





دانشکده مهندسی کشاورزی

رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

پاسخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره منیزیم اکسید

آمنه یوسفی کیا

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر شاهرخ قرنچیک

استاد مشاور:

دکتر مهدی برادران فیروز آبادی

شهریورماه ۹۳

تقدیم به پدر و مادر عزیزم:

که سخات ناب بارور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت

رسیدن و تمام تجربه‌های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست و وجودم بر

ایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر.

مشکر و قدر دانی:

حمد و سپاس خدایی را که ذات او عین هستی است و هستی او مهر علم و نور است. در دو خالقی را که به من توفیق داد تا در زمره پویندگان علم و معرفت باشم. باشد که این مجموعه هر چند ناچیز؛ قطره ای بردیای بیکران علم یغزاید. بی شک انجام این تحقیق بدون راهنمایی های بزرگوارانی که در طی مسیر مایاری نمودند، میسر نبود. در این راه خود را دیدم که استیادگر تقدیری می دانم که علم و اخلاق را به من آموختند.

در ابتدا از خانواده عزیزم که در تمام محظت یار و یاورم بودند، مشکر و سپاسگذارم. از استاد بزرگوارم جناب دکتر ناصر فرخی و دکتر شایخ قریبیک که با دگر می ها و تشویق هایشان، همواره راهنما و چراغ راه من بوده اند، سپاسگذار و مشکرم. همچنین از جناب آقای دکتر مهدی برادران فیروز آبادی که زحمت راهنمایی و مشاوره این پروژه را کشیدند بسیار مشکرم. همچنین از خانم دکتر مهدیه پارسائیان و جناب آقای دکتر محبتی ممرآبادی نیز برای قبول زحمت داور و تصحیح این پایان نامه بسیار سپاسگذارم.

در نهایت از استادگر تقدیر و مهربانم دکتر احدی مچی که در سخت ترین محظت کارم کنارم بودند و دانش خود را سخاوتمندانه در اختیارم قرار دادند، مشکر و سپاسگذارم. از دوستان عزیزم خانم مهندس اناز فیمبی بایرامی، معصومه کردی، آنا میتا پنچی، مساجوکار، سحر کریمپور، نسیم چنارانی، نرگس طبری، زینب نجفی و آقایان مهندس ملاعباس زاده، مرزنگلات، سعودی و کلیه دوستانی که حریم به نوعی باهدلی و بحکاری یاریم دادند، مشکرم کنم و برایشان بهترین آرزوها را دارم.

آمنه یونسی کیا

شهر یورماه ۹۳

تعهد نامه

اینجانب آمنه یوسفی کیا دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **پاسخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره منیزیم اکسید** تحت راهنمایی دکتر ناصر فرخی متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده:

کشاورزی با چالش‌های گوناگونی از جمله تغییر آب و هوا، شهرنشینی، استفاده پایدار از منابع طبیعی و مسائل زیست محیطی مانند روان آب، تجمع آفت کش‌ها و کودهای شیمیایی مواجه است. در سالهای اخیر، ادعاهایی مبنی بر سودمندی نانوتکنولوژی در کشاورزی بوجود آمده است. در مقابل برخی از گزارشات حاکی از سمیت این ذرات در سیستم‌های زیستی می‌باشد. بر این اساس، ما اثرات نانوذرات منیزیم اکسید را بر روی میزان بیان ژن‌های درگیر در تنش اکسیداتیو در گیاه سویا بررسی کردیم. آزمایش در یک سیستم هیدروپونیک با استفاده از کرت‌های خرد شده در زمان با طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل نانوذرات منیزیم اکسید و بالک آن در دو سطح (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر) و شاهد بدون منیزیم اکسید بود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رونوشت‌های ژن کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در بافت برگ، لپه و ریشه سمیت نانوذرات را بر روی گیاه نشان داد. در غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر نانوذرات منیزیم اکسید بیشترین بیان مشاهده شد. در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر نانوذرات نیز سمیت مشاهده گردید. با این وجود، میزان بیان در این تیمار نسبت به تیمار نانوذرات منیزیم اکسید ۰/۲۵ گرم بر لیتر، کمتر بود. به نظر می‌رسد که تمایل نانوذرات برای متراکم شدن در غلظت‌های بالاتر، موجب سرکوب آثار واقعی آنها شده باشد.

