

## القای اکسیداسیون پروتئین، فعالیت پروتئاز، تغییرات گروه‌های تیولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) توسط نانو نقره

### و نیترات نقره در شرایط کشت در شیشه

مظفر باقرزاده همایی Ph.D.، علی اکبر احسان پور Ph.D.\*

– دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اصفهان، ایران  
\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۸

#### چکیده

**هدف:** در این تحقیق، به منظور مقایسه سمیت و تنش اکسیداتیو احتمالی ناشی از اعمال نانو نقره و یون نقره، اثر غلظت‌های مختلف آن‌ها بر بعضی از شاخص‌های بیوشیمیایی مرتبط با اکسیداسیون پروتئین‌ها در گیاه سیب‌زمینی مورد مطالعه قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** گیاهچه‌های سیب‌زمینی حاوی یک گره، به محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانو نقره و نیترات نقره منتقل شدند. پس از ۴ هفته، جدا کشت‌های رشد یافته به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های موردنظر برداشت شدند.

**نتایج:** محتوی پروتئین کل برگ در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره یا یون نقره، به جز در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر از تیمار یون نقره، با افزایش غلظت کاهش نشان دادند. همچنین، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ در ۵ باند پروتئینی مشاهده شد. محتوی گروه‌های کربونیل در تیمارهای نانو نقره و یون نقره با افزایش غلظت نقره افزایش یافت. محتوی تیول‌های پروتئینی و غیر پروتئینی به ترتیب کاهش و افزایش را نشان دادند. به علاوه، افزایش بیشتری در فعالیت پروتئاز و توان آنتی‌اکسیدانتی کل در جدا کشت‌های تحت تیمار یون نقره در مقایسه با نانو نقره مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که آسیب اکسیداتیو در جدا کشت‌های تحت تیمار با نانو نقره بسیار بیشتر از جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره است و علاوه بر آزادسازی یون نقره، اثرات ویژه مرتبط با نانو ذرات هم می‌تواند در القای تنش اکسیداتیو ناشی از نانو نقره در گیاه سیب‌زمینی دخالت داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** تنش اکسیداتیو، پروتئاز، اکسیداسیون پروتئین‌ها، نانو نقره، گروه‌های تیول

## مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در دست ورزی مواد و تولید محصولات مبتنی بر فناوری نانو، قلمرو کاربرد نانو مواد در زمینه‌های مختلف از جمله کشاورزی را افزایش داده است (۱). نانو نقره به دلیل دارا بودن خواص ضد باکتریایی، در مقایسه با سایر نانو مواد بیشتر مورد توجه بوده است (۲). گزارش‌های متعددی مبنی بر اثرات سودمند نانو نقره بر رشد نمو گیاهان وجود دارد. مصطفی و همکاران (۳) گزارش دادند که دانه رست‌های سویا تیمار شده با نانو نقره در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر، رشد نمو بهتری را در شرایط غرقابی از خود نشان دادند. بهبود بعضی از شاخص‌های رشد نظیر افزایش سطح برگ و تولید بیوماس بیشتر در گیاه سیب‌زمینی تیمار شده با نانو نقره، نیز به اثبات رسیده است (۴). از آنجایی که یون نقره بازدارنده عمل اتیلن محسوب می‌شود، رشد و نمو بهتر گیاه سیب‌زمینی در شرایط کشت در شیشه تحت تیمار نانو نقره با غلظت بهینه، ممکن است با مهار اتیلن مرتبط باشد. شارما و همکاران (۵) گزارش داده‌اند که تیمار گیاهان براسیکا ژونسه آ با ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانو نقره، باعث افزایش بعضی از شاخص‌های فیزیولوژیکی نظیر وزن تر، طول ساقه و ریشه، محتوی کلروفیل و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانت‌ها شده است. باین‌وجود، کاربرد نانو نقره در گیاهان زراعی نیاز به تامل بیشتری دارد.

امروزه به دلیل کاربردهای گسترده‌ای که محصولات حاوی نانو نقره در زندگی ما دارند، در آینده نزدیک ممکن است نانو نقره به‌عنوان یک آلاینده خود را نشان دهد. در کشاورزی آفت‌کش‌های حاوی نانو نقره هم امروزه استفاده می‌شود، بنابراین با گذشت زمان آلودگی زمین‌های کشاورزی به این ماده افزایش می‌یابد (۶). اثرات مثبت یا منفی نانو نقره بر گیاهان به عوامل مختلفی از جمله اندازه ذرات، شکل، پوشش سطحی، مدت‌زمان تیمار، گونه گیاه و مرحله نمو بستگی دارد (۷ و ۸). نتایج حاصل از اثر نانو نقره بر گیاه باقلا نشان داده است که نانو نقره باعث القای بعضی از ناهنجاری‌های کروموزومی و کاهش شاخص میتوزی در سلول‌های نوک ریشه شده است (۹). در گیاه آرابیدوپسیس تالیانا، نانو نقره سبب القای از هم‌گسیختگی غشای تیلاکوئیدهای کلروپلاست، کاهش محتوی کلروفیل، افزایش بیان ژن‌های اکوپورین‌ها و ژن‌های مربوط به آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی شده است (۱۰). افزایش بیان

ژن‌های مرتبط با ترکیبات فنلی، گلوکوزینولات‌ها، تخریب DNA و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) در گیاه براسیکا راپا تحت تیمار نانو نقره نیز گزارش شده است (۱۱).

