

# اثر نانو ذرات نقره بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان و الگوی پروتئین محلول کل در گیاهچه‌های گوجه در

## شرایط *in vitro*

رویا رضوی زاده<sup>۱\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۵

## چکیده

در این مطالعه تاثیر نانو ذرات نقره در اندازه‌های بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر و در غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام بر روی تغییرات شاخص‌های فیزیوبیولوژیکی مانند آنتوسیانین کل، الگوی پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گیاهچه‌های گوجه (*Solanum Lycopersicon*) در محیط کشت درون شیشه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان آنتوسیانین در پاسخ به حضور نانو ذرات نقره کاهش معنی‌داری را تا غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام به دنبال داشته است. پروتئین محلول کل گیاه با افزایش غلظت نانو ذره در اندام هوایی افزایش و در ریشه با افزایش غلظت در ۲۰ و ۴۰ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد کاهش نشان داد. همچنین شدت بیان شش باند پروتئینی تحت تیمار با نانو ذرات نقره تغییر نمود. با افزایش غلظت نانو ذرات در محیط کشت افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ریشه‌ها و اندام هوایی مشاهده گردید.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین محلول کل، نانو فناوری، نانو ذرات نقره

## مقدمه

نانو فناوری، دانش و فناوری ساخت مواد ریز و درشت با دقت اتمی برای تولید ساختارهای بزرگ‌تر، با نظم و خصوصیات مولکولی جدید برای کنترل ساختار و تولید وسایل در سطح اتمی، مولکولی و درشت مولکولی و استفاده موثر از آنها است. در واقع یکی از زمینه‌های مهم و رو به گسترش فعالیت‌های تحقیقاتی در علوم ماده مدرن، زمینه نانو فناوری و کاربردهای جدید نانو ذرات و نانو مواد است. این ذرات به دلیل اندازه کوچک و ویژگی‌های منحصر به فرد، قابلیت استفاده در علوم مختلف، مخصوصاً علوم زیستی را دارند. یکی از اولین اثرات کاهش اندازه ذرات به زیر ۱۰۰ نانومتر و تبدیل آنها به نانو ذرات، افزایش سطح به حجم است که موجب فرارگیری اتم‌های بیشتری در سطح نسبت به حجم و متعاقباً تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی ذرات می‌گردد. قابل توجه‌ترین ویژگی ذرات در ابعاد نانو توانایی عبور از سد‌هایی است که برای ذرات مشابه با ابعاد بزرگتر غیرممکن است. این ویژگی واکنش‌پذیری نانو ذرات به ویژه نانو ذرات فلزی را به شدت افزایش می‌دهد (Baker et al., 2013). بنابراین رهاسازی هر

۱-دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

\* (نویسنده مسئول: razavi.roya@gmail.com)

نوع نانو ذره‌ای در محیط زیست ممکن است دارای تاثیرات مضر بالقوه‌ای باشد که همین امر مطالعه آنها را در سطوح مختلف زیستی دارای اهمیت می‌نماید. از جمله نانو ذراتی که استفاده و بالطبع رهاسازی آن در محیط زیست، به دلیل خواص منحصر به فردی مانند آفت زدایی و ضدعفونی کنندگی ( Rabavel *et al.*, 1998; Wijnhoven *et al.*, 2009; Quadros & Marr, 2010; Faunce & Watal, 2010)، روز به روز در حال افزایش می‌باشد، نانو ذرات نقره است. نانو ذرات نقره را تقریباً می‌توان جزء گسترده‌ترین نانو ذراتی دانست که به دلیل ماهیت ضد میکروبی و ضدعفونی‌کنندگی‌شان از مدت‌ها پیش مورد استفاده انسان بوده‌اند و هم اکنون نیز با پیشرفت نانو فناوری استفاده از آنها در صنایع مختلف از ساخت خودرو، لاستیک، رنگ، صنایع هوافضا، ساختمان‌سازی، شیشه‌سازی، الکترونیک، صنایع دریایی گرفته تا ساخت وسایل زندگی و انواع مواد و پودرهای شوینده مورد استفاده در منازل و استفاده در لوازم و تجهیزات پزشکی و غیره شدت یافته است.

مشخص شده است که نقره در حالت یونی و در غلظت‌های کنترل شده خواص ضد میکروبی و ضد قارچی داشته و اثرات منفی بر انسان ندارد (Basra *et al.*, 1997). استفاده از ذرات نانو نقره به عنوان عامل ضد میکروبی به صورت تجاری و عمومی درآمده است (Geho *et al.*, 2006). نانو کریستال‌های نقره کاربرد خارق‌العاده‌ای در حیطة تشخیص حساسیت بیوملکولی، آنتی- میکروبی و درمانی، کاتالیز و میکرو الکترونیک دارند. نقره (Ag) یک عنصر فلزی نسبتاً کمیاب و از زمره فلزات سنگین است که همراه با فلزات بسیار سمی چون کادمیوم، کروم، مس و جیوه طبقه‌بندی می‌گردد (Ratte, 1999) و به صورت طبیعی در پوسته زمین وجود دارد و از طریق منابع مختلف صنعتی و آزمایشگاهی نیز در محیط آزاد می‌گردد (Schuzendubel & Polle, 2002). نقره عاملی در تغییر نفوذپذیری غشا سلولی نسبت به یون‌های پتاسیم است. از سوی دیگر بر روی عملکرد پمپ‌های  $K^+$ -ATP و میتوکندری تاثیر می‌گذارد و تمایل زیادی به اتصال با یون‌های فلزی دارد. این ذرات به پروتئین‌های دارای گروه تیول (-SH) متصل گشته و می‌توانند باعث غیر فعال شدن آنها و نیز تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) شود (Chen *et al.*, 2008; Panyala *et al.*, 2008). میزان سمیت نقره در حالت‌های مختلف یونی و غیر یونی همچنان در پرده‌ای از ابهام وجود دارد و با توجه به غلظت یون نقره، رفتار چرخه سلولی و میزان تولید ROSها متفاوت خواهد بود اما به نظر می‌رسد کاربرد بیش از حد نانوذرات می‌تواند تهدیدی برای محیط زیست و جنبه‌های مختلف حیات محسوب گردد. در مورد عنصر نقره نتایج قطعی و کاملی وجود ندارد، اما بسیاری بر این باورند که نانوذرات علاوه بر اینکه سمی هستند با آزادسازی یون‌های نقره اثرات سمی  $Ag^+$  را نیز از خود بروز می‌دهند (Chen *et al.*, 2008; Panyala *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2012). از سوی دیگر برخی مطالعات نشان‌دهنده تاثیر مثبت نانوذرات نقره بر رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهان می‌باشند (Salama, 2012; Hatami & Ghorbanpour, 2013). بنابراین مطالعه تاثیر شکل‌های مختلف نقره و نانونقره و بررسی شاخص‌های مختلف فیزیولوژیکی در موجودات زنده اعم از گیاهان می‌تواند گام مهمی در پیشبرد اطلاعات ما از ابعاد نانومتری ذرات و عواقب رهاسازی آنها در محیط زیست و زندگی