کلمات کلیدی: نانوذرات، تنش اکسیداتیو، اکسیژن فعال

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

مروری بر تأثیر نانوذرات بر مولکول‌های درون سلولی

آمنه یوسفی کیا^۱، ناصر فرخی^{*۲}، مهدی برادران فیروزآبادی^۳

اولین همایش ملی نانو تکنولوژی، مزایا و کاربردها - همدان - دانشکده شهید مفتاح - اسفند ۹۲

فهرست مطالب

| عنوان | صفحه |
|---|------|
| فصل اول: مقدمه و کلیات..... | ۱ |
| ۱-۱- نانوتکنولوژی..... | ۳ |
| ۱-۱-۱- نانوذرات..... | ۳ |
| ۱-۱-۲- طبقه بندی نانوذرات..... | ۴ |
| ۱-۱-۳- منابع نانوذرات..... | ۵ |
| ۱-۱-۴- کاربرد نانوذرات در علوم مختلف..... | ۵ |
| ۱-۱-۵- سم شناسی نانوذرات..... | ۶ |
| ۱-۲- شیمی اکسیژن و استرس اکسیداتیو..... | ۷ |
| ۱-۲-۱- رادیکال‌های آزاد سلول..... | ۷ |
| ۱-۳- مکان‌های تولید اکسیژن فعال در گیاهان..... | ۱۰ |
| ۱-۴- ترکیبات و آنزیم‌های تجزیه کننده اکسیژن فعال در گیاهان..... | ۱۰ |
| ۱-۴-۱- کاتالاز..... | ۱۲ |
| ۱-۴-۲- سوپر اکسید دیسموتاز..... | ۱۳ |
| ۱-۴-۳- پراکسیداز..... | ۱۶ |
| ۱-۴-۴- آسکوربات پراکسیداز..... | ۱۷ |
| ۱-۴-۵- گلووتاتیون ردوکتاز..... | ۱۷ |
| ۱-۵- فواید اکسیژن فعال برای گیاهان..... | ۱۷ |
| ۱-۶- روش‌های اندازه‌گیری تنش اکسیداتیو..... | ۱۸ |
| ۱-۷- منیزیم..... | ۱۹ |

- ۱-۸- مسیره‌های جذب منیزیم به گیاه..... ۱۹
- ۱-۹- مروری بر مطالعات انجام شده بر روی آنزیم‌های مورد مطالعه..... ۲۰

صفحه

عنوان

فصل دوم: مواد و روش‌ها..... ۲۳

- ۲-۱- مواد..... ۲۵
- ۲-۲- تجهیزات..... ۲۵
- ۲-۳- کشت هیدروپونیک سویا..... ۲۶
- ۲-۴- استخراج RNA..... ۲۶
- ۲-۵- تعیین کمیت و کیفیت NA..... ۲۷
- ۲-۶- تیمار DNaseI..... ۲۸
- ۲-۷- ساخت cDNA..... ۲۹
- ۲-۸- طراحی پرایمر..... ۲۹
- ۲-۹- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استاندارد جهت تأیید ساخت cDNA..... ۲۹
- ۲-۱۰- آنالیز آماری داده‌ها..... ۳۰

فصل سوم: نتایج..... ۳۳

- ۳-۱- ژن ریپوزومی 18S..... ۳۴
- ۳-۲- ژن کاتالاز..... ۳۴
- ۳-۲-۱- نتایج تجزیه واریانس در بافت برگ..... ۳۴
- ۳-۲-۲- نتایج تجزیه واریانس در بافت لپه..... ۳۴
- ۳-۲-۳- نتایج تجزیه واریانس در بافت ریشه..... ۳۷
- ۳-۳- پراکسیداز..... ۳۸
- ۳-۳-۱- نتایج تجزیه واریانس در بافت برگ..... ۳۸
- ۳-۳-۲- نتایج تجزیه واریانس در بافت لپه..... ۴۰
- ۳-۳-۳- نتایج تجزیه واریانس در بافت ریشه..... ۴۰