پروتئین‌ها به‌عنوان یکی از اجزای تشکیل‌دهنده غالب در سلول، توسط رادیکال‌های آزاد مورد حمله قرار می‌گیرند. پروتئین‌ها در سلول نقش‌های متنوع ساختاری، کاتالیزوری و کارکردی را بر عهده دارند و اکسیداسیون پروتئین‌ها عملکرد آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۲). اکسیداسیون پروتئین‌ها یک رویداد مخرب سلولی و یکی از نشانگرهای تنش اکسیداتیو محسوب می‌شود. از بین تغییرات اکسیداتیو متعدد پروتئین‌ها، اکسیداسیون گروه‌های تیولی و تشکیل گروه‌های کربونیل بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. اکسیداسیون گروه‌های تیولی روی گروه‌های سولفیدریل آزاد آمینواسیدهای گوگردی نظیر متیونین و سیستئین صورت می‌گیرد و یک رویداد برگشت‌پذیر است. کربونیلی شدن که فرم دیگر اکسیداسیون پروتئین‌ها است، غیر قابل برگشت بوده و بر روی اسید آمینه‌های هیستیدین، آرژنین و لیزین صورت می‌گیرد (۱۳). اکسیداسیون غیرقابل‌برگشت پروتئین‌ها به دلیل تولید ترکیبات واکنش‌گر، به شدت مخرب بوده و باعث آسیب سایر پروتئین‌ها و DNA می‌شود. بنابراین، سرنوشت نهایی پروتئین‌های آسیب‌دیده پروتئولیز و تجزیه توسط پروتئازهاست (۱۴).

در این تحقیق، به منظور مقایسه سمیت سلولی و تنش اکسیداتیو احتمالی ناشی از اعمال نانو نقره و یون نقره، اثر غلظت‌های مختلف آن‌ها بر القای اکسیداسیون پروتئین‌ها، فعالیت پروتئازها، تغییرات گروه‌های تیولی، پروتئین محلول و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در گیاه سیب‌زمینی کشت شده در شرایط کشت بافت مورد مطالعه قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

## خصوصیات نانو نقره و نحوه آماده‌سازی

در این تحقیق از نانوذرات نقره پوشش داده شده با پلی وینیل پیرولیدون (PVP) خریداری شده از شرکت نانومواد تحقیقاتی ایالات متحده (هوستون، تگزاس)، با اندازه متوسط ذرات ۲۰ نانومتر، دارای شکل کروی و مساحت  $18-22 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  استفاده شد. برای تهیه استوک نانونقره، نانوپودر را در آب دوبار تقطیر بصورت سوسپانسیون

درآورده و به مدت ۱۰ دقیقه تحت اثر امواج فراصوت قرار گرفت. تهیه مواد گیاهی و شرایط رشد: گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، رقم وایت دزیره، از قطب تنش‌های گیاهی غیر زیستی ایران واقع در دانشگاه اصفهان تهیه شد. برای تکثیر، گیاهچه‌های حاوی یک گره به محیط کشت پایه MS (۱۵) منتقل شدند. پس از گذشت چهار هفته، جدا کشت‌های رشد یافته به محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوقره و معادل آن نیترات نقره منتقل شدند. دمای اتاق رشد  $\pm 1$  ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و از شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار انجام و پس از ۴ هفته، جدا کشت‌های رشد یافته به منظور اندازه گیری شاخص‌های بیوشیمیائی مورد نظر برداشت شدند.

**اندازه گیری اکسیداسیون پروتئین‌ها:** برای اندازه گیری اکسیداسیون پروتئین‌ها از روش Reznick و Packer (۱۸) استفاده شد. به ۱/۱ گرم از بافت تازه برگ، ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰ میلی‌مولار، ۷/۴ pH= EDTA ۱ میلی‌مولار و DTT ۲ میلی‌مولار اضافه شد و استخراج روی یخ انجام گرفت. مخلوط به دست آمده در دور ۲۲۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از روشناور به دست آمده، ۱ میلی‌لیتر از دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) ۱۰ میلی‌مولار (حل شده در HCl 1M) اضافه نموده و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. سپس به منظور رسوب دادن پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر از TCA ۱۰ درصد (تری کلرواستیک اسید) به نمونه‌ها افزوده و در ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب به دست آمده ۳ بار با ۲ میلی لیتر اتیل استات-اتانول (1:1, v/v) شستشو داده شد و سپس در ۱ میلی‌لیتر گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار، pH=۲/۳ حل شد. جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1600 در طول موج ۳۷۰ نانومتر خوانده شد. از ضریب خاموشی مولی DNP ۲۲۰۰۰ M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>، برای محاسبه محتوی کربونیل نمونه‌ها استفاده شد. بر این اساس با توجه به ضریب خاموشی مولی و استفاده از قانون بیر-لامبرت، محتوی

درآورده و به مدت ۱۰ دقیقه تحت اثر امواج فراصوت قرار گرفت.

**تهیه مواد گیاهی و شرایط رشد:** گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، رقم وایت دزیره، از قطب تنش‌های گیاهی غیر زیستی ایران واقع در دانشگاه اصفهان تهیه شد. برای تکثیر، گیاهچه‌های حاوی یک گره به محیط کشت پایه MS (۱۵) منتقل شدند. پس از گذشت چهار هفته، جدا کشت‌های رشد یافته به محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوقره و معادل آن نیترات نقره منتقل شدند. دمای اتاق رشد  $\pm 1$  ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و از شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار انجام و پس از ۴ هفته، جدا کشت‌های رشد یافته به منظور اندازه گیری شاخص‌های بیوشیمیائی مورد نظر برداشت شدند.

**اندازه گیری پروتئین محلول کل:** به منظور استخراج پروتئین‌های محلول برگ، ۱/۱ گرم از بافت تر برگ با ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، pH= ۷/۸، حاوی EDTA (1mM)، DTT (4mM) و گلیسرول ۱۰ درصد، درون یک هاون و روی یخ همگن شد. مخلوط به دست آمده، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۱۰۰۰ g سانتریفیوژ (Eppendorf Model 5417R) شد. از محلول رویی به منظور اندازه گیری پروتئین محلول کل استفاده شد. اندازه گیری پروتئین کل بر اساس روش برادفورد (۱۶) انجام شد. برای اندازه گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها، ۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد را در لوله آزمایش ریخته، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره نمونه مورد نظر را به آن افزوده و مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه، سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1600 در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. محاسبات با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده با پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) انجام و میزان پروتئین محلول کل، بر حسب میلی‌گرم پروتئین بر گرم وزن تر گزارش شد.

**الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE):** الکتروفورز پروتئین‌های محلول برگ با استفاده از دستگاه الکتروفورز با سیستم عمودی Mini VERTI GEL2 و منبع تغذیه

پایان ۱۰۰ میکرولیتر DTNB (دی تیوبیس نیتروبنزوتیک اسید) ۱۰ میلی مولار (DTNB) در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار (pH=۷) اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس جذب محلول در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری گروه‌های تیولی غیرپروتئینی، عصاره حاوی گروه‌های تیولی کل را به منظور حذف تیول‌های پروتئینی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه نموده و دوباره در ۲۰۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی برای اندازه‌گیری گروه‌های تیولی غیر پروتئینی استفاده شد. تیول‌های پروتئینی را با کم کردن مقدار تیول‌های کل از تیول‌های غیر پروتئینی به دست آمد. محاسبات براساس ضریب خاموشی  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  و استفاده از قانون بیر-لامبرت انجام و مقدار گروه‌های تیولی بر اساس نانومول بر گرم وزن تر بافت گزارش شد.

**اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل:** فعالیت آنتی‌اکسیدانسی کل با استفاده از روش (Ferric FRAP (Reducing antioxidant power) اندازه‌گیری شد. در این روش کمپلکس فریک-تری پیریدیل تریازن ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (TPTZ) در pH پایین، تحت تاثیر آنتی‌اکسیدانت‌ها احیا شده و رنگ آبی تیره با حداکثر جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر ایجاد می‌شود (۲۱). استخراج عصاره از برگ و با استفاده از بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار، pH=۷/۸ انجام شد. به ۰/۱ گرم از بافت برگ، ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم اضافه و استخراج بر روی یخ انجام شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانسی کل مورد استفاده قرار گرفت. به ۵۰ میکرولیتر عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کار FRAP که حاوی بافراسات ۳۰۰ میلی مولار  $\text{FeCl}_3$  (pH=۳/۶). تری پیریدیل تریازن ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میلی مولار می‌باشد اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. محاسبات با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده به کمک اسکوربیک اسید انجام و ظرفیت آنتی‌اکسیدانسی کل بر حسب میکرومول آهن احیا شده به وزن تر نمونه‌ها گزارش شد.

**آنالیز آماری:** آزمایش‌های انجام شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. میانگین‌ها با

کربونیل بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه و گزارش شد.

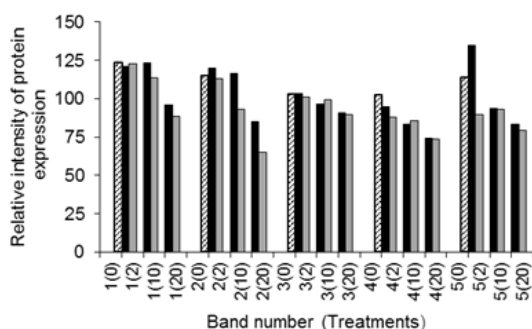
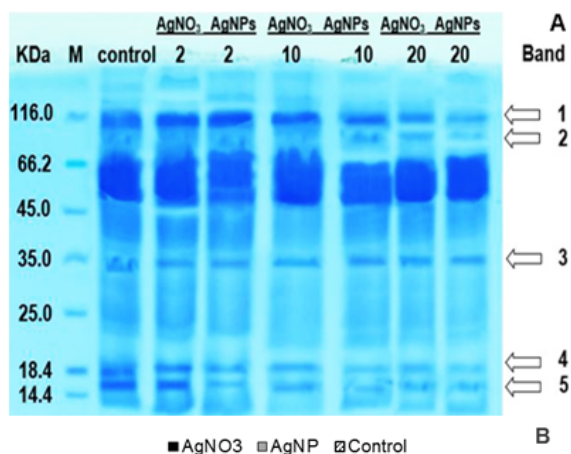
**سنجش فعالیت پروتئاز:** فعالیت پروتئازی بر اساس روش Polge و همکاران انجام شد (۱۹). به منظور تعیین فعالیت پروتئازی، ابتدا ۲/ گرم از بافت برگ به کمک ۲ میلی‌لیتر از بافر Tris-HCl، ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۵) حاوی DTT (۲ میلی مولار) و روی یخ همگن شد. سپس مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۲۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی عصاره استفاده شد. به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی ۲۵۰ میکرولیتر آزوکازین ۲ درصد اضافه و این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس واکنش را با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از TCA ۱۰ درصد متوقف شد. مخلوط واکنش در ۴۰۰۰ g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی ۱ میلی‌لیتر از NaOH ۱ مولار اضافه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در ۴۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1600 خوانده شد. محاسبات بر اساس ضریب خاموشی آزوکازین  $37 \text{ Lcm}^{-1} \text{ g}^{-1}$  و بر اساس میلی‌گرم آزوکازین تجزیه شده در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. فرمول محاسبه فعالیت آنزیم پروتئاز به صورت زیر است:

$$\text{فعالیت آنزیم پروتئاز} = \left[ \frac{\text{Abs}}{\Delta t} \times V \right] / (\varepsilon \times v \times P)$$

Abs، جذب نور در طول موج ۴۴۰ نانومتر.  $\Delta t$  زمان بر حسب دقیقه. V، حجم بافر واکنش (میلی‌لیتر). v، حجم نمونه (میلی‌لیتر). P، میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر و  $\varepsilon$ ، ضریب خاموشی آزوکازین می‌باشد.

