کامل، در دستگاه طیف‌سنج قرار داده شد و جذب محلول در طول موج 595 نانومتر ثبت شد. غلظت پروتئین

تاکنون مسائل حل نشده و چالش‌های زیادی مربوط به اثرات زیستی ذرات نانو وجود دارد. بنابراین، این بررسی با هدف ارائه اطلاعات جدیدی در مورد سیمت و نحوه فرایند مقابله گیاه جو با اثرات تنش‌زای نانوذره نقره به اجرا درآمد. نانونقره به علت فعالیت ضدباکتریایی که دارد، در حال حاضر یکی از مهم‌ترین ترکیبات مورد استفاده مردم است که در محصولات از قبیل خمیردندان، منسوجات، محصولات الکترونیکی و مواد شوینده به کار می‌رود (وان هاون و همکاران، ۲۰۰۹ و کودرس و مار، ۲۰۱۰). تولید و استفاده وسیع از این ذرات در تولید محصولات مختلف و انهدام آن‌ها سبب آزدسازی این ذرات به آب، هوا و خاک می‌شود.

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی غشا و تجمع پرولین روی گیاه جو (رقم هرتا)، این پژوهش در سال ۱۳۹۱ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و اثرات چهار غلظت از نانوذره نقره (صفر (شاهد)، 100 ، 200 و 300 میلی‌گرم بر لیتر) بررسی شد و نانوذره مورد استفاده از شرکت بازرگانی ایران- روسیه از تهران خریداری شد. در این پژوهش، برای ضدعفونی بذور، بذره‌های گیاه جو به مدت 5 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم 10% (آب ژاول) قرار گرفتند (تدین و همکاران، ۱۳۹۲) سپس با آب مقطر چندین بار شسته شدند. بذور مورد استفاده در سوسپانسیون نانونقره خیسانده شدند و برای تهیه غلظت‌های مورد استفاده، ذرات نانو در آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمدند و برای جلوگیری از ایجاد رسوب مواد در آب و تشکیل محلولی همگن، با استفاده از دستگاه شیکر مغناطیسی با ارتعاشات اولتراسونیک (100 وات، 40 هرتز) ساخت شرکت Heilscher آلمان به مدت 30 دقیقه در محلول پراکنده شدند و پس از آن، بذرها به گلدان‌های دارای پرلیت و شن منتقل شدند و به مدت 40 روز و بر حسب نیاز، با محلول هوگلند آبیاری شدند و در انتهای این دوره، نمونه‌برداری از برگ انجام شد. در نهایت، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداسیون لیپیدی غشا، میزان پراکسید هیدروژن و همچنین میزان پروتئین و پرولین برگ بر اساس روش‌های زیر اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت شد.

جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه پیگیری شد و فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به $\mu\text{moleH}_2\text{O}_2/\text{g.F.W}/\text{min}$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان پرولین

اندازه‌گیری پرولین بر اساس روش باتس (۱۹۷۳) انجام شد. این روش بر اساس تشکیل یک ترکیب رنگی در اثر واکنش میان اسید آمینه پرولین آزاد و معرفتی به نام نین‌هیدرین در شرایط اسیدی و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس تخلیص این ترکیب رنگی به کمک یک حلال آلی غیرقطبی مانند تولوئن استوار است.

آنالیز و تجزیه داده‌ها

داده‌های حاصل از پژوهش با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شد و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌های صفات مورد آزمایش، از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف نانوذره نقره بر میزان پراکسید هیدروژن، مالون‌دآلدهید، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، میزان پروتئین و پرولین برگ در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار را نشان داد.

نتایج نشان داد که بیشترین میزان مالون‌دآلدهید و پراکسید هیدروژن در اندام هوایی، مربوط به غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره بود (شکل ۱- الف و ب) به طوری که در شاخص میزان پراکسید هیدروژن، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره در مقایسه با غلظت‌های شاهد، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب افزایش معنی‌داری معادل ۱۳۷/۶، ۴۷/۵ و ۱۱/۷ درصد و در شاخص میزان مالون‌دآلدهید، غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره در مقایسه با غلظت‌های شاهد، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب افزایشی معادل ۴۴۲/۷، ۱۲۴/۹ و ۲۹/۳ درصد داشت. به طور کلی، افزایش در میزان پراکسید هیدروژن و مالون‌دآلدهید نشان دهنده تولید مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله پراکسید هیدروژن در گیاه جو است و افزایش در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و همچنین مالون‌دآلدهید در سایر بررسی‌ها نیز گزارش شده

بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیمی

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، باید بافت گیاهی تازه باشد. بدین منظور پس از گذشت ۴۰ روز از تیمار نمونه‌ها، مقدار ۰/۱ گرم از برگ توزین و درون هاون قرار داده شد و ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر ۲۵ میلی‌مولار سدیم فسفات با $\text{pH}=7/8$ به آن اضافه شد. بافت مورد نظر در هاون ساییده شده به طوری که یک محلول به طور کامل هموزن تشکیل شد. این محلول به تیوب اپندورف منتقل شد. عصاره‌گیری و نگهداری بافت‌های هموزن در دمای پایین و روی یخ انجام شد. بافت‌های عصاره‌گیری شده در دور $1000 \times \text{g}$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از فیلتراسیون، محلول شفاف رویی در دمای ۸۰- نگه‌داری شدند و برای سنجش فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئینی استفاده شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، بر اساس تبدیل نیترو بلو تترازلیوم^۱ (NBT) به فورمازان در حضور نور و ظهور رنگ تخمین زده می‌شود. حضور نور در محیط، از انجام واکنش جلوگیری کرده و میزان تشکیل ماده رنگی و ظهور رنگ را کاهش می‌دهد. مخلوط واکنش ۳ میلی‌لیتر، شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ ، ریبوفلاوین ۱/۳ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، NBT ۶۳ میکرومولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. لوله‌های آزمایش در برابر نور لامپ فلورسنت با شدت $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ برای ۱۵ دقیقه نوردهی شدند. جذب محلول‌های نوردهی و نور ندیده با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر مشخص شد. یک واحد فعالیت SOD، معادل مقدار آنزیمی است که ۵۰٪ احیای نوری NBT را جلوگیری می‌کند. میزان فعالیت آنزیم بر اساس $\mu\text{moleH}_2\text{O}_2/\text{g.F.W}/\text{min}$ محاسبه و بیان شد (هس و پاگر، ۱۹۶۸).

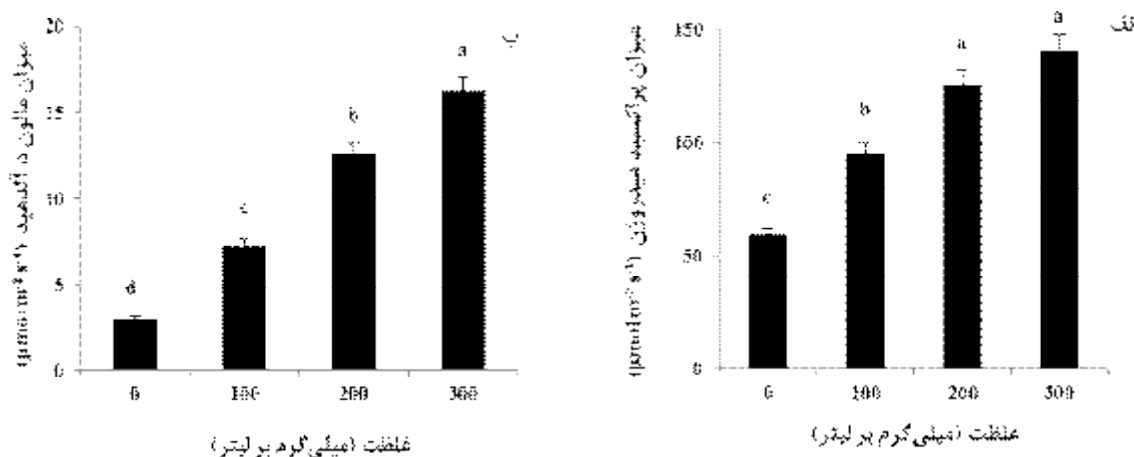
سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با روش کاک‌مک و هورست (۱۹۹۱) انجام شد. پس از ریختن ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر سدیم فسفات در کووت کوارتزی دستگاه طیف‌سنج و اضافه کردن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۱۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش، تجزیه آب اکسیژنه با کاهش در

است (دمیرال و تورکان، ۲۰۰۵؛ نوروزی، ۱۳۹۰ و هانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات پراکسید هیدروژن، مالون‌دآلدئید، آنزیم‌های کاتالاز، محتوای پروتئین برگ و پرولین جو تحت اثر نانوذره نقره