انسان داشته باشد. به همین منظور در این مطالعه گیاه گوجه (*Solanum lycopersicum*)، به عنوان یک گیاه مدل و مهم از نظر اقتصادی و باارزش غذایی و دارویی، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانونقره در شرایط این ویترو قرار گرفت و تغییرات در سطح بیان پروتئین‌ها و توان آنتی‌اکسیدانتی آن بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی و شرایط کشت** محلول کلونیدی نانو ذرات نقره پوشش‌دار شده با PVP (پلی وینیل پیرولیدین) با گستره‌ی اندازه‌ی بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر از شرکت پاسارگارد تهران خریداری شد و به منظور آنالیز اندازه و قطر هیدرودینامیکی توسط دستگاه (DLS) dynamic light scattering مورد بررسی قرار گرفت. بذره‌های خشک گیاه گوجه *S. lycopersicum* رقم اصفهانی خریداری شده از شرکت پاکان بذر اصفهان، پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه و آب ژاول ۲۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴ الی ۵ مرتبه در زیر هود لامینار و تحت جریان هوای استریل شستشو شد و در محیط کشت MS (Murashig & Skoog, 1962) حاوی ۱ درصد آگار، ۳ درصد ساکاروز با غلظت‌های ۰، ۰.۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانو نقره (محلول‌های نانونقره مستقیم به محیط کشت اضافه شدند و بعد اتوکلاو شدند) کشت داده شدند. شیشه‌های کشت حاوی بذر در اتاق رشد با شرایط کنترل شده دمایی و در فتوپریود ۸/۱۶ ساعت نور/تاریکی در دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از جوانه زنی و رشد گیاهچه‌ها در محیط‌های حاوی تیمارهای مختلف نانو ذرات نقره به مدت چهار هفته، برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و الگوی پروتئینی در گیاهچه‌های حاصل بررسی گردید.

### سنجش میزان آنتوسیانین کل استخراج آنتوسیانین‌ها براساس روش واگنر (Wagner, 1979) انجام شد. ابتدا ۰/۰۵

گرم برگ گیاه با ترازو توزین و سپس با ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۱ درصد اسیدی (با نسبت حجمی ۱/۹۹ به ترتیب از اتانول/اسید کلریدریک) کاملاً هموژنایز گردید. عصاره حاصل به لوله آزمایش در پیچ دار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفوژ گردید و ۳ میلی‌لیتر از محلول رویی برای خواندن شدت جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (UV-Visible مدل JENWAY 6305) استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

### استخراج و سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ۰/۱ گرم از اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های گوجه ۴ هفته پس از

کشت در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره، با ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیمی با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (pH:7.8) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۱ درصد پودر PVP بر روی یخ در هاون چینی هموژنایز گردید، پس از عمل هموژنایز، عصاره‌های حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و محلول رویی حاصل در میکروتیوب‌های جدید و استریل جمع‌آوری گردید. محلول‌های رویی به دست آمده به عنوان عصاره‌های آنزیمی جهت

اندازه‌گیری فعالیت ویژه‌ی (بر حسب Unit/mg protein) کاتالاز (CAT) با ضریب خاموشی  $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، آسکورات پراکسیداز (APX) با ضریب خاموشی  $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) استفاده شدند. به منظور حفظ فعالیت آنزیمی، تمامی مراحل استخراج بر روی یخ و اندازه‌گیری فعالیت آن‌ها سریعاً پس از آماده ساختن عصاره‌های آنزیمی صورت پذیرفت. فعالیت کاتالاز در ۱ میلی‌لیتر بافر واکنش به صورت بافر فسفات سدیمی با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (pH:7) حاوی ۱۰ میلی‌مولار  $\text{H}_2\text{O}_2$  و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بر اساس روش ابی (Aebi, 1984) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. پس از اضافه کردن  $\text{H}_2\text{O}_2$  در محلول واکنش سریعاً کاهش جذب ناشی از تجزیه  $\text{H}_2\text{O}_2$  در اثر فعالیت کاتالاز موجود در عصاره آنزیمی، در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در مدت ۶۰ ثانیه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آسکورات پراکسیداز بر اساس روش ناکانو و آسادا (Nakano & Asada, 1981) در ۱ میلی‌لیتر بافر واکنش به صورت بافر فسفات سدیمی با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (pH:7) حاوی آسکوربیک اسید (۰/۵ میلی‌مولار)، EDTA (۰/۱ میلی‌مولار)،  $\text{H}_2\text{O}_2$  (۱/۲۵ میلی‌مولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. کاهش جذب آسکورات در اثر فعالیت APX با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه اندازه‌گیری گردید. سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش ژیانوتولیتیس و ریس (Giannotolitis & Ries, 1997) انجام شد. مخلوط واکنش، شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH:7.5)، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH: 10.2)، ال-متیونین ۱۲ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار، نیترو بلو تترازولیوم کلرید ۷۵ میکرومولار و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض یک سیستم نوری شامل سه لامپ فلورسنت ۳۰ وات و در فاصله ۳۰ سانتی متری قرار گرفتند و پس از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. همچنین از یک لوله‌ی آزمایش حاوی مخلوط واکنش بجز عصاره آنزیمی به عنوان بلانک استفاده گردید. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم می‌گردد و فعالیت ویژه‌ی آن بر حسب Unit/mg protein بیان شد.

#### استخراج پروتئین و ژل الکتروفورز ۰/۱ گرم از بافت تازه ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های چهار هفته‌ای گوجه برای

آزمایش پروتئین استفاده شد. استخراج پروتئین براساس روش امینی و همکاران (Amini *et al.*, 2007) اصلاح شده توسط رستمی و احسانپور (Rostami & Ehsanpour, 2009) با استفاده از بافر استخراج (۵۰ میلی متری تریس-HCl، 1 میلی‌مولار DTT، 2 میلی‌مولار EDTA، 2 میلی‌مولار مرکاپتواتانول، pH: 7.5) انجام شد.