| عنوان | صفحه |
|--|------|
| ۳-۴- ژن سوپر اکسید دیسموتاز آهن..... | ۴۳ |
| ۳-۴-۱- نتایج تجزیه واریانس در بافت برگ..... | ۴۳ |
| ۳-۴-۲- نتایج تجزیه واریانس در بافت لپه..... | ۴۳ |
| ۳-۴-۳- نتایج تجزیه واریانس در بافت ریشه..... | ۴ |
| ۳-۵- مس/رویی سوپر اکسید دیسموتاز..... | ۴۵ |
| ۳-۵-۱- نتایج تجزیه واریانس در بافت برگ..... | ۴۷ |
| ۳-۵-۲- نتایج تجزیه واریانس در بافت لپه..... | ۴۷ |
| ۳-۵-۳- نتایج تجزیه واریانس در بافت ریشه..... | ۴۸ |
| ۳-۶- منگنز سوپر اکسید دیسموتاز..... | ۴۹ |
| ۳-۶-۱- نتایج تجزیه واریانس در بافت برگ..... | ۴۹ |
| ۳-۶-۲- نتایج تجزیه واریانس در بافت لپه..... | ۵۱ |
| ۳-۶-۳- نتایج تجزیه واریانس در بافت ریشه..... | ۵۱ |
| فصل چهارم: بحث و پیشنهادات..... | ۵۵ |
| ضمائم..... | ۶۱ |
| منابع و مأخذ..... | ۷۵ |

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

-
- شکل ۱-۱- انواع اکسیژن فعال و نحوه تشکیل آنها..... ۸
- شکل ۲-۱- واکنش فنتون یا چرخه هابر-وایس..... ۱۱
- شکل ۳-۱- مکان‌های حذف و خنثی‌سازی اکسیژن فعال درون سلول‌های گیاهی..... ۱۴
- شکل ۴-۱- مکان‌های مهم تولید اکسیژن فعال در گیاه..... ۱۵
- شکل ۱-۲- گیاهان سویا در مرحله دوبرگی در محیط کشت هیدروپونیک..... ۲۸

فهرست جداول

| صفحه | عنوان |
|------|-------|
|------|-------|

جدول ۱-۲- ویژگی پرایمر کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و ژن همیشه بیان (18S) به همراه

دمای ذوب (Tm).....۳۱

فصل اول

مقدمه و کلیات

فناوری نانو منجر به گسترش سریع و تولید موادی شده است که احتمالاً به منبعی از نانوذرات مهندسی^۱ شده در طبیعت تبدیل می شوند که اثرات سمّیت احتمالی آنها بر زیست بوم^۲ کمتر شناخته شده است و این فقدان دانش منجر به ترویج بی‌رویه فناوری نانو در کشورهایی چون ایران شده است. درک صحیح خصوصیات سطحی نانوذرات در حرکت آنها در سیستم‌های آبی و خشکی و واکنش آنها با قارچ‌ها، باکتری‌ها، گیاهان و جلبک‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. دیواره و غشای پلاسمایی این سلول‌ها، محل اولیه برهمکنش و ورود نانوذرات را تشکیل می‌دهد که چگونگی عبور و مرور و مکانیسم‌های کنترلی عبور و مرور نانوذرات از این مرزها هنوز به درستی درک نشده است. در داخل سلول، نانوذرات ممکن است به طور مستقیم موجب تحریک تغییرات غشا و سایر ساختارهای سلولی و مولکولی و همچنین مکانیسم‌های دفاعی شوند. اثرات غیر مستقیم نانوذرات به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آنها بستگی دارد و ممکن است شامل محدودیت‌های فیزیکی (اثرات انسدادی) و یا تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن باشد. در این راستا، در مورد تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن توسط نانوذرات سه فرضیه اصلی وجود دارد که به موجب آن تولید درون سلولی و برون سلولی انواع اکسیژن فعال و به میزان کمتر نیتروژن فعال در سلول افزایش می‌یابد که این مولکول‌ها توانایی آسیب رسانی به سیستم‌های زیستی و دفاعی (آنتی اکسیدانی) طبیعی را دارند. نانوذرات ممکن است به طور ذاتی فعالیت اکسایشی داشته باشند یا ویژگی‌های ظاهری که به موجب آن باعث کاتالیز واکنش‌های اکسایشی شوند و در نهایت موجب تنش اکسیداتیو و تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS^۳) شوند. دیگر اینکه نانوذرات ممکن است از لحاظ زیستی پایدار باشند. به این ترتیب که وقتی وارد چرخه غذایی و همچنین محیط زیست می‌شوند تجزیه نمی‌شوند و در طول زمان نیز دستخوش تغییر نمی‌شوند و موجب التهابات موضعی در محل جذب می‌شوند. نانوذرات همچنین ممکن است وارد سلول شوند و با تولید ROS به اجزاء سلولی آسیب برسانند. ROS می‌تواند با اجزاء سلولی واکنش بدهد و موجب شکستگی رشته DNA، اکسیداسیون پورین‌ها، تغییرات پروتئینی و اتصال متقابل اسید نوکلئیک-پروتئین شود. برای بررسی

