

اثر نانو نقره بر میزان کلروفیل، جیبرلیک اسید و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گیاه سیب‌زمینی رقم White Desiree در شرایط کشت در شیشه

علی‌اکبر احسانپور^۱

زینب نجاتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۰۳

تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۲۲

چکیده

بهبود رشد و نمو گیاه سیب‌زمینی در شرایط کشت در شیشه دارای اهمیت زیادی است. اتیلن یکی از هورمون‌های گیاهی است که در شرایط کشت در شیشه تولید و باعث کاهش رشد سیب‌زمینی می‌شود. در این تحقیق اثر نانو نقره بر میزان کلروفیل، جیبرلیک اسید، پروتئین کل و الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE پروتئین‌ها در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر (ppm) در محیط کشت جامد MS روی گیاه سیب‌زمینی رقم وایت دزیره بررسی گردید. بررسی نتایج پس از پنج هفته نشان داد که تیمار نانو نقره تغییر معناداری در میزان کلروفیل *a*، *b* و کل نداشت. اما با افزایش غلظت نانو نقره به ۱/۵ و ۲ ppm، میزان جیبرلیک اسید افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. همچنین با افزایش غلظت نانو نقره، پروتئین کل نیز افزایش یافت و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها نسبت به شاهد تغییراتی در ۳ نوار پروتئینی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، نانو نقره، کلروفیل، جیبرلیک اسید، پروتئین

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از نظر اقتصادی و غذایی دارای اهمیت زیادی می‌باشد. به عنوان چهارمین محصول مهم غذایی انسان بعد از گندم، ذرت و برنج قرار دارد (Ehsanpour and Jones, 2001). این گیاه در نواحی آب و هوایی مختلف از معتدل تا استوایی و از مرطوب تا خشک کشت می‌شود (Bajaj, 1989). بررسی‌ها نشان داده است که از تولید و تجمع اتیلن در طول کشت بافت گیاهی در شرایط کشت در شیشه (Sarkar et al., 2002) اثرات منفی در پاسخ‌های ریخت‌زایی گیاهان در این شرایط دارد (Kumar et al., 2007). قسمت اعظم تولید اتیلن در شرایط در شیشه در نتیجه زخمی شدن گیاه برای ایجاد قطعات جدا کشت و برای انجام واكشت صورت می‌گیرد (Beasley and Eak, 1979). بیوسنتز و تجمع بیش از حد اتیلن در ظروف در بسته کشت بافت گیاهی اغلب اثرات زیان‌بار و ناهنجاری‌های زیستی متفاوتی مانند ایجاد ریشه‌های مویین فرعی (نابجا) بر روی ساقه‌ها، ضعیف شدن ساقه، کاهش سطح برگ، افزایش طول میان‌گره‌ها، کاهش وزن خشک، (Ehsanpour and Jones, 2001) را در کشت‌های کوتاه مدت ۳ الی ۴ هفته‌ای گیاه سیب‌زمینی به دنبال خواهد داشت.

گیرنده‌های اتیلن به نام ethylene receptor ETR1 (یک پروتئین دو پاره (دیمر) در جایگاه اتصال خود دارای یون مس (کوفاکتور مس) هستند که برای اتصال به اتیلن ضروری است. یونهای مس در جایگاه ETR1 با دو باقیمانده آمینواسیدی Cys65 و His69 به صورت کئوردینانسی متصل می‌شوند

(Rodriguez et al., 1999) گیرنده‌های اتیلنی به صورت همو یا هتروداایمرهایی که به وسیله باندهای دی سولفیدی به هم متصل‌اند عمل می‌کنند. CTR1 یک پروتئین است که به خانواده RAF از پروتئین کیناز Ser/Thr تعلق دارد و تنظیم‌کننده پاسخ اتیلنی است، CTR1 در حضور اتیلن غیر فعال است و غیر فعال بودن آن منجر به فعالیت EIN2 که یک تنظیم‌کننده مثبت پاسخ اتیلنی است می‌شود و در نتیجه، ارسال سیگنال درک اتیلن به هسته انجام و با روشن شدن ژن‌های دخیل در پاسخ اتیلن، این پاسخ‌ها آغاز می‌شوند. یون‌های نقره (نیترات نقره و تیوسولفات نقره) از مهارکننده‌های اتیلن هستند. استفاده از یون‌های نقره به عنوان مهارکننده فعالیت اتیلن از دهه ۸۰ میلادی گزارش شده است (Beyer., 1976).

کمپلکس آنیونی تیوسولفات نقره (STS) یکی از مهارکننده‌های فعالیت اتیلن است که یون نقره را در ساختار خود دارد و استفاده از آن در غلظت‌های مناسب در محیط کشت سبب بهبود رشد و نمو گیاه و عدم ظهور اثرات زیان‌بار و ناهنجاری‌های ناشی از تجمع اتیلن می‌گردد. استفاده از STS (تیوسولفات نقره) به دلیل سمیت کمتر نسبت به دیگر فرم‌های کاربردی یون نقره مانند $AgNO_3$ در مهار فعالیت اتیلن و تحرک آسان‌تر و بیشتر آن به دلیل تغییر فرم کاتیونی نقره (Ag^+) به فرم آنیونی آن در $[Ag(SO_2O_3)_2]^{2-}$ توسعه یافته (Sarkar et al., 2002) است.