**اندازه‌گیری تیول‌های پروتئینی، غیر پروتئینی و**

**تیول کل:** برای استخراج، ۰/۱ گرم بافت برگ به کمک ۲ میلی‌لیتر از اسکوربات سدیم ۱۵ درصد و روی یخ همگن شد. عصاره به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی برای اندازه‌گیری گروه‌های تیولی کل و تیول‌های غیر پروتئینی استفاده شد. اندازه‌گیری گروه‌های تیولی بر اساس روش دی کوک و کوپپر و (۲۰) انجام شد. برای اندازه‌گیری تیول کل ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر از بافر Tris-HCl ۲۰۰ میلی مولار، pH=۸ مخلوط شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از SDS ۸ درصد و در



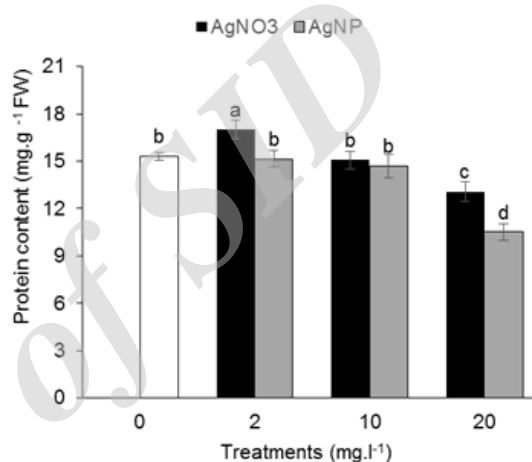
شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ (A) و آنالیز میزان بیان نسبی چند باند پروتئینی (B) در برگ جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره.

باند پروتئینی ۱ با وزن مولکولی ۱۱۶ کیلودالتون در جدا کشت‌های تحت تاثیر تیمار نانو نقره و یون نقره در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل تغییر محسوسی نداشت اما با افزایش غلظت نقره، کاهش بیان قابل ملاحظه ای در این باند پروتئینی به‌ویژه در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره مشاهده شد (شکل ۲). باند پروتئینی ۲ در محدوده ۱۱۶ و ۶۶ کیلودالتون در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل از شدت نسبی بیشتری برخوردار بود، در حالی که در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره نسبت به کنترل افزایشی در میزان بیان نسبی مشاهده نشد. باند پروتئینی ۳ با وزن مولکولی ۳۵ کیلودالتون در جدا کشت‌های تحت تاثیر تیمار نانو نقره و یون نقره در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل تغییر چندانی از نظر بیان نسبی نداشت اما با افزایش غلظت نقره کاهش یافتند. باند پروتئینی ۴ با وزن مولکولی ۱۸/۴ کیلودالتون در جدا کشت‌های تحت تاثیر تیمار نانو نقره و یون نقره به‌صورت

استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن آنالیز و با یکدیگر مقایسه شدند. در هر اندازه گیری ارتباط بین گروه‌ها بررسی و محدوده معنی داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

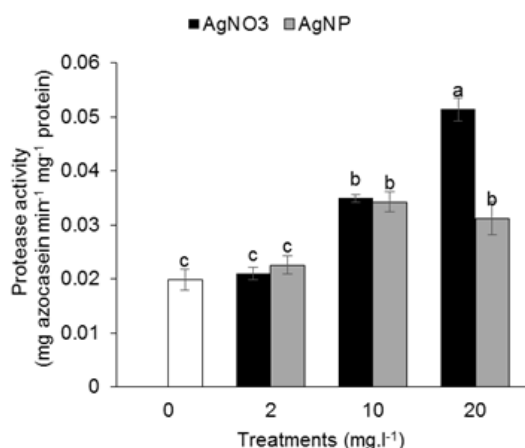
داده‌های حاصل از اندازه‌گیری محتوی پروتئین کل برگ در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره، در غلظت‌های ۲ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل تغییر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان ندادند (شکل ۱).



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر محتوی پروتئین کل (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

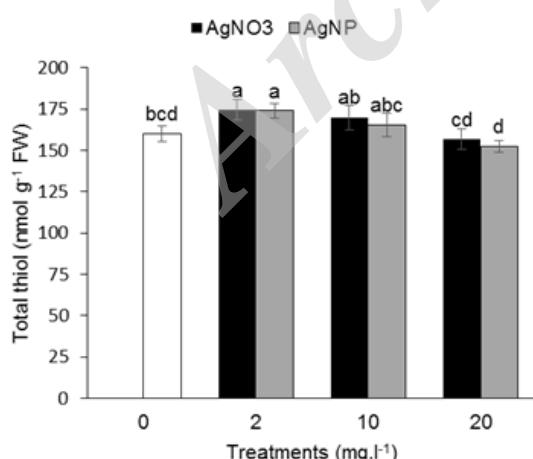
با این حال، در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل ۳۱/۶ درصد کاهش در محتوی پروتئین کل مشاهده شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری محتوی پروتئین کل برگ در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره، در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل ۱۰ درصد افزایش و در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل تغییر معنی‌داری  $p < 0.05$  را نشان نداد. محتوی پروتئین کل برگ در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره، در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل ۲۳ درصد کاهش را نشان داد.