1- Engineering nanoparticles

2- Ecotoxic

3- Reactive Oxygen Species

تنش اکسیداتیو می توان میزان بیان ژن های درگیر در مسیر خنثی سازی این مولکول ها را اندازه گیری نمود. در این پایان نامه سعی بر این است که با اندازه گیری میزان بیان برخی از ژن های درگیر در خنثی سازی گونه های اکسیژن واکنش گر شامل کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز، تأثیر سمیت احتمالی نانوذرات منیزیم اکسید را بر روی گیاه سویا بررسی نماییم. در این فصل در مورد نانوتکنولوژی، نانوذرات (طبقه بندی، منابع، کاربرد در علوم مختلف)، سم شناسی نانو، شیمی اکسیژن و استرس اکسیداتیو، مکان های تولید ROS در گیاهان، ترکیبات و آنزیم های تجزیه کننده ROS در گیاهان (به ویژه آنزیم های مورد مطالعه در این پایان نامه شامل کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز) و روش های اندازه گیری تنش اکسیداتیو صحبت خواهیم کرد.

۱-۱. نانوتکنولوژی

پیشوند نانو از کلمه یونانی (Nanos) به معنی (کوتوله) مشتق شده است [۱]. اولین جرقه فناوری نانو (البته در آن زمان به این نام شناخته نشده بود) در سال ۱۹۵۹ زده شد. در این سال ریچارد فاینمن طی سخنرانی با عنوان "فضای زیادی در سطوح پایین وجود دارد" ایده فناوری نانو را مطرح ساخت. وی این نظریه را ارائه داد که در آینده ای نزدیک می توانیم مولکول ها و اتم ها را به صورت مستقیم دستکاری کنیم. واژه ی فناوری نانو اولین بار توسط نورتاینگوچی استاد علوم توکیو (۱۹۷۴) بر زبان ها جاری شد [۲]. فناوری نانو به عنوان علمی تعریف می شود که با مواد، سیستم و فرآیندهای در مقیاس نانو یا کوچکتر مرتبط است [۳]. این دانش، ابزارها و تکنیک هایی برای مطالعات زیستی را فراهم آورده است. با این وجود، ضروری است که از آثار سوء احتمالی کاربرد نانوذرات با اجزاء سلولی، سلول، بافت و در نهایت جاندار اطلاع حاصل نماییم و از آثار احتمالی جبران ناپذیر آن خود و دیگران را آگاه سازیم از اینرو اگر ضرورت داشته باشد باید سیستم های هوشمند ردیابی و کنترل^۱ در حین بکارگیری این ترکیبات لحاظ گردد [۴].

۱-۱-۱. نانوذرات

نانوذرات مهندسی شده یا صنعتی به شکل ذرات، فیبر، تیوب، میله و غیره و ترکیبات متنوعی از این دست، موادی هستند که در یکی از ابعاد خود قطری کمتر از صد نانومتر دارند. به خاطر کاهش اندازه و نسبت سطح به حجم بالا، این مواد فعالیت سطحی بالاتر، خواص فیزیکی (مانند کشش سطحی بیشتر)، شیمیایی (مانند چرخه احیاکنندگی پایدار)، مکانیکی، الکترونیکی (مانند نیمه رسانایی) و زیستی متفاوتی نسبت به مواد مشابه خود در ابعاد مختلف میکرو و ماکرو نشان می دهند و از نظر علمی و صنعتی میل زیادی برای استفاده از این مواد در رشته های مختلف مانند مهندسی، کشاورزی و پزشکی وجود دارد [۵].