در راستای کنترل اتیلن یک جایگزین استفاده از نانو نقره است. نانو ذرات نقره به طور معمول از قطر 1-50 nm استفاده می‌شوند. نانو ذرات نقره بسته به اندازه می‌توانند به

است. Li و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که دوام گل‌های رز رقم Movie star که در محلول‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو نقره به مدت یک ساعت تیمار شده بودند به دلیل کاهش شکاف روزنه‌ای و کاهش در انتقال آب افزایش یافت. Zhang و همکاران (۲۰۰۵) برای بررسی اثر نانو نقره بر تقسیم سلولی و شاخص‌های میتوزی از گیاه Allium استفاده کردند. آنها دریافتند که در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ ppm نانو نقره به صورت معناداری شاخص میتوزی کاهش و انحراف ساختاری در کروموزوم افزایش یافت. برخی پژوهشگران با آزمایش بر روی گیاه Cucurbita pepo به این نتیجه رسیدند که نانو ذرات نقره بیوماس و تعرق را ۸۴٪-۶۶ کاهش داده است. آنها دریافتند که غلظت یون‌های نقره در حالت نانو ۱۰-۴/۴ برابر بیشتر از محلول ذرات توده‌ای نقره است (Musante and White, 2010). تا آنجا که اطلاعات منتشر شده بررسی شده هیچگونه گزارشی در زمینه اثر نانو نقره بر کشت در شیشه سیب‌زمینی منتشر نشده است. با توجه به اهمیت سیب‌زمینی، در این مطالعه سعی شده است برای اولین بار اثر نانو نقره بر میزان کلروفیل، جیبرلیک اسید و الگوی پروتئینی گیاه سیب‌زمینی رقم White Desiree در شرایط کشت در شیشه بررسی گردد. اطلاعات این پژوهش می‌تواند زمینه تحقیقات گسترده‌تر آینده را در زمینه بکارگیری نانو نقره به عنوان یک ماده با اثر احتمالی در ممانعت از فعالیت اتیلن فراهم آورد.

دیواره سلولی حتی غشاء پلاسمائی نفوذ کنند (Manios et al., 2003). مکانیسم عمل ذرات نانو نقره در میکروارگانیسم‌ها هنوز به روشنی مشخص نشده ولی پیشنهاد شده است که ذرات نانو نقره می‌تواند به آهستگی یون‌های نقره (Ag^+) را رها کنند و Ag^+ می‌تواند ساختار سلولی میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرد (Lubick, 2008). از این رو نانو نقره جهت کنترل باکتری‌ها بکار رفته است. محققان نشان دادند که Ag^+ از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) بر فسفولیپیدها اثر گذاشته و باعث پراکسیداسیون آنها شده و غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها را تخریب می‌کند. از این گذشته Ag^+ ممکن است با سولفور در گروه‌های SH- غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها جانشین گردد و آنها را تخریب کند (Dibrov et al., 2002). همچنین اثرات تخریبی Ag^+ به تولید نقره فعال شامل ترکیبات آلی مرتبط است، این ترکیبات می‌توانند میکروارگانیسم‌ها را جذب کنند و ساختار آنها را تخریب کنند. در تکنولوژی نانو اولین اثر مربوط به اندازه ذرات و افزایش سطح است. افزایش نسبت سطح به حجم نانو ذرات باعث می‌شود تا واکنش‌پذیری نانو ذرات به شدت افزایش یابد. علاوه بر این افزایش سطح ذرات فشار سطحی را تغییر داده و منجر به تغییر فاصله بین ذرات یا فاصله بین اتم‌های ذرات می‌شود (Senjen, 2007) به همین دلیل سمیت نقره در حالت نانو بیشتر از حالت نقره به صورت یون است (Musante and White, 2010). بررسی‌های بسیار معدودی در زمینه اثر نانو نقره بر تعدادی از گیاهان صورت گرفته

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

ابتدا از گیاهچه‌های تکثیر یافته (واکشت سوم و چهارم) موجود در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان قطعات ساقه گیاه سیب‌زمینی رقم White Desiree به همراه یک جوانه جانبی در محیط کشت MS (Murashig and Skoog) (1962)، جامد (آگار 1% W/V) همراه با قند سوکروز (5% W/V) و pH=5.8 کشت و تکثیر داده شدند. سپس با همین روش به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm نانو نقره انتقال یافتند (نانو نقره به صورت محلول از شرکت Antimicrobial products NANOCID Made in I.R. IRAN با مشخصات Production Registration No: 118/24974 استفاده شد).

شیشه‌های گیاهچه‌های مزبور در اتاق کشت و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۵ هفته از زمان تیماردهی، گیاهچه‌های سیب‌زمینی برای بررسی و انجام آنالیزهای لازم استفاده شدند.

سنجش کلروفیل

استخراج کلروفیل: مقدار ۰/۱ گرم از برگ گیاه سیب‌زمینی رقم وایت دزیره، تیمار شده با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره توزین گردید و سپس با استفاده از ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ در تاریکی بر روی یخ درون هاون چینی هموژن گردید تا در نهایت محلولی همگن و یکدست به دست آمد. سپس عصاره حاصل صاف گردید

و حجم محلول به کمک استون ۸۰٪ به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب محلول‌های به دست آمده به کمک اسپکتروفتومتر مدل UV Vis spectrophotometer- Shimadzu در طول موج‌های ۶۶۳ nm و ۶۴۵ nm خوانده شد. این عمل برای هر یک از غلظت‌های نانو نقره سه بار تکرار گردید و سپس میزان کلروفیل بر اساس روش (Arnon, 1949) بر حسب mg/gFW محاسبه گردید.