نتایج الکتروفورزی پروتئین‌های برگ جدا کشت‌های تحت تاثیر تیمار نانو نقره و یون نقره، وجود ۵ باند پروتئینی مشخص را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر فعالیت پروتئاز (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

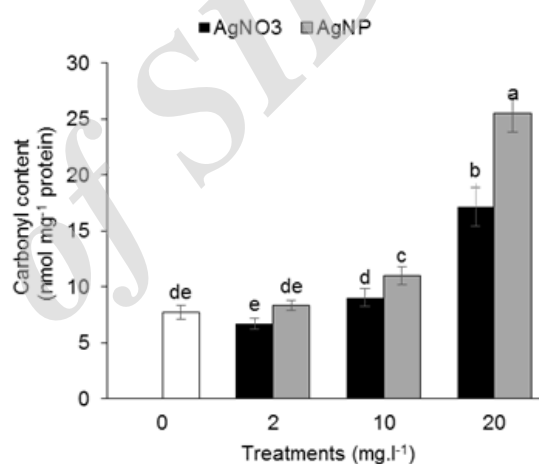
با این‌حال در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره، در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل، به ترتیب ۴۳ و ۴۲ درصد افزایش در فعالیت این آنزیم مشاهده شد. فعالیت آنزیم پروتئاز در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب ۳۶٫۳ و ۶۱٫۳ درصد افزایش نشان دادند. محتوی تیول کل در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل، به ترتیب ۷٫۶ و ۸ درصد افزایش را نشان دادند (شکل ۵).



شکل ۵: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر تیول کل (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

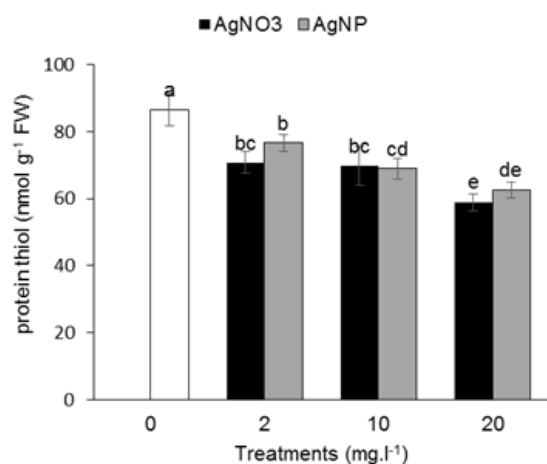
وابسته به غلظت با افزایش غلظت نقره نسبت به کنترل کاهش بیان محسوسی را نشان دادند. باند پروتئینی ۵ در جدا کشت‌های تحت تاثیر یون نقره در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل افزایش بیان نشان داد در حالی که در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در همین غلظت از شدت بیان نسبی کمتری برخوردار بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از اندازه گیری اکسیداسیون پروتئین‌ها در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره، در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل تغییر معنی داری ( $p < 0.05$ ) را نشان نداد. اما در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل، به ترتیب ۲۹٫۶ و ۶۹٫۶ درصد افزایش مشاهده شد (شکل ۳).



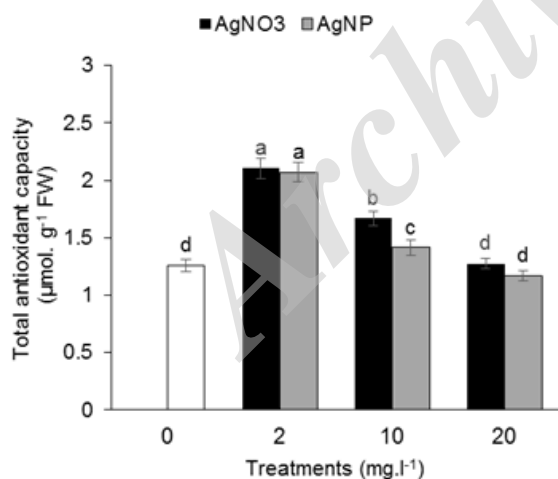
شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر محتوی کربونیل (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اکسیداسیون پروتئین‌ها در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره، در غلظت‌های ۲ و ۱۰ میلی گرم نسبت به کنترل تغییرات معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان ندادند. با این وجود، در غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر ۴۵ درصد افزایش مشاهده شد. نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم پروتئاز در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره، در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر نسبت به کنترل تغییر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان ندادند (شکل ۴).



شکل ۷: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر تیول‌های پروتئینی (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

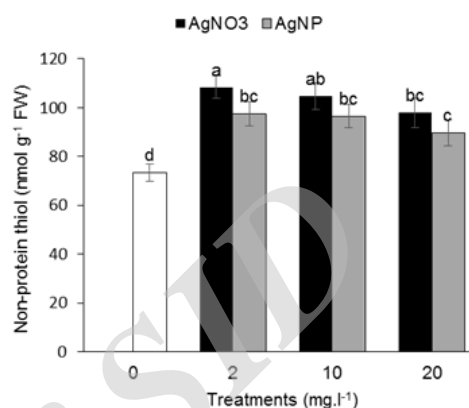
همچنین، مقدار این شاخص در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره در غلظت‌های ۲، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به کنترل به ترتیب، ۱۹/۷، ۲۰/۲ و ۳۲/۷ درصد کاهش نشان داد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل در جدا کشت‌های تیمار شده با نانونقره و یون نقره در غلظت‌های ۲ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان داد (شکل ۸).



شکل ۸: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر توان آنتی‌اکسیدانتی کل (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

با این حال، در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، نسبت به کنترل، تغییر معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) مشاهده نشد. ظرفیت آنتی

اما در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) مشاهده نشد. محتوی تیول‌های غیر پروتئینی در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره، نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را نشان دادند (شکل ۶).



شکل ۶: اثر غلظت‌های مختلف نانو نقره و یون نقره بعد از چهار هفته تیمار، بر تیول غیر پروتئینی (میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار) در جدا کشت‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن  $p < 0.05$  است.