نانوذرات به دو دلیل اثرات سطحی (به دلیل قرار گرفتن تعداد اتم های بیشتر در سطح) و اثرات کوانتومی (مواد در این بعد به بعد اتم نزدیک می شوند و مانند اتم ها می توانند آخرین الکترون در لایه الکترونی خود را به راحتی از دست بدهند یا الکترون در این لایه بپذیرند) به طور قابل توجهی متفاوت از مواد بالک^۱ خود عمل می نمایند که از اینرو ویژگی های شیمیایی، نوری^۲، الکتریکی و مغناطیسی مواد را تحت تأثیر قرار می دهند. برای درک بهتر، به ارائه مثالی می پردازیم. یک میکروذره کربن با قطر ۶۰ میکرومتر، جرمی معادل ۰/۳ میکروگرم و مساحت سطحی ۰/۰۱ میلی متر مربع دارد اما همان جرم کربن به شکل نانوذره، دارای مساحت سطحی ۱۱/۳ میلی متر مربع است. نسبت سطح به جرم برای نانو ذره ای به قطر ۶۰ نانومتر هزار برابر بیشتر از میکرو ذره ای به قطر ۶۰ میکرومتر است [۱].

۱-۱-۲. طبقه بندی نانوذرات

مورفولوژی و سایر ویژگی های نانوذرات نقش مهمی در سمیت آن ها بازی می کند. نانوذرات را براساس ابعاد (یک بعدی، دو بعدی و سه بعدی)، شکل (صاف، کروی)، نسبت سطح، ترکیب (به این معنی که نانوذرات از یک ماده تشکیل شده اند یا ترکیبی از مواد مختلف هستند)، یکنواختی و تراکم (این ویژگی به خواص الکترومغناطیسی و شیمیایی نانوذرات بستگی دارد و موجب می شود نانوذرات به صورت ذرات معلق، کلوئید، سوسپانسیون و یا به صورت متراکم و به هم انباشته دیده شوند) طبقه بندی می کنند [۱].

1- Balk material
2- Opticy

۳-۱-۱. منابع نانوذرات

هر شخصی در زندگی روزمره خود در معرض نانوذرات می‌باشد. در حقیقت هر موجود زنده روی کره زمین به طور مداوم با موادی در ابعاد نانو برخورد دارد. از نانوذرات متکامل می‌توان به ویروس‌ها که حاوی اسید-نوکلئیک هستند اشاره کرد که به کمک آن فرآیندهای زیستی را مختل می‌نمایند و همچنین امکان بهره‌وری از فرآیندهای سلول میزبان برای تکثیر خود را به کمک همین بیونانومولکول‌ها (یعنی اسیدهای نوکلئیک) می‌یابند [۶]. نانوذرات دارای دو منشأ طبیعی و صنعتی می‌باشند. نانوذرات طبیعی، از آغاز پیدایش زمین وجود داشته‌اند و هم اکنون نیز در محیط طبیعی یافت می‌شوند. از این نوع نانوذرات می‌توان به نانوذرات حاصل از گرد و غبار آتشفشان‌ها، مواد کائوچویی و مواد معدنی اشاره کرد. نانوذرات صنعتی، که یا توسط فعالیت‌های بشر به محیط زیست رها می‌شوند (مانند نانوذرات حاصل از سوخت‌های دیزلی و زباله‌های شهری و صنعتی) و یا توسط بشر برای مصارف گوناگون تولید می‌شوند (مانند نانو ذرات، نانولوله‌ها و نانوسیم‌ها) [۷].

۴-۱-۱. کاربرد نانوذرات در علوم مختلف

نانوتکنولوژی به عنوان فناوری کاربردی در دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است. کاربرد این تکنولوژی در حوزه‌های مختلف متفاوت است. این فناوری با تولید محصولات متنوع در حوزه‌های شیمی، انرژی و محیط زیست کاربرد فراوانی دارد. تقسیم‌بندی فناوری نانو در شاخه‌ها و رشته‌های مختلف بیشتر مربوط به کاربرد محصولات این فناوری در هر رشته می‌باشد. به طور کلی فناوری نانو برای تولید مواد با بهره بالا عبارت از ایجاد شرایط کاملاً کنترل شده و دقیق و استفاده از این شرایط برای چیدمان منظم اتم‌ها و تولید مواد در مقیاس نانو می‌باشد [۸]. برخی از کاربردهای نانوتکنولوژی در علوم کشاورزی در ادامه آورده می‌شود. از جمله کاربردهای نانوتکنولوژی در کشاورزی می‌توان به کاربرد نانوذرات مغناطیسی، نانوفتوکاتالیست‌ها، نانوبارکدها، نانوبیوسنسورها، نانوکودها و نانوکپسول‌های حاوی مواد مغذی و جلوگیری از آلودگی آب و هدر رفت نهاده‌ها، انتقال مواد ژنتیکی به درون گیاهان به وسیله نانوذرات، استفاده از نانوکامپوزیت‌ها برای ایجاد پایداری خاک، نانو آفت‌کش‌ها و نانو علف‌کش‌ها اشاره کرد [۹، ۱۰].