سنجش جیبرلیک اسید

۰/۵ گرم از بخش هوایی گیاهان شاهد و تحت تیمار نانو نقره در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول مطلق سائیده شد. عصاره حاصل توسط میکروسانتریفوژ (مدل ependorf) در rpm ۱۳۰۰۰ سانتی‌فیوژ شد، سپس محلول رو شناور در لوله آزمایش ریخته شد و به آن یک قطره HCl (M 0.1) اضافه شد. محلول حاصل به دکانتور منتقل شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات افزوده شد. این محلول به مدت ۲ دقیقه به خوبی تکان داده شد، بعد از آن ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با pH 7.4 افزوده شد و دوباره ۳ دقیقه محلول به خوبی تکان داده شد. در این مرحله دو فاز تشکیل شد که فاز رنگی دور ریخته شد و فاز آبی حاوی جیبرلیک اسید استفاده شد. از فاز آبی ۳ میلی‌لیتر برداشته و به آن ۳ میلی‌لیتر HCl 3.75 M و ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم pH 7.4 اضافه شد. محلول حاصل به خوبی ورتکس شد و سپس جذب محلول در طول موج ۲۵۴ نانومتر با کمک اسپکتروفتومتر UV-160A خوانده شد (Berrios et al., 2003). در منابع ۲۰۰۴ است برای اندازه‌گیری کمی جیبرلیک اسید منحنی استاندارد در محدوده

دست آمده روی ژل استفاده شد. از آنجا که لازم بود تا مقدار معین و یکسان از نظر غلظت از همه نمونه‌ها در چاهک‌های ژل ریخته شود در ابتدا سنجش کمی پروتئین‌های استخراج شده طبق روش (Bradford, 1976) انجام شد، و پس از یکسان‌سازی غلظت از هر عصاره پروتئینی حاوی ۱۲-۵ میکروگرم پروتئین در تکرارهای مختلفی از هر ژل الکتروفورز، مقدار ۶ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد. پس از آن مخلوط حاصل از عصاره پروتئینی و بافر نمونه (۳۰ میکرولیتر) در چاهک‌ها ریخته شد و تانک الکتروفورز با بافر تانک (pH: 8.3) پر گردید و سپس تانک الکتروفورز به منبع تغذیه متصل شد و تحت میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی آمپر به مدت ۲-۳ ساعت، الکتروفورز انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز ژل با نیترات نقره بر اساس روش توضیح داده شده توسط (Rostami and Ehsanpour, 2009) رنگ‌آمیزی و باندهای پروتئینی ظاهر شد. پس از این مراحل بررسی تغییرات الگوی پروتئینی و شدت نسبی باندهای پروتئینی روی ژل‌های به دست آمده توسط نرم افزار ImageJ به صورت کمی انجام گرفت.

نتایج

تأثیر نانو نقره بر میزان کلروفیل a, b و کل تیمار گیاهان سیب‌زمینی با نانو نقره در شرایط کشت در شیشه نشان داد که نانو نقره اثر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a, b و کل نشان نداد (شکل ۱).

غلظت صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر با استفاده از GA3 رسم گردید.

استخراج، سنجش و الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE)

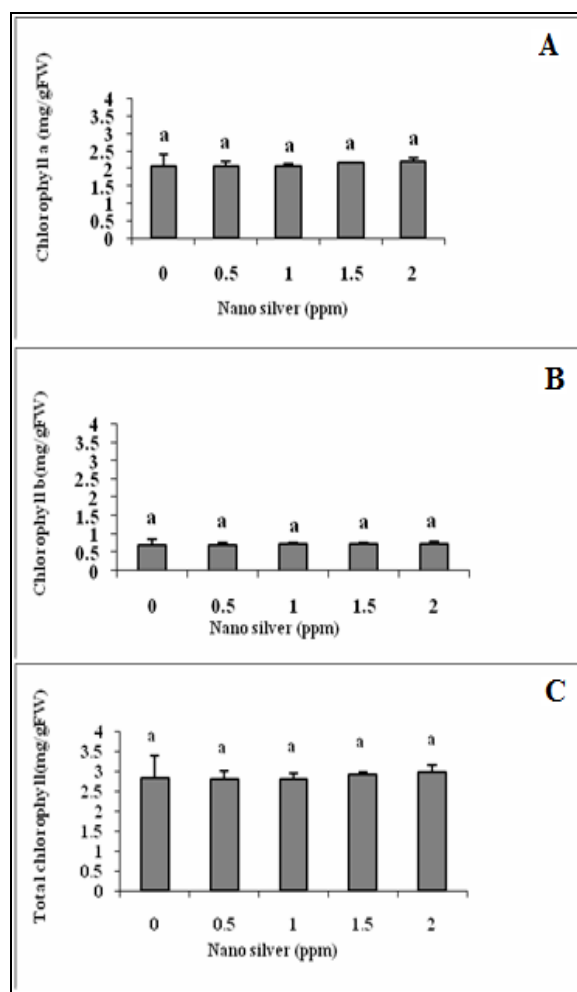
برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول از روش (Bradford 1976) استفاده شد. به این منظور ابتدا ۰/۱ گرم بافت تازه از اندام هوایی گیاه وزن و با بافر استخراج بافر فسفات سدیم با pH 7.4 در هاون سائیده شد سپس در دمای ۴ درجه با 13000 rpm سانتریفیوژ و عصاره تهیه شد. به منظور اندازه‌گیری پروتئین در یک لوله آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره مورد نظر منتقل شده و به آن ۵ میلی لیتر معرف برادفورد اضافه شد. مجموعه فوق به مدت ۲ دقیقه ورتکس شده و پس از گذشت ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-160 Shimadzu) جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