سنجش میزان پروتئین محلول کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر (mg/g FW) بر اساس روش تغییر یافته برادفورد (Bradford, 1976)، با استفاده از پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد، انجام (Olson & Markwell, 2007) و در نهایت آنالیز بیان نسبی پروتئین‌ها در عصاره‌های حاصل از اندام هوایی با غلظت  $2/5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  به کمک ژل الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از ژل جداکننده (Separating) ۱۲ درصد و ژل متمرکزکننده (Stacking) 5 درصد مورد بررسی قرار

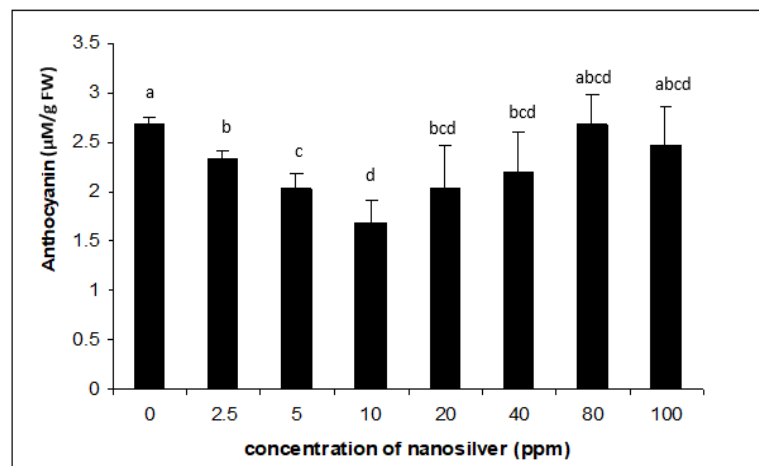
گرفت (Laemmeli, 1970). الکتروفورز به وسیله تانک الکتروفورز ساخت شرکت PEQLAB مدل ۱۶۱۴-۴۵ و با استفاده از مارکر پروتئینی Preotein ladder PLUS PS11 در ۱۳۰ ولت انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترا نقره (Salehi & McCarthy, 2002)، تراکم نسبی باندهای پروتئینی در اندام هوایی توسط برنامه‌ی ImageJ بررسی شد.

**آنالیزهای آماری** تمام آزمایشات بر اساس یک طرح آماری کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار برای هر آنالیز صورت گرفت. داده‌های حاصل با نرم افزار Sigmastat و تست دانکن آنالیز و نمودارهای مربوط توسط نرم افزار Excel رسم گردید. اختلاف معنی داری تیمارها در سطح  $P \leq 0.05$  محاسبه گردید.

## نتایج

**اندازه گیری سایز نانو ذرات** محلول کلوییدی نانو ذرات نقره پوشش‌دار شده با PVP خریداری شد و به منظور آنالیز سایز و قطر هیدرودینامیکی توسط دستگاه (DLS) dynamic light scattering مورد بررسی قرار گرفت. توزیع اندازه در این محلول کلوییدی نانو ذرات پوشش‌دار بین ۵۳/۹۴ و ۲۸۸/۵ نانومتر بود.

**اندازه‌گیری آنتوسیانین کل** نتایج بررسی میزان آنتوسیانین کل نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره از میزان آنتوسیانین کل به طور معنی‌داری به ویژه در سطح ۱۰ پی‌پی‌ام کاسته شد. با افزایش غلظت نانو ذرات نقره افزایش مجدد این ترکیب مشاهده شد ولی همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است این تغییرات در بیشتر مقایسات معنی‌دار نبوده است. میزان آنتوسیانین در تیمارهای ۸۰، ۱۰۰ پی‌پی‌ام و شاهد تغییر معنی‌داری نسبت به یکدیگر نشان ندادند.

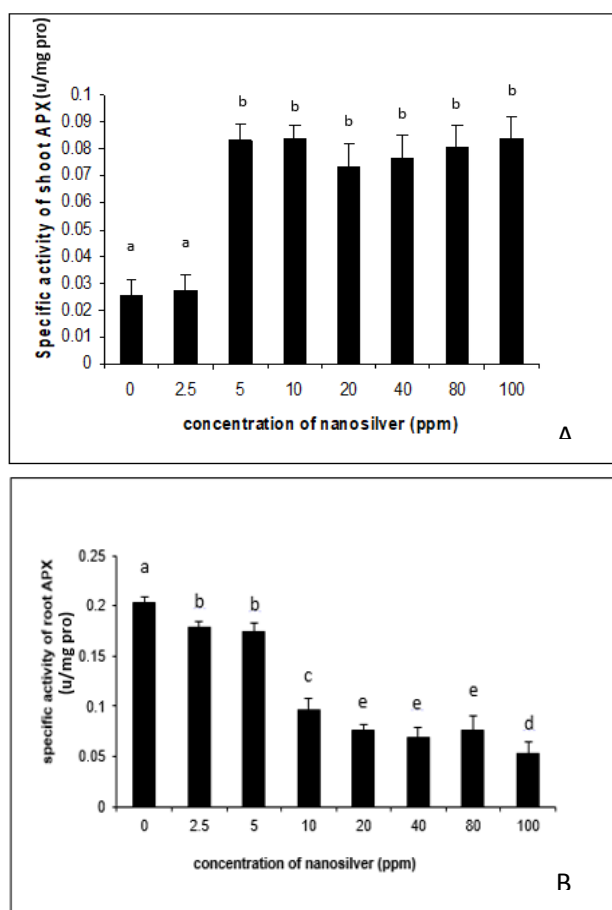


شکل ۱: تأثیر نانو ذرات بر میزان آنتوسیانین کل در گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

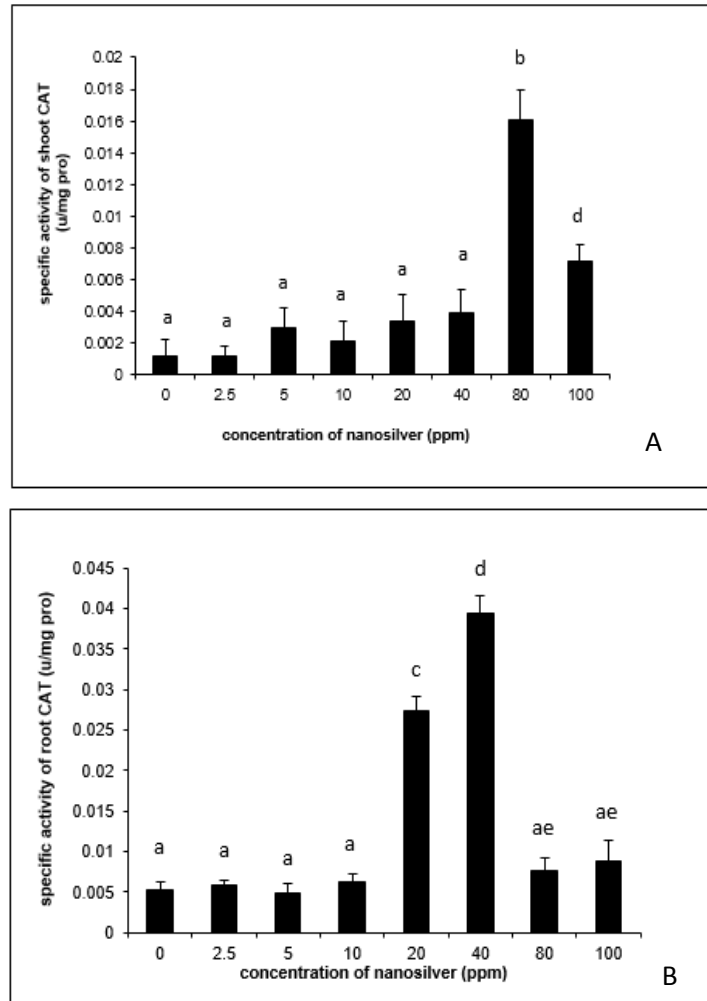
**نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان** در این مطالعه فعالیت ویژه آنزیم‌های SOD، CAT و APX به