منابع تغییر	درجه آزادی	پراکسید هیدروژن	مالون‌دآلدئید	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	پروتئین	پرولین
غلظت نانوذره نقره	۳	۳۸۹۲/۲۴**	۱۰۲/۵۹**	۶۸۲۴/۲۴**	۶۹۹/۳۸**	۰/۱۴**	۰/۰۰۳
خطا	۸	۷۵/۵۶	۰/۵۸	۲۶۴/۸	۱۰/۰۴	۰/۰۰۰۸۲	۰/۰۰۰۶
Cv		۸/۲۶	۷/۷۶	۹/۹۱	۶/۳۶	۴/۹۶	۱۴/۹

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ را نشان می‌دهد.



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره بر میزان پراکسید هیدروژن (الف) و مالون‌دآلدئید (ب) در برگ گیاه جو

حروف مشابه در هر ستون و برای هر تیمار، عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها را نشان می‌دهد. مقادیر میانگین سه تکرار هستند.

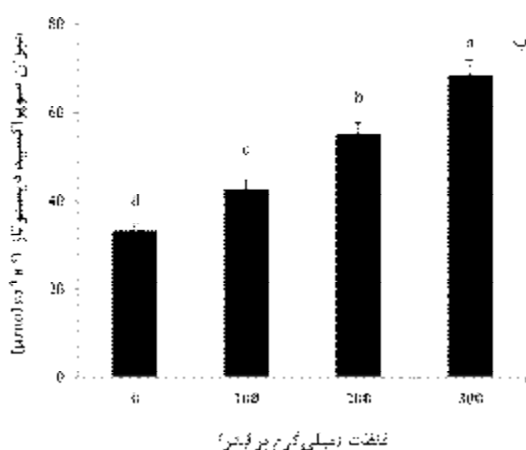
نتایج این پژوهش هماهنگ بر آزمایش‌های هانگ و همکاران (۲۰۰۵) است که بیان کردند ذره TiO_2 سبب افزایش میزان MDA و در نتیجه افزایش نشت غشایی و همچنین افزایش میزان ROS شد. یکی از راه‌های القای پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش مالون‌دآلدئید در برگ‌ها از طریق ترکیبات پیام‌رسانی مانند پراکسید هیدروژن هستند که در اثر تجمع فلزاتی مثل کادمیم در ریشه تولید و سپس به اندام‌های هوایی منتقل و سبب القای پراکسیداسیون لیپیدی در برگ‌ها می‌شوند (کارپینسکی و همکاران، ۱۹۹۹).

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که تجمع پراکسید هیدروژن بسته به غلظت ماده نانویی متفاوت است. به طور کلی، مشخص شد که پراکسید هیدروژن، در برگ گیاهان جو تولید شده بود که این خود سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و بیشتر شدن میزان MDA در غشاهای این گیاه می‌شود. نتایج پژوهش‌های لی و

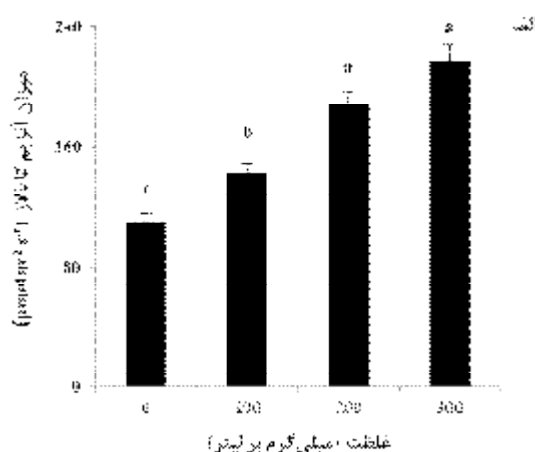
رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند سبب پراکسیداسیون دی‌استریفیکاسیون لیپیدهای غشا شوند. لیپید پراکسیداسیون و تولید مالون‌دآلدئید به عنوان شاخصی برای میزان خسارت تنش‌های اکسیداتیو به کار می‌رود (ژگتاپ و بارگوا، ۱۹۹۵).