تهیه ژل SDS - PAGE

ژل جداکننده (Seperating gel) با غلظت ۱۲٪ و ژل متراکم‌کننده (Staking gel) با غلظت ۵٪ از محلول ۳۰ درصد پلی اکریلامید تهیه شد (Hames, 1990). الکتروفورز پروتئین با تهیه مینی ژل با ابعاد 10 cm x 10 cm و ضخامت 0.8 mm توسط تانک الکتروفورز عمودی پروتئین مدل Mini VERTI GEL2 APELEX و منبع تغذیه مدل PS 304 Mini PacII وصل شد.

آماده‌سازی عصاره‌های پروتئینی جهت الکتروفورز

برای بارگذاری از عصاره‌های پروتئینی به



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره بر میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B) و کلروفیل کل (C). داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm std و حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بر اساس آزمون دانکن است.

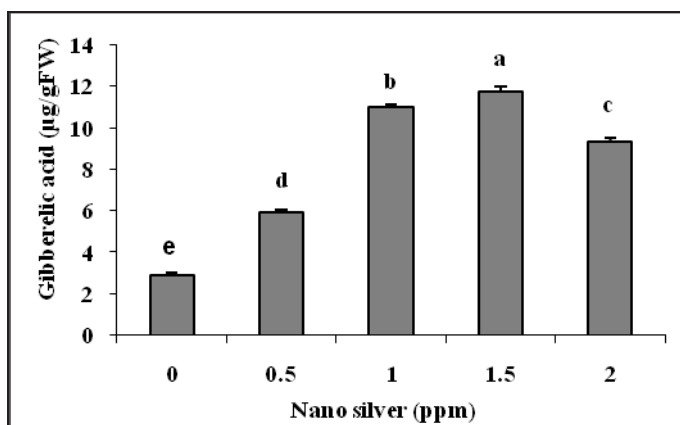
اثر نانو نقره بر پروتئین محلول اندام هوایی

نتایج به دست آمده از بررسی اثر نانو نقره بر میزان پروتئین کل محلول نشان داد که با افزایش غلظت نانو نقره، پروتئین کل نیز افزایش یافت. این افزایش در غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ ppm نانو نقره افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد و غلظت ۰/۵ ppm نانو نقره نشان دادند. میزان پروتئین در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ ppm نانو نقره اختلاف معنی‌دار نشان نداد در حالیکه پروتئین در

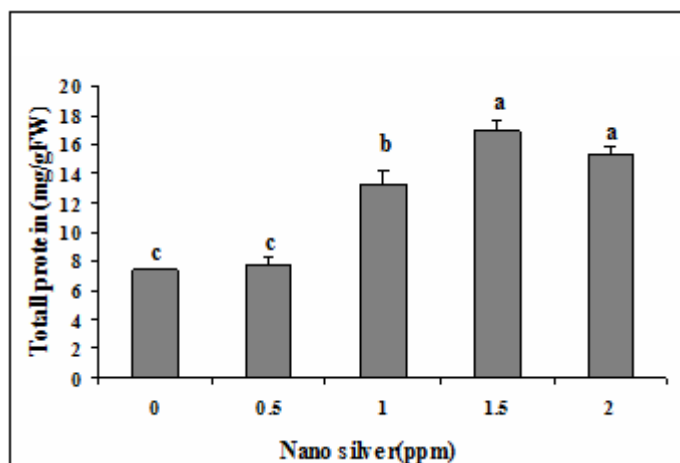
تاثیر نانو نقره بر مقدار جیبرلیک اسید اندام هوایی

با افزایش غلظت نانو نقره، میزان جیبرلیک اسید نیز به ترتیب افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. حداکثر مقدار جیبرلیک اسید در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ ppm نانو نقره مشاهده گردید. اگرچه میزان این هورمون در غلظت‌های ۰/۵ و ۲ ppm نانو نقره نسبت به غلظت‌های ۱ و ۱/۵ ppm نانو نقره کاهش نشان داد ولی نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲).

این غلظت‌ها نسبت به غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ افزایش معنی‌داری را نشان داد. به هر حال غلظت ۱ ppm نانو نقره حد واسط معنی‌داری نسبت به غلظت‌های صفر و ۰/۵ و ۱/۵ ppm نقره از یک طرف و غلظت‌های صفر و ۰/۵ ppm نانو نقره از طرف دیگر نشان داد (شکل ۳).



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره بر میزان جیبرلیک اسید. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm std و حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بر اساس آزمون توکی است.