به طوری که مقدار این شاخص در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در غلظت‌های ۲، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به کنترل به ترتیب، ۲۴/۷، ۲۴ و ۱۸/۲ درصد افزایش یافت. به علاوه، در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره، مقدار این شاخص نسبت به کنترل، به ترتیب ۳۲، ۲۹ و ۲۵ درصد افزایش نشان داد. مقدار تیول‌های پروتئینی در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره، نسبت به کنترل کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد، به طوری که مقدار تیول‌های پروتئینی در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در غلظت‌های ۲، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به کنترل به ترتیب، ۱۲/۵، ۲۱/۳ و ۲۸/۵ درصد کاهش یافت (شکل ۷).

اکسیدانتی کل در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در غلظت‌های ۲ و ۱۰ میلی‌گرم برلیتر، نسبت به کنترل به‌ترتیب ۳۹/۲ و ۱۱/۳ درصد افزایش نشان داد. درحالی‌که مقدار این شاخص در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره، نسبت به کنترل به‌ترتیب ۴۰/۳ و ۲۴/۶ درصد افزایش یافت.

#### بحث

آسیب اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین از جمله نقره، در گیاهان پیامدهای مخرب متعددی را به‌دنبال دارد. پروتئین‌ها به‌دلیل فراوانی آن‌ها در سیستم‌های زنده، تحت تاثیر تنش دامنه وسیعی از تغییرات را متحمل می‌شوند. اکسیداسیون پروتئین‌ها و حساسیت آن‌ها به پروتئولیز یکی از این تغییرات و نوعی تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین محسوب می‌شود (۲۲). در این تحقیق، اگرچه، جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر افزایش معنی‌داری را در محتوی پروتئین کل نشان دادند، ولی محتوی پروتئین کل در جدا کشت‌های تیمار شده با نانونقره و یون نقره در غلظت‌های بالاتر در مقایسه با کنترل کاهش یافت. فلزات سنگین به‌روش‌های مختلفی سنتز و بیان پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند که می‌توان به اتصال فلز به گروه‌های تیولی و سایر گروه‌های عاملی موجود در ساختار پروتئین‌ها، جایگزینی فلز سنگین با سایر عناصر فلزی ضروری در متالوپروتئین‌ها یا آنزیم‌ها و مصرف آمینواسیدها در فرآیند سم زدایی فلزات سنگین اشاره کرد. تغییرات در محتوی پروتئین کل مشاهده شده در این تحقیق با مطالعات قبلی در گیاهان *Spinacia oleracea* و *Aeluropus littoralis* مطابقت دارد (۲۳) و (۲۴). علاوه براین تاثیر نقره به‌صورت یون و یا به‌صورت ذرات نانو در غلظت‌های بالا می‌تواند ناشی از اختلال در متابولیسم سلول‌های گیاهی باشد که در نهایت فرآیند رشد را دچار اختلال می‌کند. با توجه به الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های برگ در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره، در بالاترین غلظت نقره اعمال شده (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر) شدت بیان نسبی اکثر باندهای پروتئینی کاهش یافته است. با این وجود، در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره در غلظت ۲ میلی‌گرم برلیتر در باند پروتئینی ۳ و ۵ افزایش بیان مشاهده شد. بیان نسبی باند پروتئینی ۵ با اندازه تقریبی بین ۱۸/۴ و ۱۴/۴ کیلودالتون در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در مقایسه با

کنترل کاهش یافته در حالی‌که در جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره افزایش قابل ملاحظه ای داشت. چنین روندی در باند پروتئینی ۳ با اندازه تقریبی ۳۵ کیلودالتون هم با شدت کمتری مشاهده می‌شود. در مجموع بیان نسبی پروتئین‌ها در تیمارهای نانو نقره و یون نقره روند کم و بیش متفاوتی را نشان می‌دهد که می‌تواند نشان دهنده سطوح متفاوتی از تنش اعمال شده بر گیاه باشد. در توافق با نتایج حاصل از الگوی الکتروفورزی، تغییر بیان پروتئین در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) تیمار شده با نانو نقره هم قبلا توسط پژوهشگران گزارش شده است (۲۵).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری گروه‌های کربونیل، به‌عنوان یکی از نشانگرهای تنش اکسیداتیو، در جدا کشت‌های تحت تیمار نانو نقره و یون نقره در غلظت بسیار کم، نسبت به کنترل تغییر معنی‌داری را نشان نداد. درحالی‌که در غلظت‌های بالاتر در جدا کشت‌های تیمار نقره افزایش قابل ملاحظه ای در این شاخص مشاهده شد. در بالاترین غلظت نقره اعمال‌شده روی جدا کشت‌ها، محتوی گروه‌های کربونیل در تیمارهای نانو نقره و یون نقره به‌ترتیب ۶۹/۶ و ۴۵ درصد افزایش یافت. افزایش بیشتر در اکسیداسیون پروتئین‌ها در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در مقایسه با یون نقره، می‌تواند ناشی از سمیت بیشتر نانو نقره نسبت به یون نقره باشد. نقره در حالت نانو، فاقد بار الکتریکی بوده و در واقع شکل احیا شده نقره هست، بنابراین ممکن است مکانیسم انتقال و میزان آن به‌درون سلول‌های گیاهی نسبت به یون نقره متفاوت باشد. از طرفی نانو نقره پس از ورود به سلول‌ها ممکن است مقدار زیادی از نقره را به‌شکل یونی آزاد نماید که این خود می‌تواند دلیلی بر سمیت بیشتر نانو نقره نسبت به فرم یونی آن باشد. تحقیق صورت گرفته بر روی گیاه *multiflorum* *Lolium* قبل‌النشان داده که نانو نقره سمیت شدیدتری را نسبت به یون نقره در این گیاه القا می‌نماید، بنابراین نتایج حاصل از تحقیق حاضر با این نتایج مطابقت دارد (۲۶).