افزایش سطح مالون‌دآلدئید با فلزات سنگین نشان می‌دهد که یون‌های فلزی سبب تحریک تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه تنش اکسیداتیو در سلول می‌شوند. همچنین مشخص شده است که فلزات سنگین غیر از تولید رادیکال‌های آزاد، از طریق افزایش فعالیت لیپواکسیژناز نیز سبب ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه افزایش سطح مالون‌دآلدئید می‌شوند (احمد و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج زیادی نیز مبنی بر تجمع مالون‌دآلدئید (MDA) و H_2O_2 در گیاه در شرایط تنش فلزات و سایر تنش‌های محیطی وجود دارد (دمیرال و تورکان، ۲۰۰۵؛ نوروزی و همکاران، ۱۳۹۰ و هانگ و همکاران، ۲۰۰۵).

به طوری که در اندازه‌گیری میزان آنزیم کاتالاز تحت غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با تیمار شاهد و غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره، به ترتیب افزایشی معادل ۹۸، ۵۲/۸ و ۱۵/۶ درصد حاصل شد (شکل ۲- الف) و در مقادیر سوپراکسید دیسموتاز اندازه‌گیری شده تحت غلظت‌های مختلف نانوذره نقره، مشاهده شد که تحت غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با تیمار شاهد و غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب افزایش معنی‌داری معادل ۱۰۶، ۶۰/۴ و ۲۴/۲ درصد به دست آمد (شکل ۲- ب).



همکاران (۲۰۰۹) نیز مشخص کرد که با افزایش غلظت نانوذرات، میزان آن‌ها در بافت‌های گیاهی افزایش می‌یابد، در نتیجه میزان اثرات مخرب آن‌ها نیز شدت می‌یابد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای مختلف نانوذره نقره در سطح ۱٪ معنی‌دار شد، به نحوی که اعمال غلظت‌های مختلف نانوذره نقره سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه جو شد (شکل ۲- الف و ب).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نانو نقره بر میزان آنزیم کاتالاز (CAT) (الف) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (ب) در برگ گیاه جو

حروف مشابه در هر ستون و برای هر تیمار، عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها را نشان می‌دهد. مقادیر میانگین سه تکرار هستند.

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده‌اند و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش می‌تواند به عنوان شاخصی برای افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نظر گرفته شود و سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه با حذف گونه‌های فعال اکسیژن، سبب کاهش خسارت‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (جیاگ و هوانگ، ۲۰۰۱)؛ از طرفی، افزایش مشاهده شده در فعالیت این آنزیم‌ها هماهنگ با نتایج سایر پژوهش‌ها است (هانگ و همکاران، ۲۰۰۵ و لو و همکاران، ۲۰۰۲).

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان پروتئین کل برگ گیاهان جو در اثر کاربرد سطوح مختلف غلظت‌های نانوذره نقره با افزایش غلظت نانوذرات به طور معنی‌داری کاهش یافت به طوری که تحت غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوذره نقره در مقایسه

به عبارت دیگر، گیاه جو برای تجزیه پراکسید هیدروژن و افزایش تحمل گیاه در مقابل رادیکال‌های فعال اکسیژن، غلظت آنزیم کاتالاز را در شرایط تنش افزایش داده است. آنزیم کاتالاز به عنوان یک آنزیم محافظتی در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (لورر، ۲۰۰۳). القای فعالیت آنزیم کاتالاز سبب غلبه بر تنش اکسیداتیو از طریق سم‌زدایی پراکسید هیدروژن ناشی از واکنش SOD می‌شود و به همین دلیل نقشی حفاظتی برای غشاها دارد (ماژودی و همکاران، ۲۰۰۲).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان نقش مهمی در تبدیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به پراکسید هیدروژن بر عهده دارد و به این دلیل میزان فعالیت آنزیم در گیاه جو، افزایش یافت (سامی، ۱۹۹۳). همان‌طور که ذکر شد، در سنجش میزان و فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز، شاید نانوذره نقره سبب