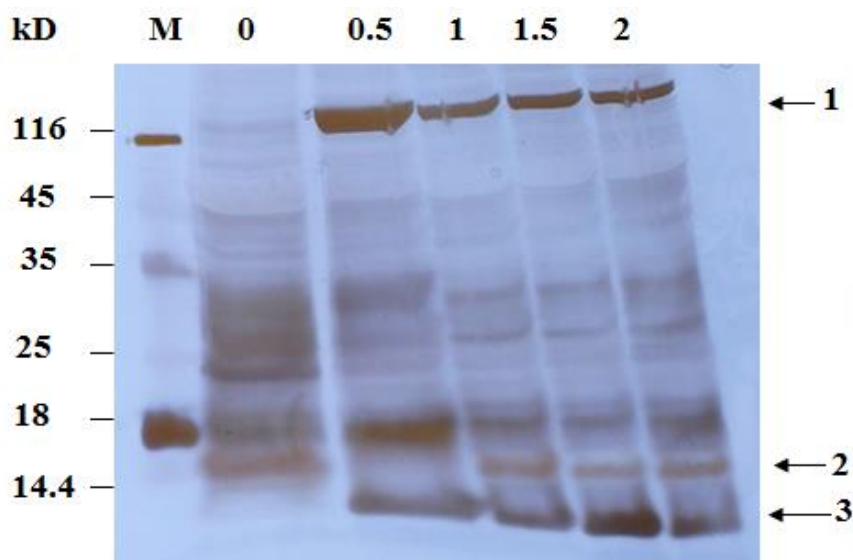
شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره بر میزان جیبرلیک اسید برگ. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm std است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بر اساس آزمون توکی است.

باند شماره ۱ با اندازه تقریبی ۱۲۰ kD و باند شماره ۳ با اندازه تقریبی ۲۰ kD در گیاهان تیمار شده با نانو نقره مشاهده می‌شود در حالیکه در گیاهان شاهد (بدون تیمار نانو نقره) کاملاً محو شده است. البته میزان بیان پروتئین‌های این باندها با یکدیگر قدری متفاوت است و برای مثال باند شماره

تاثیر نانو نقره بر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های اندام هوایی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های اندام هوایی گاه تحت تیمار نانو نقره به روش SDS-PAGE در شکل ۴ نشان داده شده است. در الگوی پروتئین‌ها ۳ باند نسبت به سایر باندها واضح‌تر تغییر نشان دادند.

حالی که در شاهد و سایر غلظت‌های نانو نقره این باند حضور دارد.

۱ در ۵ ppm نانو نقره بسیار بیشتر از سایر غلظت‌ها است. باند شماره ۲ تنها در غلظت ۵ ppm نانو نقره کاهش بیان نشان می‌دهد در



شکل ۴. تاثیر غلظت‌های مختلف نانو نقره بر الگوی الکتروفورزی پروتئینی اندام هوایی.

نظریه، نظریه دیگری وجود دارد که می‌گوید کاهش عملکرد اتیلن به واسطه اکسید شدن اتیلن به وسیله یک سیستم آنزیمی یون فلزی صورت می‌گیرد. این اکسیدکننده می‌تواند یک آنتاگونیست ضعیف مانند CO_2 و یا یک آنتاگونیست قوی مانند ترکیبات نقره باشد (Abeles., 1973).

در مطالعه حاضر مشاهده شد که گیاهچه‌های رشد کرده در محیط‌های دارای غلظت ۵ ppm نانو نقره، از نظر برخی شاخص‌های ظاهری و به طور کیفی، به مراتب رشد بهتر و مطلوب‌تری را نسبت به محیط MS (کنترل) داشته اما غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره باعث کاهش برخی از شاخص‌های رشد نظیر طول ساقه و فاصله میان گره‌های گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره شد (داده‌ها ارائه نشده است). این نتایج مشابه

بحث

مطالعات نشان داده است که یون نقره فعالیت اتیلن را از طریق رقابت با کوفاکتور مسی بر سر جانشینی در جایگاه اتصال به گیرنده این هورمون، مهار می‌سازد (Kumar et al., 2009). یون‌های نقره باعث غیر فعال‌سازی اتیلن در گیاهان می‌شوند (Zhao et al., 2002). گیاهان موتان غیر حساس به اتیلن (Hall et al., 1999) و یون‌های نقره قادر به ایجاد اختلال در باند شدن اتیلن به جایگاه اتصال گیرنده‌های اتیلن هستند (Rodriguez et al., 1999). گیرنده اتیلن، ETR1، شامل یک جایگاه اتصال به اتیلن است که با کمک یک یون مس این اتصال صورت می‌گیرد. جایگزینی کوفاکتور مسی با یون نقره باعث قفل شدن این گیرنده برای اتصال به اتیلن می‌شود (Zhao et al., 2002). در مقابل این