منظور بررسی ظرفیت و تغییرات آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های گوجه در پاسخ به غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره اندازه‌گیری

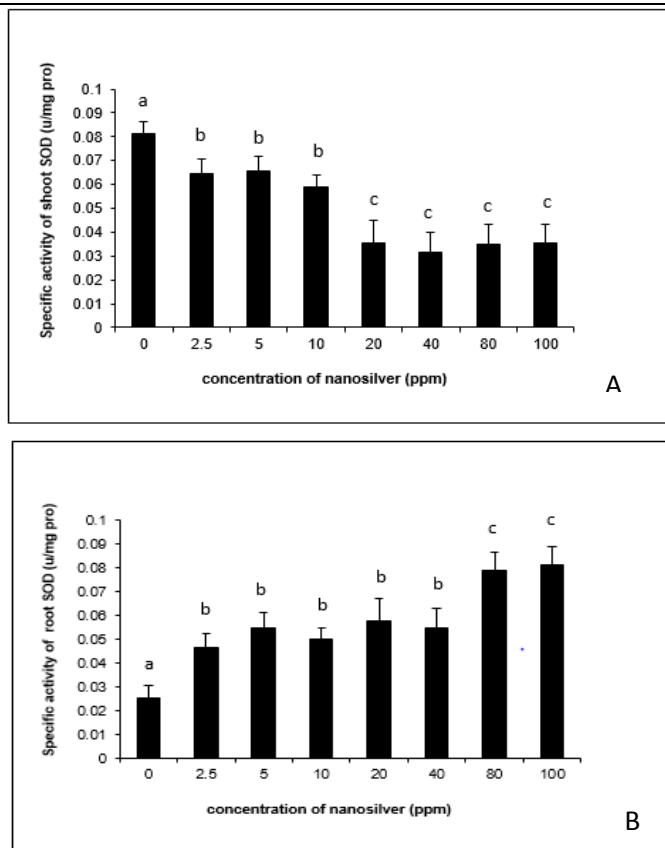
شد. نتایج نشان داد که فعالیت APX در اندام هوایی گیاهان تحت تیمار به مراتب بیشتر از گیاهان شاهد بود (شکل 2A) در حالی که در ریشه فعالیت این آنزیم تحت تیمار با نانو نقره دچار کاهش معنی داری گردید (شکل 2B). تغییرات القا شده در فعالیت CAT هم در اندام هوایی و هم در ریشه‌ها در اثر تنش نانو نقره دارای الگوی تقریباً مشابهی بود و با افزایش غلظت نانوذرات افزایش فعالیت CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها مشاهده شد. به‌طوریکه ماکزیمم فعالیت CAT در اندام هوایی در غلظت ۸۰ پی‌پی‌ام و در ریشه در غلظت ۴۰ پی‌پی‌ام مشاهده گردید (شکل 3A و 3B). فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی با افزایش غلظت نانو نقره تا ۱۰ پی‌پی‌ام تغییر معنی داری با شاهد نشان نداد و از غلظت ۲۰ پی‌پی‌ام با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت SOD کاهش معنی دار با شاهد پیدا کرد (شکل 4A). در ریشه‌ها با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنزیم SOD افزایش یافت و در غلظت ۸۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانو نقره بیشترین سطح فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها مشاهده شد (شکل 4B).



شکل ۲: تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



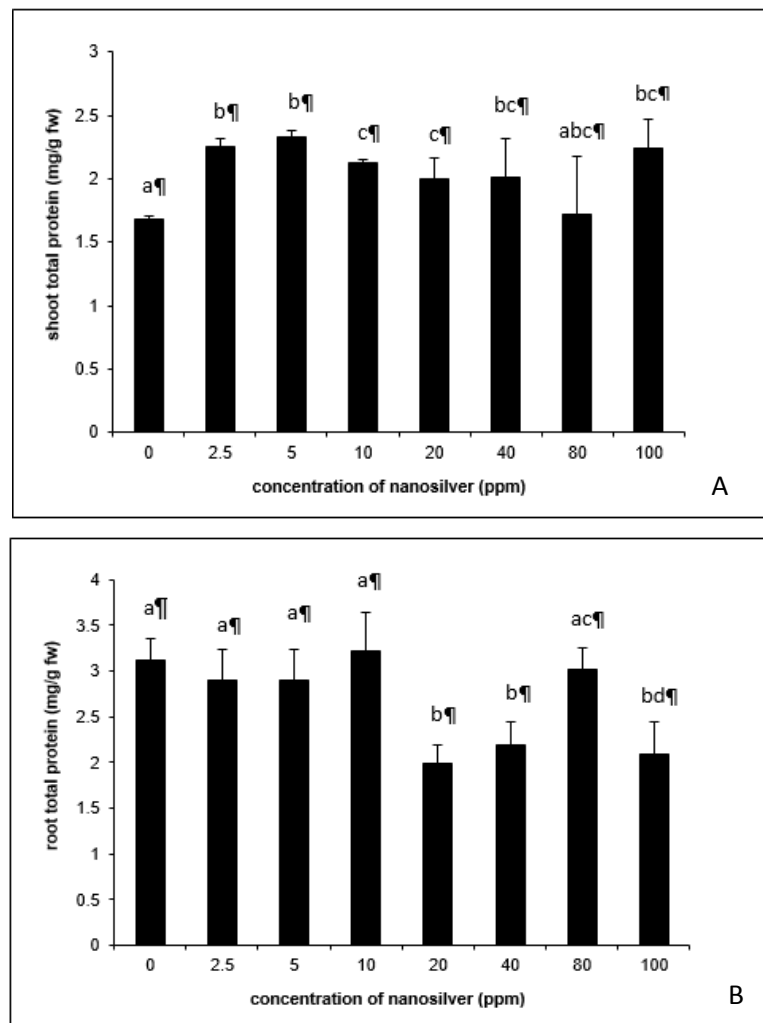
شکل ۳: تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت آنزیم‌های CAT در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانونقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