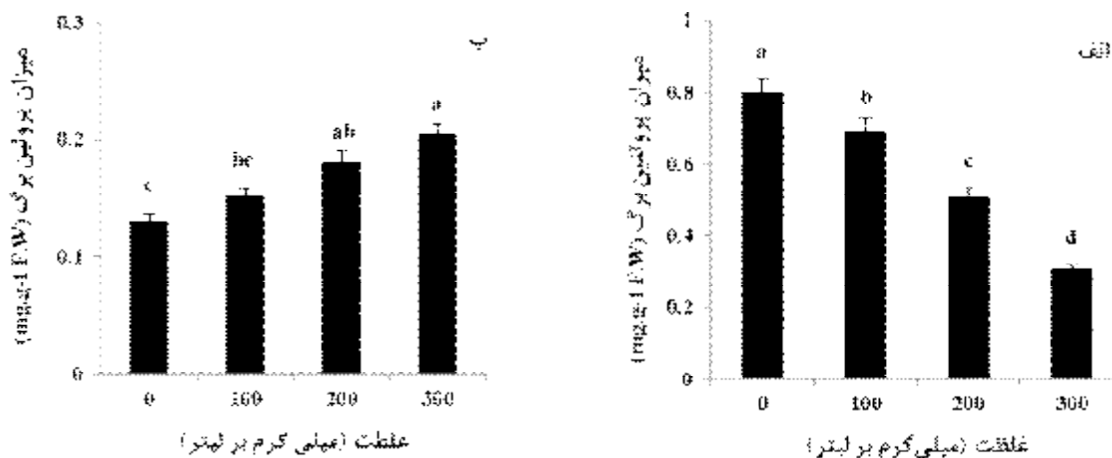
به ترتیب افزایش معنی‌داری معادل ۵۶/۹، ۳۴/۲ و ۱۲/۱ درصد مشاهده شد.

برخی پژوهش‌ها اثبات کردند که پرولین می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کند و با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی، خسارت حاصل از رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد و حفاظت از غشاها را تضمین کند (مهتا و گوار، ۱۹۹۹). لاماس و همکاران (۲۰۰۰) نیز در پژوهش‌های خود چهار راه برای افزایش تجمع پرولین در هنگام تنش پیشنهاد دادند که عبارتند از تحریک سنتز آن از اسید گلوتامیک، کاهش صادرات آن از طریق آوند آبکش، جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش و تخریب و اختلال در فرآیند سنتز پروتئین و شاید افزایش در میزان پرولین حاصل از غلظت‌های بالای نانوذره نقره، به دلیل اختلال در سنتز و فعالیت پروتئین‌های برگ است.

با تیمار شاهد و غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، به ترتیب کاهش معنی‌داری معادل ۶۱/۳، ۵۵/۱ و ۳۹/۲ درصد مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۳-الف).

می‌توان چنین استنباط کرد که رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده، به دلیل میل ترکیبی زیادی که با پروتئین‌ها و لیپیدها دارند، سبب تخریب غشای سلولی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های سلول می‌شوند (پلتزر و همکاران، ۲۰۰۲).

داده‌های حاصل از شکل پرولین (شکل ۳-ب) نیز نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، افزایش معنی‌داری در میزان پرولین برگ گیاه جو حاصل می‌شود به طوری که در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با غلظت‌های تیمار شاهد، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر میزان پروتئین (الف) و پرولین (ب) برگ گیاه جو

حروف مشابه در هر ستون و برای هر تیمار، عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها را نشان می‌دهد. مقادیر میانگین سه تکرار هستند.

طریق فعال‌سازی و تحریک تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل هیدروکسید و سوپراکسید اثرات مخربی بر ماکرومولکول‌هایی مثل لیپیدها، پروتئین و ... داشته و سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و تخریب این ترکیبات و در نهایت اختلال در وضعیت اکسیداسیون و احیاء سلول و یا سایر فرآیندهای متابولیسمی شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش مشاهده شد که نانوذراتی از قبیل نانوذرات نقره همانند سایر تنش‌ها سبب القاء و بروز شرایط اکسیداتیو در گیاه جو می‌شوند. به طور کلی، اثر نانوذرات نقره ممکن است به دلیل آزادسازی یون‌ها و رادیکال‌های آزاد باشد. مشخص شد که نانوذرات نقره از

منابع

- تدین م. ر. فلاح س. ا. فدایی تهرانی ع. ا. و نوروزی س. ۱۳۹۲. اثرات نانوتیوب کربن چند جداره و نانوذرات نقره بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیک گیاه باقلا (*Vicia faba L.*). فرآیند و کارکرد گیاهی. ۲: ۶۱-۷۲.
- زند ب. و لعلی نیا ع. ا. ۱۳۹۰. زراعت غلات. انتشارات دانشگاه پیام نور، چاپ دوم، تهران. ۲۷۷ ص.