نقره بر میزان کلروفیل کل، به صورت غیر مستقیم از تاثیر اتیلن بر کلروفیل و فرآیند فتوسنتز سخن می‌گوید. به طور کلی، در تحقیق حاضر با افزایش غلظت نانو نقره در محیط کشت گیاه سیبزمینی رقم وایت دزیره، میزان کلروفیل a, b و کل اندازه‌گیری شده نسبت به حالت کنترل (محیط کشت MS بدون نانو نقره)، تغییر معنی‌داری را نشان نداد. نتایج حاضر مشابه نتایج Manios و همکارانش (۲۰۰۳) بر گیاه *Typha latifolia* می‌باشد که اثر فلزات سنگینی چون کادمیوم، مس، نیکل، سرب و روی را بر غلظت کلروفیل بررسی کردند. آنها دریافتند که غلظت‌های پایین فلزات سنگین اگرچه باعث افزایش غلظت این عناصر در ریشه می‌شوند، اما اثر معنی‌داری بر مقدار کلروفیل a و b نمی‌گذارد. سمیت فلزات سنگین برای متابولیسم گیاهی از طریق آزمایشات اثبات شده است (Markert, 1993). جانشینی یون Mg^{2+} در ملکول کلروفیل با فلزات سمی مشخصی مانند مس، روی، کادمیوم یا جیوه در طی استرس‌های فلزات سنگین در گیاهان عالی نشان داده شده است که باعث تجزیه کلروفیل می‌شود (Kupper et al., 1996). Babu و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که اضافه کردن فلزات سنگین کروم (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و نقره (۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به سلول‌های سالم سیانوباکتریوم و اسپیرولینا پلاننسیس باعث دگرگونی در فعالیت زنجیره انتقال الکترون و فتوسیستم II می‌شود. نتایج نشان داد که یون‌های فلزات سنگین وابسته به غلظت بر روی انتقال الکترون در جایگاه‌های چندگانه اثر می‌گذارد و انتقال انرژی را

نتایج است که در مطالعات قبلی با استفاده از SDS (sodium dodecyl sulfate) گزارش شده است (Ehsanpour and Jones, 2001). کاهش طول ساقه و فاصله میان گره‌ها در اثر عملکرد نانو نقره به عنوان مهارکننده فعالیت اتیلن می‌تواند بیان‌گر این مطلب باشد که فرآیند طویل‌شدگی سلول‌ها در حضور نانو نقره کاهش یافته است. در مورد مکانیسم عمل نقره در کاهش فاصله میان گره‌ها اطلاعات دقیقی در دست نیست. ولی دو نظر قابل بیان است:

۱) ممکن است نانو نقره در مسیر تولید و یا فعالیت جیبرلیک اسید اختلال ایجاد نموده باشد و در نتیجه از طویل شدن ساقه ممانعت نموده باشد؛

۲) مقایسه اثر نانو نقره با اثر برخی از فلزات سنگین نظیر کادمیوم بر رشد گیاه نشان می‌دهد که فلزات سنگینی چون کادمیوم (Toppi and Gabbrielli, 1999) سرب و روی باعث کاهش رشد طولی سلول‌های ساقه گیاه شده است (Aidid and Okamoto, 1992). البته بایستی در نظر داشت مطالعات حاضر در شرایط کشت در شیشه و تجمع اتیلن انجام شده در حالیکه در مطالعات سایر محققان روی برخی از عناصر سنگین غیر از نقره و شرایط کشت گیاه در طبیعت و کاملاً متفاوت با آزمایشات ما انجام شده است.

بررسی اثر نانو نقره بر کلروفیل گیاه

کلروفیل نقشی یگانه و اثر گذار در زندگی گیاهان عالی دارد (Eckharti et al., 2004). از آنجا که محتویات کلروفیلی گیاه، یکی از پارامترهای شاخص عملکرد هورمون اتیلن است (Jona et al., 1997) بررسی اثرات نانو

اسید در اثر تیمار نانو نقره چیست اساساً مشخص نشده است ولی می‌توان دلایل ذیل را پیشنهاد کرد:

- ۱) می‌تواند به دلیل عدم انتقال این هورمون از برگ به عنوان منبع سنتز به ساقه باشد که خود می‌تواند با غیر فعال شدن ناقلین (transporter) جیبرلیک اسید همراه باشد؛
- ۲) می‌تواند به دلیل عدم مصرف و یا تجزیه جیبرلیک اسید در ساقه باشد؛
- ۳) می‌تواند به دلیل عدم تبدیل فرم پیوسته جیبرلیک اسید به فرم آزاد و فعال باشد. به هر حال اظهار نظر قطعی در این زمینه در هر کدام از این فرضیه‌ها نیاز به مطالعه دقیق علمی دارد.

تغییر پروتئین محلول کل در حضور نانو نقره

در برخی گزارشات علمی مشخص شده که حضور فلزات سنگین منجر به القاء تغییراتی در پروتئین‌ها در گیاه می‌گردد. پروتئین‌ها محصولات نهایی مسیره‌های اطلاعاتی سلول هستند که در پاسخ به نیازهای سلول در شرایط مختلف ساخته شده و به موقعیت‌های سلولی مناسب منتقل و در صورت نیاز تخریب می‌گردد و یا میزان بیان آنها تغییر می‌یابد. بنابراین نقره به صورت نانو نقره می‌تواند نقش یک فلز سنگین را ایفا نماید. در مطالعه حاضر تغییرات القاء شده در میزان پروتئین‌های محلول کل حاصل از جداگشت‌های بخش هوایی گیاهان سیب‌زمینی رقم وایت دزیره رشد یافته در محیط‌های دارای غلظت‌های به کار رفته نانو نقره و کنترل در غلظت‌های مختلف تغییر معناداری مشاهده شد و به همین صورت

تغییر می‌دهند. فلزات سنگین سمی هستند و گیاهان به راحتی آنها را تجمع می‌دهند. این فلزات سنگین از راه‌های گوناگون در انتقال الکترون فتوسنتزی دخالت می‌کنند (Kupper et al., 1996, Mohanty and Mohanty, 1998, Babu, 2010) نشان دادند که مقدار مشخصی از یون‌های نقره (غلظت‌های بیش از $10\mu\text{M}$) یک بازدارنده قوی در انتقال انرژی و انتقال الکترون در سیانوباکتر می‌باشد. به نظر می‌رسد نانو نقره در موارد فوق تغییری اعمال ننموده است.