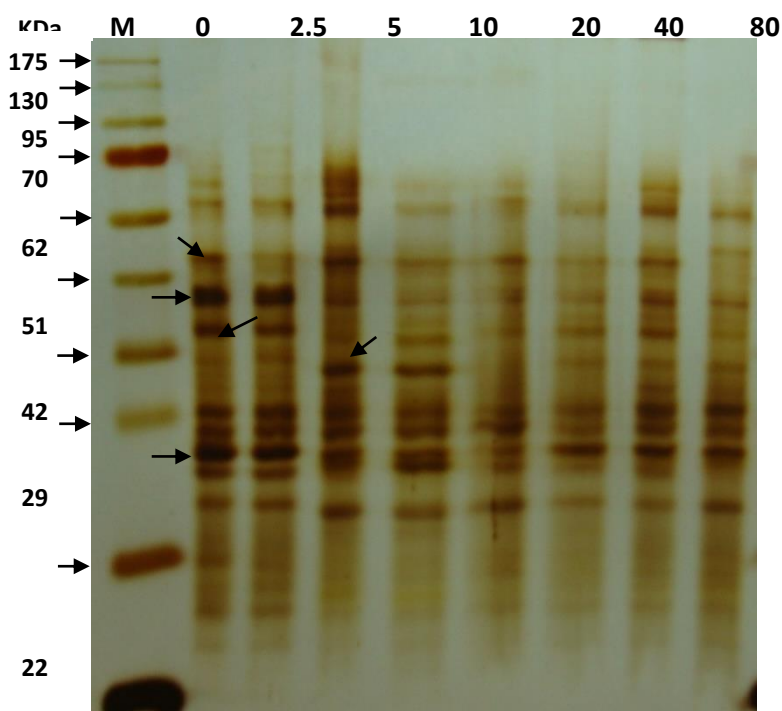
شکل ۴: تأثیر نانو ذرات نقره بر فعالیت آنزیم‌های SOD در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانونقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل و الکتروفورز مطالعه پروتئین محلول کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر (FW mg/g) بیانگر افزایش در میزان پروتئین محلول کل اندام هوایی با افزایش غلظت نانو ذرات بود (شکل ۵A)، درحالی‌که در ریشه‌ها میزان پروتئین محلول کل تا غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام نانونقره در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و با افزایش غلظت در ۲۰ و ۴۰ پی‌پی‌ام پروتئین محلول کل ریشه نسبت به شاهد کاهش نشان داد (شکل ۵B). بررسی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها و شدت نسبی باندهای پروتئینی اندام هوایی در روی ژل به صورت کیفی نشان داد که شدت بیان شش باند پروتئینی تحت تیمار با نانو ذرات نقره تغییر نمودند. شدت بیان باندهای پروتئینی با برنامه‌ی ImageJ بررسی شد. نتایج نشان داد که وزن تقریبی ۴۴، ۴۷ و ۲۷ کیلو دالتونی در سطوح بالاتر از ۲/۵ پی‌پی‌ام کاهش داشت، در حالیکه باند ۴۰ کیلو دالتونی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ پی‌پی‌ام نانو نقره و باند ضعیف ۶۸ کیلو دالتونی در غلظت ۵ پی‌پی‌ام نانو نقره القا بیان نشان دادند. همچنین باندی با وزن مولکولی حدوداً ۵۵ کیلو دالتون تغییراتی را در سطوح مختلف نانونقره نشان داد به‌گونه‌ای که بیشترین بیان آن به ترتیب در ۵ پی‌پی‌ام نانو نقره و گیاهان شاهد مشاهده شد و در سایر غلظت‌ها میزان بیان کمتر بود (شکل ۶).

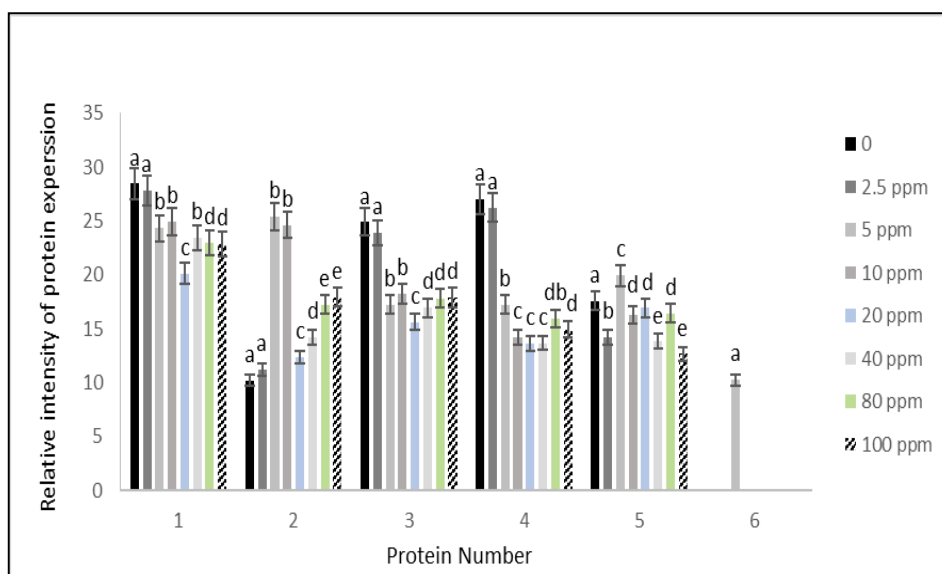




شکل ۵: تأثیر غلظت‌های نانو ذرات نقره بر میزان پروتئین محلول کل در اندام هوایی (A) و ریشه (B) گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره. مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۶: الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های اندام هوایی گیاهچه‌های گوجه در غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ بر حسب ppm). M: پروتئین مارکر با باندهای پروتئینی با وزن مولکولی مشخص.