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو، راه‌کارهای متنوعی را در پیش می‌گیرند که تخریب یا ترمیم پروتئین‌های آسیب‌دیده یکی از آن‌ها محسوب می‌شود. گونه‌های مختلف اکسیژن واکنش‌گر از جمله پراکسید هیدروژن قادرند با پروتئین‌ها واکنش داده و باعث اکسیداسیون پروتئین‌ها شوند. کربنیلی شدن پروتئین‌ها یک واکنش برگشت‌ناپذیر



نقره و یون نقره در غلظت پایین نقره، بیشترین افزایش را در مقایسه با کنترل از خودشان نشان دادند. این در حالی است که مقدار این شاخص در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره در غلظت بالای نقره نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. به نظر می‌رسد افزایش یا کاهش توان آنتی‌اکسیدانی کل جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره و یون نقره، بیانگر درجات مختلفی از تنش اکسیداتیو در غلظت‌های مختلف نقره است. با این دیدگاه، از آنجایی که در غلظت بالای نانو نقره، بیشترین کاهش در محتوی آنتی‌اکسیدانت کل مشاهده شد، می‌تواند نشان‌دهنده آسیب شدیدتر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره در مقایسه با یون نقره در همین غلظت باشد. این نتایج در توافق با مطالعات صورت گرفته بر روی گیاهان *Allium cepa* و *Spirodela punctuta* تیمار شده با نانو نقره هست (۳۰ و ۳۱).

#### نتیجه‌گیری

در این تحقیق، اندازه‌گیری نشانگرهای تنش اکسیداتیو سلولی نظیر محتوی پروتئین کل، محتوی کربونیل، فعالیت پروتئاز، گروه‌های تیولی و توان آنتی‌اکسیدانتی کل در گیاه سیب‌زمینی تحت تیمار با نانو نقره و یون نقره، حاکی از القای آسیب اکسیداتیو شدیدتر در جدا کشت‌های تحت تیمار با نانو نقره است. همچنین، جدا کشت‌های تحت تیمار با یون نقره، فعالیت پروتئازی بالاتری نسبت به تیمار نانو نقره از خودشان نشان دادند که تصور می‌شود جدا کشت‌های تحت تیمار با یون نقره در مقایسه با نانو نقره دارای توانایی بیشتری در حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده داشته و این خود مانع از انباشت این پروتئین‌ها در سلول و ایجاد اتصالات متقاطع و تشکیل مجتمع‌های پروتئینی بزرگ و سمی شده است. از طرفی، از نتایج حاصل از این تحقیق، این‌طور استنباط می‌شود که تنش ناشی از نانو نقره باید از طریق مکانیسمی متفاوت از آزادسازی ساده یون نقره در سلول حاصل شده باشد؛ بنابراین وجود اثرات ویژه مرتبط با نانو ذرات هم در سمیت نانو نقره در گیاه سیب‌زمینی محتمل است.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان صمیمانه از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان، قطب تنش‌های غیر زیستی گیاهی و ستاد توسعه فناوری نانو به‌خاطر حمایت‌های مالی تشکر می‌نمایند.

بوده و سیگنالی قوی برای شناسایی و تجزیه پروتئین‌ها توسط پروتئازهای سلولی است (۲۷). فعالیت آنزیم پروتئاز در گیاهان سیب‌زمینی تیمار شده با نیترات نقره نسبت به نانو نقره افزایش نشان داد. بنابراین، جدا کشت‌های تیمار شده با یون نقره نسبت به جدا کشت‌های تیمار شده با نانو نقره، محتوی پروتئین بالاتر، گروه‌های کربونیل کمتر و فعالیت بالاتری از آنزیم پروتئاز را نشان دادند. با توجه به مقدار پایین‌تر گروه‌های کربونیل در جدا کشت‌های تحت تیمار یون نقره و فعالیت بالاتر پروتئاز، می‌توان نتیجه گرفت که جدا کشت‌های تحت تیمار یون نقره توانایی بهتری در حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده داشته و این مانع از انباشت پروتئین‌های معیوب و سمیت سلولی شده است. گروه‌های تیولی موجود در ساختار پروتئین‌ها دارای تمایل بالایی به اتصال با یون نقره دارند. بنابراین، جدا کشت‌های تحت تاثیر تیمار نانو نقره یا یون نقره، ممکن است اکسیداسیون گروه‌های تیولی پروتئینی را از خودشان نشان دهند. در این تحقیق محتوی تیول‌های پروتئینی و تیول‌های غیر پروتئینی، نسبت به گروه کنترل به ترتیب، کاهش و افزایش معنی‌داری نشان دادند. مقدار تیول‌های پروتئینی در غلظت بالای نانو نقره و یون نقره، نسبت به کنترل، کاهش نشان دادند. کاهش محتوی تیول‌های پروتئینی در گیاهان تحت تیمار با فلزات سنگین نیز توسط پژوهشگران گزارش شده است (۲۸ و ۲۹). از طرف دیگر، مقدار تیول‌های غیر پروتئینی در غلظت بالای نانو نقره و یون نقره، نسبت به کنترل، افزایش یافتند. از آنجایی که اکسیداسیون گروه‌های تیولی پروتئینی به‌عنوان سیگنالی جهت فعال شدن مکانیسم‌های حفاظتی عمل کرده تا از اکسیداسیون بیشتر گروه‌های تیولی پروتئینی جلوگیری شود، بنابراین افزایش تیول‌های غیر پروتئینی در تیمار با نقره قابل توجه است. به‌علاوه، یون نقره نسبت به نانو نقره، ممکن است به‌عنوان القاکننده قوی‌تری برای اکسیداسیون گروه‌های تیولی عمل نموده و کاهش بیشتر محتوی تیول‌های پروتئینی در تیمارهای یون نقره نسبت به نانو نقره ممکن است به‌همین دلیل باشد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی مهم در ارزیابی مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین محسوب می‌شود. در این تحقیق، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کل جدا کشت‌های تیمار شده با نانو