ممکن است میزان نقره موجود در غلظت‌های نانو نقره مورد استفاده در این مطالعه، غلظت‌های چندان آسیب رسان به گونه ای که به طور جدی مانع از رشد گیاه گردند، نبوده و یا اینکه گیاه با فعال کردن سیستم‌های مختلف دفاعی خود توانسته خود را با شرایط محیطی سازگار سازد. احتمالاً مکانیسم‌های انتقال سیگنال از ریشه به اندام هوایی گیاه از طریق ترکیبات شیمیایی در غلظت‌های مختلف نقره می‌تواند تغییرات لازم را به دستگاه فتوسنتزی و رنگ دانه‌های آن اعمال کند.

بررسی اثر نانو نقره بر میزان اسید جیبرلیک گیاه

در مطالعات قبلی استفاده از نیترات نقره و یا تیوسولفات نقره موجب کاهش طول ساقه سیب‌زمینی شده است (Ehsanpour and Jones, 2001). از طرف دیگر در مطالعه حاضر تیمار نانو نقره در تمام غلظت‌ها باعث افزایش میزان جیبرلیک اسید در اندام هوایی گیاه شد. این سؤال که علت افزایش جیبرلیک

الگوی متفاوتی در نحوه بیان در سطح ژل الکتروفورز مشاهده شد. شرکت اتیلن در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی به طور قطع از طریق تاثیر پیام هورمونی اتیلن در هسته و روشن یا خاموش شدن ژن‌های فعال شرکت‌کننده در آن فرایندها و در نتیجه بروز پاسخ‌های اتیلنی در گیاه است. نقره به عنوان یک بازدارنده فعالیت اتیلن، با مهار درک سیگنال اتیلن توسط گیرنده‌ها بر روند انجام این فرایندها و نحوه بیان ژن‌های درگیر در سطح رونویسی و ترجمه اثر می‌گذارد. می‌توان این نکته را در نظر داشت نانو نقره اگرچه فاقد بار الکتریکی است ولی احتمالاً وقتی به سلول وارد شود با دو مکانیزم احتمالی موجب توقف فعالیت اتیلن و در نهایت تغییر الگوی پروتئینی می‌گردد: الف) نانو نقره ممکن است با همان ساختمان طبیعی یعنی نانو نقره به سلول وارد شده به صورت یک پوشش روی گیرنده‌های اتیلن قرار گرفته آن‌ها را غیر فعال ساخته است؛ ب) احتمال دارد در سلول شرایط اکسایشی لازم جهت تبدیل نانو نقره به یون نقره فراهم بوده و در نتیجه نانو نقره به یون نقره تبدیل شده و از طریق مکانیزم شناخته شده یعنی جایگزینی نقره با یون مس در گیرنده اتیلن فعالیت این گیرنده را مختل ساخته است. به هر حال هر یک از این مسیرها می‌تواند منجر به تغییر در فرایندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی شده و الگوی پروتئین‌ها را تغییر دهد. نظیر چنین تغییراتی در الگوی پروتئین‌ها بعد از تیمار نقره در آفتابگردان گزارش شده است (Krizkova و همکاران، 2008). پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها در

مقابل فلزات سنگین از خود دفاع می‌کنند. هر دوی این ارگانسیم‌ها راه‌های متعددی برای سمیت‌زدایی در مقابل فلزات سنگین به کار می‌برند. یکی از عمومی‌ترین راه‌ها، سنتز پپتیدها و پروتئین‌های غنی از سیستئین می‌باشد که این پپتیدهای سنتزی گیاهی فیتوکلواتین‌ها نام دارند (Clemens, 2006). بنابراین ممکن است بخشی از پروتئین‌های سنتز شده در اثر تیمار نانو نقره به واسطه سنتز فیتوکلواتین‌ها باشد. علاوه بر این، نتایج ما مشابه گزارشی است که قبلاً از بررسی اثر پروتئین‌ها بر روی گیاه سیب‌زمینی رقم وایت دزیره به دست آمده است (Rostami and Ehsanpour, 2009). با این تفاوت که این محققان در باند پروتئینی ۱۰۰ کیلو دالتون کاهش بیان پروتئین و در باندهای ۱۷، ۴۰ و ۵۰ کیلو دالتونی افزایش بیان پروتئینی را شاهد بودند. شاید این تفاوت به نوع ترکیب یعنی نانو نقره به جای تیوسولفات نقره و مکانیزم عمل ماده به کار رفته مربوط شود. به هر حال این مطالعه یک بررسی اولیه در تغییر الگوی عمومی پروتئین‌هاست و بدیهی است شناسائی نوع پروتئین‌هایی که در اثر تیمار نانو نقره کاهش و یا افزایش یافته است نیاز به استفاده از روش‌های کاملتری نظیر الکتروفورز دو بعدی دارد که در آینده بایستی انجام شود.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه نانو نقره با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت بافت سیب‌زمینی باعث بهبود رشد گیاه شد. نانو نقره روی کلروفیل اثر معنی‌داری نداشت در حالیکه روی میزان جیبرلیک اسید داخلی و پروتئین

گیاه اثر افزایشی نشان داد. علاوه بر این الگوی پروتئینی گیاه نیز تغییر یافت و منجر به افزایش یک باند نسبتاً قوی در محدوده ۱۱۶ کیلو دالتونی شد.