شکل ۷: تغییرات شدت نسبی بیان شش باند پروتئینی در اندام هوایی گیاهچه‌های گوجه رشد یافته در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف نانونقره (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ بر حسب ppm). مقادیر میانگین سه تکرار و حروف نامتشابه بیانگر اختلاف معنی دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نانو ذرات نقره، یکی از پرکاربردترین نانو ذرات، بر روی برخی شاخص های فیزیولوژیکی مانند آنتوسیانین کل، الگوی پروتئینی و توان آنتی اکسیدانتی گیاهچه گوجه در شرایط کشت درون شیشه انجام شد. آنتوسیانین‌ها به عنوان یک گروه از فلاونوئیدهای محلول در آب در یک نقطه پایانی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در سیتوپلاسم ساخته شده و به شکل فعال و جداگانه به داخل واکوئل یاخته‌ها با پمپ گلوکاتیون وارد می شوند (Mars *et al.*, 1995). کاهش آنتوسیانین در غلظت‌های ذکر شده می‌تواند به دلیل قرار گرفتن پیش‌ماده آنتوسیانین در مسیر دیگری از سنتز و یا کاهش میزان تنش اکسیداتیو توسط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت با شد. کاهش آنتوسیانین در *Gerbera flowers* با کاربرد ۵ میلی‌گرم در لیتر نانونقره به مدت ۲۴ ساعت گزارش شده است (Danaee *et al.*, 2013). از سوی دیگر همانطور که اشاره شد در برخی از غلظت‌های نانو نقره به خصوص غلظت‌های بالاتر افزایش در میزان آنتوسیانین مشاهده شد که البته در مقایسه با گیاهان شاهد معنی‌دار نبود. مطابق با این نتایج در تحقیق دیگری کاربرد ۰/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر نانونقره (با ابعاد ۱۰ نانومتر) روی گیاه آراییدوپسیس تالیانا در محیط کشت MS پس از یک هفته ۲/۰۵ و پس از دو هفته ۲/۲۹ برابر نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد (Qian *et al.*, 2013). به گفته محققین این پژوهش، افزایش ROS در اثر تنش نانونقره باعث افزایش آنتوسیانین شده است. بنابراین در تحقیق حاضر نیز احتمال رخ دادن این پدیده با افزایش غلظت تیمارها ممکن است. آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز هموپروتئین‌هایی هستند که مسئولیت حذف و خنثی‌سازی ROS و برقراری تعادل میان تولید و میزان تخریب آنها را در سلول برعهده دارند. تنش‌های غیر زیستی مختلف در ایجاد تنش اکسیداتیو نقش دارند که منجر به تغییر در فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان می‌شود (Hamdia & Shaddad, 2010). نتایج این مطالعه مشخص ساخت که سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان CAT و APX و SOD به صورت مختلف تحت تأثیر نانو ذرات نقره دچار تغییرات گردید. فعالیت APX و CAT گیاهان تنش نانو نقره به مراتب بیشتر از گیاهان شاهد بود. فعالیت آنزیم SOD در اندام هوایی با افزایش غلظت نانوذرات کاهش معنی‌دار با شاهد پیدا کرد. در ریشه‌ها با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنزیم SOD افزایش یافت. تغییر در سطح مولکول‌های آنتی‌اکسیدان و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، که به عنوان سیگنال‌هایی برای تحمل یا سازش به شرایط تنشی مطرح هستند، با تحمل به تنش اکسیداتیو نیز مرتبطاند (Lee *et al.*, 2001; Sudhakar *et al.*, 2001). تفاوت در میزان آنتی‌اکسیدان می‌تواند به عنوان سیگنالی برای تنظیم مکانیسم‌های جاروب‌کنندگی ROS عمل نمایند (Mittler, 2002). مکانیسم سمیت‌زدایی فلزات توسط بیومولکول‌ها باعث ایجاد پاسخ‌هایی می‌شود از جمله القاء پروتئین‌های شوک گرما، فیتوچلاتین و فریتین‌ها، پروتئین‌های انتقالی یا افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون و پراکسیداز (Prasad, 1977). اتم‌های نقره با اتصال به گروه‌های تیول (-SH) در آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در سلول‌ها می‌توانند آنها را

غیر فعال کنند. نقره می تواند در یک عمل کاتالیزوری اکسیداتیو شرکت کند که باعث ایجاد باندهای دی سولفید (R-S-S-R) می شود (Davies & Etris, 1997). نقره ای که کاتالیزور شکل گیری باندهای دی سولفید می باشد احتمالاً می تواند باعث تغییر شکل آنزیم های سلولی شده و متعاقباً باعث تاثیر در عمل آنها شود (Gavanji *et al.*, 2013). از سوی دیگر، اتیلن از طریق تاثیر بر گونه های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن، کاهش دفاع آنتی اکسیدانی را می تواند به دنبال داشته باشد و در نتیجه باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و در نهایت مرگ سلولی شود (Munne-Bosch *et al.*, 2004). کاهش و افزایش های مشاهده شده در میزان فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی گیاهان در این مطالعه با افزایش تیمار نانو نقره می تواند به دلیل تغییر در اثرات ضد اتیلنی نانو نقره و تغییر در شدت تنش اکسیداتیو (به عنوان تنش ثانویه و همراه تنش فلز سنگین) باشد. تحریک تولید ROS در گیاه تحت تیمار نانو نقره گزارش شده است که می تواند باعث تخریب ساختمان کلروپلاست، چربی ها و DNA شود. کاربرد ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نانو نقره (با ابعاد ۱۰ نانومتر) در آرابیدوپسیس باعث افزایش تولید آنزیم های آنتی اکسیدان و کاربرد ۳ میلی گرم در لیتر نانو نقره باعث کاهش تولید آنها شد بر این اساس ظرفیت تولید آنتی اکسیدانها در تنش کم نانو نقره افزایش و با افزایش تنش کاهش پیدا کرد (Qian *et al.*, 2013). همچنین تاثیر نانو نقره با غلظت ۰/۵ تا ۲۵ میلی گرم در لیتر بر روی عدسک (*Lemna minor L.*) به مدت ۴۸ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در غلظت های کمتر و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در غلظت های بیشتر شد (Glavas *et al.*, 2012). فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تحت شرایط تنش بسته به مقاومت گیاه متفاوت می باشد (Bor *et al.*, 2003). کاربرد مقادیر مناسب نانو نقره (با ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر) باعث حفظ فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در شرایط نگهداری در تاریکی در گیاه شمعدانی واریته های *Foxy* و *Flower fairy* می شود (Hatami & Ghorbanpour, 2013). کاهش مشاهده شده در فعالیت سیستم آنتی اکسیدان تحت تاثیر نانو ذرات می تواند به دلیل تخریب پروتئین های آنزیمی CAT و یا APX به وسیله القاء پروتئازهای درونی در اثر تنش، افزایش سرعت تخریب پروتئین های آنزیمی نسبت به بیوسنتز آن (Feierabend & Engel, 1986)، افزایش میزان رادیکال های آزاد مانند  $H_2O_2$  (Hashemi *et al.*, 2010) و سمیت ناشی از افزایش آنها باشد.