## منابع

1. Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Prot.* 2012; 35: 64-70.
2. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, et al. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.* 2010; 408(5): 999-1006
3. Mustafa G, Sakata K, Hossain Z, Komatsu S. Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *J. Proteomics.* 2015; 122: 100-18.
4. Bagherzadeh Homae M, Ehsanpour AA. Physiological and biochemical responses of potato (*Solanum tuberosum*) to silver nanoparticles and silver nitrate treatments under *in vitro* conditions. *Ind J Plant Physiol.* 2015; 20(4): 353-9.
5. Sharma P, Bhatt D, Zaidi MGH, Saradhi PP, et al. Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012; 167(8): 2225-33.
6. Bergeson LL. Nanosilver pesticide products: What does the future hold? *Environmental Quality Management.* 2010; 19(4): 73-82.
7. Remédios C, Rosário F, Bastos V. Environmental nanoparticles interactions with plants: morphological, physiological, and genotoxic aspects. *J. Bot.* 2012; 2012: 1-8.
8. Vannini C, Domingo G, Onelli E, De Mattia F, et al. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 2014; 171(13): 1142-8.
9. Patlolla AK, Berry A, May L, Tchounwou PB. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2012; 9(5): 1649-62
10. Qian H, Peng X, Han X, Ren J, et al. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci.* 2013; 25(9): 1947-56.
11. Thiruvengadam M, Gurunathan S, Chung I-M. Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa* L). *Protoplasma.* 2015; 252(4): 1031-46.
12. Møller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007; 58(1): 459-81.
13. Ghezzi P, Bonetto V. Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics.* 2003; 3(7): 1145-53.
14. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2005; 1703(2): 93-109.
15. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962; 15(3): 473-97.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1): 248-54.
17. Chen HY, Cheng H, Bjerknes M. One-Step coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 1993; 212(1): 295-6.
18. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol. Academic Press;* 1994. 233: 357-63.
19. Polge C, Jaquinod M, Holzer F, Bourguignon J, et al. Evidence for the Existence in *Arabidopsis thaliana* of the proteasome proteolytic pathway: activation in response to cadmium. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(51): 35412-24.
20. de Kok LJ, Kuiper PJC. Effect of short-term dark incubation with sulfate, chloride and selenate on the glutathione content of spinach leaf discs. *Physiol. Plant.* 1986; 68(3): 477-82.
21. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant

power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* Academic Press; 1999. 299: 15-27.

22. Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, Del Río LA, et al. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell Environ.* 2002; 25(5): 677-86.

23. Alia N, Sardar K, Said M, Salma K, et al. Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in a controlled environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015; 12(7): 7400.

24. Rastgoo L, Alemzadeh A. Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Aust. J. Crop Sci.* 2011; 5(4): 375-83.

25. Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, et al. More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45(6): 236-7.

26. Tabatabaee Pozveh Z, Razavizadeh R, Rostami F. Changes occurring in canola (*Brassica napus* L.) in response to silver nanoparticles treatment under *in vitro* conditions. *Ind. J. Fund. Appl Life Sci.* 2014; 4(S3): 797-807.

27. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal.* 2005; 24(7): 1311-7.

28. Srivastava S, Dubey RS. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 2011; 64(1): 1-16.

29. Bhoomika K, Pyngrupe S, Dubey RS. Effect of aluminum on protein oxidation, non-protein thiols and protease activity in seedlings of rice cultivars differing in aluminum tolerance. *J. Plant Physiol.* 2014; 171(7): 497-508.

30. Juárez-Maldonado A, Rosales-Velázquez J, Ortega-Ortiz H, Cabrera-De-la-Fuente M, et al. Accumulation of silver nanoparticles and its effect on the antioxidant capacity in *Allium cepa* L. *phyton.* 2013; 82: 91-7.

31. Thwala M, Musee N, Sikhwivhilu L, Wepener V. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant

*Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environ. Sci.: Processes Impacts.* 2013; 15(10): 1830-43.

## **Induction of protein oxidation, protease activity, thiol groups alterations and total antioxidative capacity in potato (*Solanum tuberosum*) by silver nanoparticles and silver nitrate under in vitro culture conditions**

Bagherzadeh Homae M, Ph.D., Ehsanpour AA, Ph.D.\*

- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan 81746-73441,  
Iran

\* Email corresponding author: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

Received: 28 Jun. 2016

Accepted: 11 Sep. 2016

---

### **Abstract**

**Aim:** In the present study, to compare the toxicity and possible oxidative stress that may result from application of silver nanoparticles and silver ions, the impacts of their different concentrations on some biochemical indices related to protein oxidation in potato (*Solanum tuberosum*) were investigated.

**Material and methods:** potato explants with one node were transferred to MS medium containing 0, 2, 10 and 20 mg.L<sup>-1</sup> silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). After four weeks of exposure, in vitro-grown explants were harvested for measurement of various parameters.

**Results:** Total protein content in explants treated with either AgNPs or Ag ions decreased with increase in silver concentration, except in Ag ion treatment at 2 mg.L<sup>-1</sup>, which it increased significantly as compared to control samples. Also, remarkable changes were observed in five bands of protein electrophoresis patterns. The contents of Carbonyl groups were significantly increased relative to control in a dose-dependent manner. In both silver treatments, protein thiols were significantly decreased, while non-protein thiols were amplified. Moreover, explants treated with Ag ions showed higher protease activity and total antioxidant power as compared to AgNPs treated ones.

**Conclusion:** Based on the results, it could be concluded that oxidative damage to explants treated with AgNPs was much more than explants under a similar mass of Ag ions. In addition to the release of silver ions, special effects associated with nanoparticles could be involved in the oxidative stress induced by AgNPs in potato explants.

**Keywords:** Oxidative stress, Protease, Protein oxidation, Silver nanoparticles, Thiol groups