قدردانی

نویسندگان مقاله از تحصیلات تکمیلی و قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان به واسطه حمایت از این پژوهش تشکر می‌نمایند.

References

- Abeles, F. B. (1973). Ethylene in plant biology, Academic Press, New York.
- Aidid, S. B. and Okamoto, H. (1992). Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*” Environmental and Experimental Botany 32: 439-448.
- Aidid, S. B. and Okamoto, H. (1992). Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. Environmental and Experimental Botany. 32: 439-448.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts and polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24: 1-15.
- Babu, N. G., Sarma, P. A., Attitalla, I. H. and Murthy, S. D. S. (2010). Effect of selected heavy metal ions, on the photosynthetic electron transport and energy transfer in the thylakoid membrane of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. Academic Journal of Plant Science. 3: 46-49.
- Bajaj, Y. P. S. (1989). Plant protoplast and genetic engineering 1. Biotechnology in Agriculture and Forestry. 8:124-146.
- Beasley, C. A. and Eaks, I. L. (1979). Ethylene from alcohol lamps and natural gas burners: effects on cotton ovules cultured in vitro. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 15: 263-269.
- Berrios, J., Illanes, A. and Aroca, G. (2004). Spectrophotometric method for determining gibberellic acid in fermentation broths. Biotechnology Letters. 26: 67-70.
- Beyer, E. M. (1976). Effect of Silver Ion, Carbon Dioxide, and Oxygen on Ethylene Action and Metabolism. Plant Physiology. 63: 169-173.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plant. Biochimistry. 88: 1707-1719.
- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K. and Häse, C. C. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46(8): 2668-2670.
- Eckharti, U., Grimm, B. and Hortensteiner, S. (2004). Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. Plant Molecular Biology. 56: 1-14.
- Ehsanpour, A. A. and Jones, M. G. K. (2001). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using silver thiosulfate (STS). Journal of Sciences Islamic Republic of Iran. 12(2): 103-110.
- Hall, A. E., Chen, Q. G., Findell, J. L., Schaller, G. E. and Bleeker, A. B. (1999). The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. Plant Physiology. 121: 291-299.
- Hames, B. D. and Rickwood, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins. 2nd Ed., Oxford University Press. New York. pp 350.
- Jona, R., Cattro, A. and Travaglio, D. (1997). Chlorophyll content as index of ethylene inside culture vessels. Acta Horticulturae. 447: 229-230.
- Krizkova, S., Ryant, P., Krystofova, O., Adem, V., Galiova, M., Beklova, M., Banula, P., Kaiser, J., Novotny, K., Novotny, J., Liska, M., Malina, R., Zehnalek, J., Hubalek, J., Havel, L. and Kizek, R. (2008). Multi- instrumental analysis of tissues of sunflower plants treated with silver(I) ions – plants as bioindicators of environmental

- pollution. *Sensors*. 8: 445-463.
- Kumar, V., Parvatam, G. and Ravishankar, G. A. (2009). AgNo₃ – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12:1-15.
 - Küpper, H., Küpper, F. and Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*. 47: 256-266.
 - Lü, P., Cao, J., He, S., Liu, J., Li, H., Cheng, G., Ding, Y. and Joyce, D. C. (2010). Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose cv. Movie star flowers. *Postharvest Biology and Technology*. 57: 192-202.
 - Lubick, N. (2008). Nanosilver toxicity: ions, nanoparticless or both? *Environmental Science and Technology*. 42.
 - Manios, T., Stentiford, E. I. and Millner, P. A. (2003). The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecological Engineering*. 20: 65-74.
 - Markert, B. ed., (1993). *Plants as Biomonitors: Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. VCH publisher. 644pp. UK.
 - Mohanty, N. and P. Mohanty, (1988). Cation effects on primary processes of photosynthesis: *Advances in Frontier Areas of Plant Biochemistry* Singh, R. and, Printice Sawhney, S.K. (eds.), Hall of India, pp.1-18. New Delhi.
 - Musante, C. and White, J. C. (2010). Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. *Environmental Toxicology*. Vol?1-8.
 - Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
 - Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*. 12: 996-998.
 - Rostami, M. and Ehsanpour, A. A. (2009). Application of silver thiosolphate(STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Sulanamun tubersum* L.) under in vitro culture. *Malaysia Application of Biology*. 38: 49-54.
 - Sarkar, D., Sud, K. C., Chakrabarti, S. K. and Naik, P. S. (2002). Growing of potato microplants in the presence of alginate-silver thiosulfate capsules reduces ethylene-induced culture abnormalities during minimal growth conservation in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 68: 79-89.
 - Senjen, R. (2007). Nanosilver- a threat to soil, water and human health? *Friends of the Earth*. Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1995). Ethylene binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science*. 270: 1809-1811.
 - Toppi, L. S. D. and gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41: 105-130.
 - Zhang, F. Q. She, W. J. and Fu, Y. F. (2005). Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a prefatort siren. *Geneva*. 40: 504-509.
 - Zhao, X. C., Qu, X., Mathews, D. E. and Schaller, G. E. (2002). Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 130: 1983-1991.