از دیگر عوامل سلولی پاسخ دهنده به تنش های محیطی پروتئین ها و الگوهای بیانی آنها است. پروتئین ها محصولات نهایی مسیرهای اطلاعاتی سلول هستند که در پاسخ به نیازهای سلول در شرایط مختلف ساخته شده و به موقعیت های سلولی مناسب منتقل و در صورت نیاز تخریب می گردند و یا میزان بیانشان تغییر می یابد. گیاهان با قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین گستره ی عظیمی از پاسخ ها را در سطح مولکولی، سلولی و در سراسر گیاه می دهند، این پاسخ ها گهگاه با القاء تغییراتی در میزان بیان برخی ژن ها در گیاه، بر مسیرهای بیوشیمیایی و آنزیمی معمول سلول، روند متابولیسم و در کل چرخه زندگی سلول و گیاه تأثیر می گذارند. بنابراین بررسی تغییرات پروتئین ها و الگوی بیان آنها در مواجهه با فلزات سنگین می تواند در

درک و شنا سایی نقش آنها در ایجاد ساز و کارهای سازشی و مقاومتی گیاه در آن تنش نقش مهمی داشته باشد (Ewais, 1997). تغییرات القاء شده در میزان پروتئین‌های محلول کل حاصل از اندام هوایی و ریشه گیاهان گوجه رشد یافته در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف نانو نقره دارای الگوی متفاوتی بود. تغییرات کمی القاء شده در پروتئین‌های محلول کل ممکن است بازتابی از پاسخ‌های بیوشیمیایی و مولکولی گیاه گوجه در پاسخ به نانو ذرات نقره در محیط کشت و نیز تنش اکسیداتیو و تجمع گونه‌های فعال باشد که در راستای سازگار سازی گیاه نسبت به تغییر شرایط محیطی‌اش بیان شود. در واریته‌های Flowerfairy و Foxi شمع‌دانی افزایش مقدار پروتئین در تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره (با ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر) که به صورت محلول پاشی روی برگ‌ها برای ۵ روز استفاده شده بود، گزارش شده است (Hatami & Ghorbanpour, 2013). نقش هورمون اتیلن در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی به طور قطع از طریق تأثیر پیام هورمونی اتیلن در هسته و روشن یا خاموش شدن ژن‌های فعال شرکت کننده در آن فرایندها و در نتیجه بروز پاسخ‌های اتیلنی در گیاه است. نقره به عنوان یک باز دارنده فعالیت اتیلن، با مهار درک سیگنال اتیلن تو سط گیرنده‌ها بر روند انجام این فرایندها و نحوه بیان ژن‌های درگیر در سطح رونویسی و ترجمه اثر می‌گذارد (Rostami & Ehsanpour, 2010). اتیلن با نقش داشتن در فرایندهای رشد و نمو متعدد، در القاء بیان بسیاری از پروتئین‌ها دخالت دارد (Kader, 1985; Aebels *et al.*, 1988; Cervantes *et al.*, 1994; Dandekar *et al.*, 2004; Kurdoda *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد احتمالاً یون‌های نقره با عملکرد خود در مهار فعالیت و پاسخ اتیلنی بتواند در مهار یا تغییر بیان ژن‌های موثر از اتیلن در سطح ژنوم، رونویسی و ترجمه تأثیر بگذارد. حضور نانو نقره در محیط می‌تواند با تغییر در میزان بیان برخی پروتئین‌ها به صورت کاهش و یا افزایش بیان و یا حتی القاء مهار بیان آنها، تغییراتی را در پروتئین کل سنجش شده صورت دهد. در مطالعه حاضر نانو نقره منجر به ایجاد تغییراتی به صورت افزایش و یا کاهش در شدت بیان نسی برخی باندهای پروتئینی و نیز القاء بیان یک سری از پروتئین‌ها در شرایط تیمار شد که در گیاهان شاهد، بیان آنها مشاهده نگردید. همچنین نتایج نشان داد که حضور نانو نقره در محیط باعث عدم بیان برخی باندهای پروتئینی شد. تغییرات ایجاد شده ممکن است به دلیل آسیب‌های وارده تو سط نقره و یا گونه‌های اکسیژن فعال در سطح ژنوم و بیان ژن‌ها (Rotillio *et al.*, 1995; Iokhina *et al.*, 2003) و یا پس از رونویسی و ترجمه به پروتئین‌ها و آنزیم باشد. افزایش بیان مشاهده شده می‌تواند در اثر افزایش سرعت رونویسی و یا ترجمه، کاهش سرعت و میزان تخریب پروتئین‌های مسئول برای پاسخ به تغییرات رخ داده و افزایش طول عمر آنها در سلول در پاسخ به تنش‌ها و تغییر شرایط محیطی باشد. کاهش بیان در پروتئین‌ها احتمالاً می‌تواند ناشی از اثرات بازدارندگی نقره و یا تنش اکسیداتیو پیرو آن بر روی رونویسی و یا فرایند ترجمه باشد. بیان متفاوت پروتئین‌های مختلف به صورت تنظیم مثبت و یا منفی مشخص می‌سازد که یک سیستم پیچیده‌ای برای پاسخ به تنش نقره (در مقیاس نانومتری) در گیاه گوجه وجود دارد. سلول‌های گیاه احتمالاً تحت شرایط تنش فلز سنگین مانند نقره سنتز برخی پروتئین‌های ویژه‌ای را تغییر داده و این تغییرات اعمال شده در سنتز پروتئین‌ها متفاوت است. مطالعه حاضر

نشان داد که سنتز شش باند پروتئینی در اندام هوایی به وسیله نانو نقره تحت تأثیر قرار می‌گیرد. الگوی متفاوت تغییر بیان نسبی این پروتئین‌ها در برابر غلظت‌های به کار رفته نانو ذرات نقره در این مطالعه می‌تواند موید این باشد که احتمالاً این پروتئین‌ها می‌توانند جزء پروتئین‌های حساس و یا مسئول پاسخ به نانو نقره (Nanosilver responsive proteins) و یا پروتئین‌های تنش (Stress proteins) در گیاه گوجه باشند که نقش‌های کلیدی و مهمی را در روند سازش این گیاه در حضور نانو نقره بازی می‌کنند. تغییرات مشاهده شده در شدت باندهای پروتئینی با تکنیک ژل الکتروفورز یک بعدی نشان دهنده دقیق همه تغییرات نیست و لازم است با روش‌هایی مانند ژل الکتروفورز دو بعدی و انجام مطالعات پروتئومیک به نتایج دقیق‌تر و واقعی‌تری از چگونگی پاسخ گیاهان تحت شرایط تنش با نانو نقره دست یافت.