۵-۱-۱. سم شناسی نانو

ذرات نانو و فناوری نانو علاوه بر مفید بودن می‌توانند دارای خطرهای احتمالی نیز باشند. بنابراین باید مسائل مرتبط با ایمنی و خطرات احتمالی همراه با این روش‌های جدید را در نظر گرفت. به عنوان مثال ذرات نانو ممکن است سرعت جهش باکتری‌ها را افزایش دهند و تهدیدی بالقوه برای محیط زیست و انسان باشند. با وجود اینکه فناوری نانو محصولات موجود را مؤثرتر و کارآمدتر می‌نماید، اندازه این ذرات که جزو خواص مهم آن‌ها به شمار می‌رود می‌تواند سلامتی و محیط زیست را تهدید نماید. این ذرات از گرده‌های گل گیاهان و مواد حساسیت‌زای معمولی هم کوچکتر هستند و می‌توانند تولید حساسیت نمایند. این ذرات می‌توانند به سیستم ایمنی و دفاعی بدن موجودات زنده و انسان حمله کنند. بعضی از این ذرات می‌توانند پس از تنفس به کیسه‌های هوایی ریه آسیب برسانند [۱۱].

همچنین گرایش نانوذرات برای عبور از موانع سلولی و تعامل با ساختارهای درون سلولی با توجه به اندازه‌ی کوچک و واکنش سطحی بالا، موجب تأثیر بر پتانسیل سلولی و سمیت ژنتیکی با ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد [۱۲]. توانایی نانوذرات در تشکیل مستقیم و غیر مستقیم گونه‌های واکنشگر اکسیژن از مراحل اولیه در مجموعه سمیت ژنی^۱ آنها می‌باشد. استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات منجر به سمیت بالقوه سیستم‌های زیستی می‌گردد. اعتقاد بر این است که ابعاد، دز و مدت زمان تماس با نانوذرات از عوامل مهم در تعیین اثرات مضر و سمیت نانوذرات می‌باشند [۱۳] اما سوالی که پیش می‌آید این است که اگر نانوذرات به مثابه یک تنش عمل نمایند، چگونه می‌توان این تنش را در سلول ردیابی کرد. به طور معمول و در شرایط غیر تنش، سلول در تعادل^۲ به سر می‌برد که در این شرایط نیز مقادیر انبوهی رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شوند و کمابیش همین میزان از سطح سلول جمع‌آوری می‌گردد تا این مولکول‌های بیش فعال صرفاً در فرآیندهای انتقال الکترون و پیام‌دهی سلولی به نحوی مؤثر و غیر آسیب‌زا عمل نمایند این در حالی است که در شرایط تنش این تعادل برهم می‌خورد و میزان تولید بر جمع‌آوری پیشی می‌گیرد و

1- Genotoxic

2- Homeostasis

حاصل آن آسیب‌های سلولی خواهد بود. حال اگر بخواهیم در گام اول و به طور نسبتاً مستقیم تأثیر عامل بیرونی (محیط یا تیمار آزمایشی) را مورد بررسی قرار دهیم می‌توان به مطالعه بیان ژن‌ها و پروتئین‌هایی پردازیم که در شکل‌گیری و جمع‌آوری^۱ مولکول‌های ROS دخیل هستند. از این رو به اختصار به معرفی مولکول‌های ROS، شکل‌گیری و جمع‌آوری آن‌ها می‌پردازیم.