۳. قربانی قوجدی ح. و لادن مقدم ع. ر. ۱۳۸۴. مقدمه‌ای بر تنش‌های اکسایشی و کرنش‌های گیاهی. انتشارات دواوین، چاپ اول، تهران. ۱۲۸ ص.
۴. نورمحمدی ق. سیادت ع. ا. و کاشانی ع. ۱۳۸۹. زراعت. انتشارات دانشگاه شهید چمران، چاپ نهم، اهواز. ۴۴۶ ص.
۵. نوروزی. م. ۱۳۹۰. اثر برخی ذرات نانو بر جوانه‌زنی و رشد بعدی دانه‌رست چند گونه گیاهی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد. ۱۶۴ ص.
6. Ahmad P. Nabi G. and Ashraf M. 2010. Cadmium-induced oxidative damage in mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern. And Coss.) plants can be alleviated by salicylic acid. South African Journal of Botany. 77 (1): 36-44.
7. Asada K. 1994. Production and action of active oxygen in photosynthetic tissues. In: Foyer C. H. and Mullineaux P. M. (Eds.), Causes of Photooxidative Stress in Plants and Amelioration of Defence System. CRC Press, Boca Raton. pp. 77-109.
8. Bailly C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research. 14 (2): 93-107.
9. Bandyopadhyay U. Das D. and Banerjee R. K. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. Current Science. 77(5): 658-666.
10. Bates L. Waldren R. and Teare I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil Science. 39(1): 205-207.
11. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Review of Biochemistry. 72(1): 248-254.
12. Brunner T. J. Wick P. Manser P. Spohn P. Grass R. N. Limbach L. K. Bruinink A. and Stark W. J. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environmental Science and Technology. 40 (14): 4374-4381.
13. Buzea C. Pacheco I. I. and Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. American Vacuum Society. 2: 1-11.
14. Cakmak I. and Horst W. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max* L.). Plant Physiology. 83(3): 463-468.
15. Demiral T. and Turkan I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany. 53(3): 247-257.
16. Dhindsa R. S. 1991. Drought stress, Enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Turtula ruralis*. Plant Physiology. 95(2): 648-651.
17. Dixit V. Pandey V. and Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). Journal of Experimental Botany. 52(358): 1101-1109.
18. Heath R. L. and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125(1): 189-198.
19. 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.
20. Jagtap V. and Bhargava S. 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. exposed to high light, low water and high temperature stress. Journal of Plant Physiology. 145(1): 195-197.
21. Jiang Y. and Huang B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Science. 41(2): 436-442.
22. Karpinski S. Reynolds H. Karpinska B. Wingsle G. Creissen G. and Mullineaux P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. Science. 284(5414): 654-657.
23. Llamas A. Ullrich C. I. and Sanz A. 2000. Cadmium effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L.) Roots, Plant and Soil. 219(1-2): 21-28.
24. Laurer J. 2003. What happens within the corn plant when drought occurs? Wisconsin Crop Manager. 22(22): 153-155.
25. Lee C. W. Mahendra S. Zodrow K. Li D. Tsai Y. Braam J. and Alvarez P. J. J. 2009. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. Environmental Toxicology and Chemistry. 29(3): 669-675.
26. 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.
27. Mazhoudi S. Chaoui A. Ghorbal M. H. and Ferjani E. 2002. Response of antioxidative enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill). Plant Science. 127(2): 129-137.

28. McDonald M. B. 1999. Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Science and Technology*. 27(1): 177-237.
29. Mehta S. K. and Gaur J. P. 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Cohlorella vulgaris*. *New Phytologist*. 143(2): 253-259.
30. Monica R. C. and Cremonini R. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*. 62(2): 161-165.
31. Mukherjee S. P. Choudhuri M. A. 1985. Implications of water stress-induced changes in the level of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiology Plant*. 58(2): 166-170.
32. Nel A. Xia T. Madler L. and Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nano level. *Science*. 311(5761): 622-629.
33. Peltzer D. E. Dreyer M. and Polle A. 2002. Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species. *Plant Physiology and Biochemical*. 40(2): 141-150.
34. Sami A. 1993. *Oxidative stress and Antioxidant defenses in biology*. Chapman and Hall. pp: 448.
35. Scandalios J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. 101(1): 7-12.
36. Tan X. M. and Lin C. 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon*. 47(15): 3479-3487.