## منابع

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Method in Enzymology*, 105: 121-126.
- Amini, F., Ehsanpour, A.A., Hoang, Q.T. and Shin, J.Sh. (2007). Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(4): 464-471.
- Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, K.S., Santosh, P., Kavitha, H.U., Rao, Y. and Satish, S. (2013). Plants: emerging as nano factories towards Facimile route in synthesis of nanoparticles. *Bioimpacts*, 3: 111-117.
- Basra, A. S. and Basra, R. K. (1997). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Pp.1-43. *Hardwood Academic, Amsterdam, Netherlands*.
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S. and Autrup, H. (2012). Toxicity of silver nanoparticles or silver ion. *Toxicology Letter*, 208: 286-292.
- Beyer, E.M. (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*, 58: 268-271.
- Beyer, E.M. (1979). Effect of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. *Plant Physiology*, 63: 169-173.
- Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, 164: 77-84.
- Bradford, 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.
- Chen, X. and Schluesener, H.J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letter*, 176: 12-1.
- Danaee, E., Naderi, R., Kalatejari, S. and Ladan Moghadam, A.R. (2013). Evaluation the effect of nano silver with salicylic acid and benzyl adenine on longevity of Gerbera flowers. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 3(8): 682-690.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Journal of Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795.
- Davies, R.L. and Etris, S.F. (1997). The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catalysis Today*, 36: 107-114.

- Faunce, T. and Watal. (2010). Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine*, 5(4): 617–632.
- Feierabend, J. and Dehne, S. (1996). Fate of the porphyrin cofactors during the light dependent turnover of catalase and of the photosystem II reaction center protein DI in mature rye leaves. *Planta*, 198: 413–422.
- Feierabend, J. and Engel, S. (1986). Photo inactivation of catalase in vitro and in leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251: 567–576.
- Gavanji, S.h., Abdul Aziz, H., Larki, B. and Mojiri, A. (2013). Bioinformatics prediction of interaction of silver nitrate and nanosilver on catalase and nitrat reductase. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 1(2): 26-35.
- Geho, D.H., Jones, C.D., Petricoin, E.F. and Liotta, L.A. (2006). Nanoparticles: potential biomarker harvesters. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(1): 56-61.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Glavaš Ljubimir K., Radić Brkanac S., Cvjetko P., Vujčić V., Ljubimir S., Pevalek-Kozlina B., (2012). Toxicity of silver nanoparticles in Duckweed (*Lemna minor* L.). *International Conference-Plant Growth, Nutrition and Environment Interactions*, Austrija, Beč.
- Hamdia, M.A and Shaddad, M.A.K. (2010). Salt tolerance of crop plants. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 6(3): 64-90.
- Hashemi, S., Asrar, Z. and Pourseyedi, S. (2010). Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some physiological and biochemical parameters in *Lepidium sativum*. *Iran Journal Plant Biology*, 2(2): 1-10.
- Hatami, M. and Ghorbanpour, M. (2013). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nano silver application and dark storage, *Turkish Journal of Biology*, 38 (1): 130-139
- Hatami, M. and Ghorbanpour, M. (2013). Effect of nano silver on physiological performance of *Pelargonium* plants exposed to dark storage. *Journal of Horticultural Research*, 21(1): 15-20.
- Jahnke, L.S. and White, A.L. (2003). Long-term hypo saline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1193–1202.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.
- Lee, D.H., Kim, Y.S. and Lee, C.B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Phyiology*, 158: 737–745.
- Mars, K.A., Alfenito, M.R., Loyd, A.M. and Valbot, V.A. (1995). Glutathione s-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene bronze-2. *Nature*, 375: 397-400.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*. 7: 405–410.
- Munne-Bosch, S., Penuelas, J., Asensio, D. and Llusia, J. (2004). Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of Holm Oak to heat and drought stress. *Plant Physiology*, 136: 2937-2947.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

- Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
- Olson, B.J.S.C. and Markwell, J. (2007). *Current protocols in protein science. Detection and Assay Method*. 48: 3.4.1-3.4.29.
- Panyala, N.R., Pena-Mendez, E.M., Havel, J. (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health. *Journal of Applied Biomedicine*, 6: 117-129.
- Prasad, M. N. V. (1997) *Plant Ecophysiology: Trace Metals*. Pp. 207. In: John Wiley and Sons, New York.
- Qian, H.F., Chen, W., Sheng, G.D., Xu, X.Y., Liu, W.P. and Fu, Z.W. (2008). Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, 88: 301-307.
- Qian, H.F., Hu, H.J., Mao, Y.Y., Ma, J., Zhang, A.P. and Liu, W.P. (2009). Enantioselective phytotoxicity of the herbicide imazethapyr in rice. *Chemosphere*, 76(7): 885-892.
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L. and Fu, Z. (2013). Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences*, 25: 1947-1955.
- Quadros, M.E. and Marr, L.C. (2010). Environmental and human health risks of aerosolized silver nanoparticles. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 60: 770-781.
- Ratte, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1): 89-108.
- Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D. and Douce, R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 7805-7812.
- Rostami, F. and Ehsanpour, A. A. (2009). Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* culture. *Malaysian Applied Biology Journal*, 32(2): 49-54.
- Salama, H. M. H. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology*, 3: 190-197.
- Salehi, Z. and McCarthy, J.E.G. (2002). Structure and function of cap-associated proteins in yeast. Ph.D thesis. Department of Biomolecular Sciences, University of Manchester, Institute of Sciences and Technology (UMIST), Manchester, England.
- Schuzendubel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., and Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161: 613-619.
- Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93.
- Wijnhoven, S.W., Peijnenburg, W.J., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I. and Van De Meent, D. (2009). Nano-silver: Available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. [Review]. *Nanotoxicology*, 3: 109-138.



---

## The effect of silver nanoparticles on the antioxidant capacity and total soluble protein pattern in tomato seedlings under *in vitro* culture

R. Razavizadeh\*<sup>1</sup>

Received: 2018.2.17

Accepted: 2018.8.27

### Abstract

In this study, the effects of nanoparticles of silver in concentrations of 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 and 100 ppm on physiological parameters such as total anthocyanin, total soluble protein and enzyme activities of Catalase, Ascorbate peroxidase and Superoxide dismutase in tomato seedlings (*Solanum Lycopersicon*) under *in vitro* were evaluated. The results showed that anthocyanin levels in response to the presence of silver nanoparticles decreased significantly to 10 ppm concentration. The total protein soluble protein increased with increasing the concentration of nanoparticles in the shoot and decreased with increasing concentrations at 20 and 40 ppm compared to the control. The intensity of expression of six protein bands treated with silver nanoparticles also changed. Increasing the concentration of nanoparticles in the medium increased the activities of antioxidant enzymes activities in the roots and shoots.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Nanotechnology, Silver nanoparticles, Total soluble protein