۱-۲. شیمی اکسیژن و استرس اکسیداتیو

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، اصطلاحی کلی برای توصیف انواع مختلفی از مولکول‌ها و رادیکال‌های آزاد (گونه‌های شیمیایی با یک الکترون جفت نشده) مشتق از مولکول اکسیژن است. در حالت پایه، اکسیژن مولکولی به صورت دو رادیکالی است که شامل دو الکترون جفت نشده در لایه بیرونی خود می‌باشد. از آنجایی که این دو الکترون جفت نشده چرخش یکسانی دارند، اکسیژن به حالت طبیعی می‌تواند با یک الکترون خود وارد واکنش شود بنابراین اکسیژن با دو الکترون در باند شیمیایی زیاد فعال نیست. به عبارت دیگر، اگر یکی از دو الکترون جفت نشده تهییج شود و چرخش آن عوض شود گونه‌های اکسیژن فعال بدست می‌آیند که قدرت اکسیدکنندگی بالایی دارند و می‌توانند به سرعت با جفت الکترون‌های دیگر واکنش بدهند مخصوصاً آن‌هایی که دو پیوند دارند [۱۴]. از انواع اکسیژن فعال می‌توان به آنیون سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال هیدروپروکسیل اشاره نمود که در ادامه به معرفی آنها می‌پردازیم (شکل ۱-۱).

۱-۲-۱. رادیکال‌های آزاد سلول

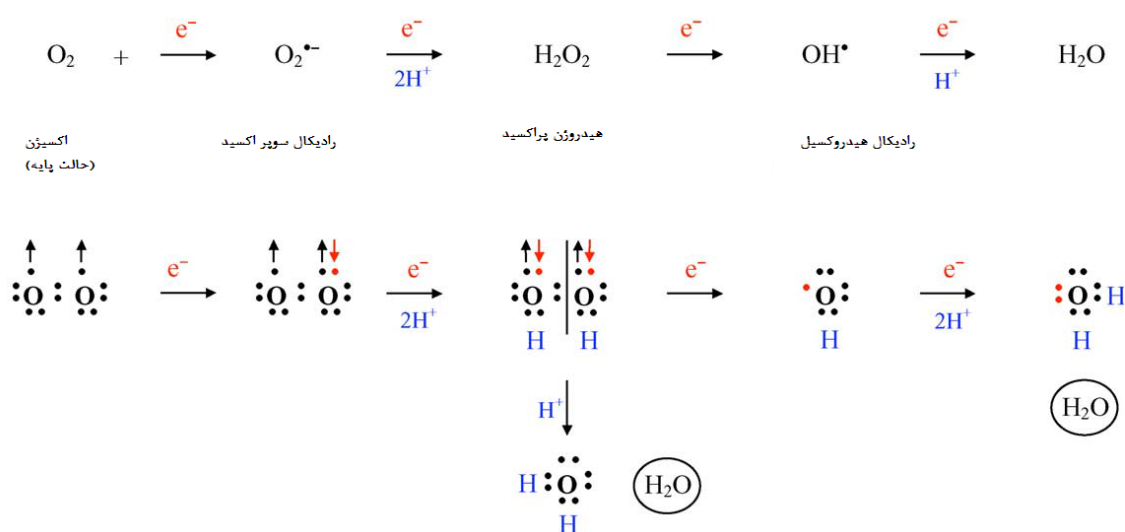
احیا اکسیژن توسط یک الکترون موجب تولید واسطه‌های نسبتاً پایدار موسوم به آنیون سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$)، می‌گردد که منشأ تولید اکثر گونه‌های اکسیژن فعال است و به عنوان واسطه در واکنش‌های اکسیداتیو زنجیره‌ای عمل می‌کند. دیسموتاسیون^{۳۲} آنیون سوپر اکسید (چه به صورت خودبه‌خودی و چه حاصل از

1- Scavenging

۲- دیسموتاسیون: واکنشی که در آن فرم احیا و اکسید یک مولکول شیمیایی هم‌زمان تولید شوند.

3- Dismutation

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز^(۱) موجب تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود که به نوبه خود ممکن است به طور کامل به آب کاهش یابد و یا به صورت جزئی رادیکال هیدروکسیل (OH^\bullet)، آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی، را تولید کند. همچنین آنیون سوپر اکسید ممکن است با دیگر رادیکال‌های آزاد از جمله نیتریک اکسید (NO^\bullet) واکنش بدهد که این واکنش توسط سرعت انتشار هر دو رادیکال کنترل می‌شود. محصول این واکنش پروکسی‌نیتريت است که پروکسی‌نیتريت ($ONOO^-$) نیز اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد [۱۴].



شکل ۱-۱: انواع اکسیژن فعال و نحوه تشکیل آن‌ها [۱۵].

آنیون سوپر اکسید، سبب اکسیده شدن اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین و هیستیدین می‌گردد. تریپتوفان به عنوان پیش‌ساز بیوسنتز هورمون اکسین، ملاتونین و اسید نیکوتینیک می‌باشد [۱۶]. فرم آمیدی اسید نیکوتینیک در ساختار کوانزیم‌های NAD^+ و $NADP^+$ به کار می‌رود [۱۷]. دی نوکلئوتیدهای مذکور در راه‌اندازی زنجیره انتقال الکترون میتوکندری، کلروپلاست [۱۸، ۱۹] و در برخی از چرخه‌های دفاعی سلول [۲۰] موثر هستند. ملاتونین نیز ترکیب کارآمدی است که نقش محافظت از ساختار DNA و غشاهای آن را در مقابل آسیب‌های ناشی از انواع اکسیژن فعال بر عهده دارد [۲۱]. به علاوه

آنیون سوپر اکسید موجب غیر فعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، آنزیم‌های مهم جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن خواهد شد [۱۷]. افزون بر این آنیون سوپر اکسید موجب غیر فعال شدن برخی از آنزیم‌های دخیل در تولید انرژی و متابولیسم اسیدهای آمینه می‌گردد. این آنزیم‌ها محتوی کلاسترهای آهن-سولفور می‌باشند که در نتیجه‌ی اکسیداسیون کلاسترها، آهن موجود در کلاسترها آزاد شده و باعث غیر فعال شدن آنها می‌شود [۲۲]. متیونین نخستین اسید آمینه‌ای است که در بیوسنتز پروتئین به کار می‌رود و اکسیداسیون این اسید آمینه می‌تواند سنتز پروتئین را با مشکل مواجه کند [۲۳].

پراکسید هیدروژن، بیش از حد برای تمام اجزای سلولی مضر است، بنابراین حذف سریع و کارآمد آن برای موجودات هوازی از اهمیت بالایی برخوردار است. پراکسید هیدروژن واکنش‌دهی ملایمی دارد (نسبت به سایر گونه‌های واکنشگر اکسیژن دیرتر وارد واکنش با مواد اطراف خود می‌شود) و نیمه عمر نسبتاً بالایی دارد (در غیاب کاتالیزور سرعت تجزیه آن کند است) که می‌تواند دورتر از محل تولید خود اثرگذار باشد. این گونه اکسیژن فعال با اکسیداسیون گروه تیولی آنزیم‌ها (-SH) آنها را غیر فعال می‌کند. به عنوان مثال آنزیم‌های چرخه کالوین مانند ریبولوز بی فسفات کیناز، بی فسفاتازها، $Cu/ZnSOD^1$ و $FeSOD^2$ توسط پراکسید هیدروژن غیر فعال می‌شوند. پراکسید هیدروژن بوسیله کاتالاز و پراکسیداز تخریب می‌شود، کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند و پراکسیداز با استفاده از ترکیبات کمکی مانند ترکیبات فنولیک یا سایر ترکیبات آنتی اکسیدان موجب تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود [۲۴].

رادیکال هیدروکسیل، فعال‌ترین نوع اکسیژن فعال است که از پراکسید هیدروژن توسط چرخه هابر-وایس، یا واکنش فنتون (شکل ۱-۲) در حضور فلزات (به عنوان کاتالیزور) تولید می‌شود این رادیکال می‌تواند با تمام مولکول‌های زیستی واکنش بدهد و از آنجایی که در سلول هیچ مکانیسم آنزیمی شناخته

1- Copper/Zinc Super Oxide Dimutase
2- Iron Super Oxide Dimutase

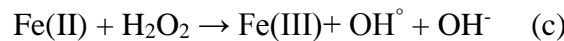
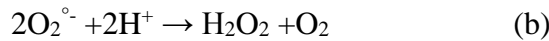
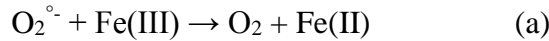
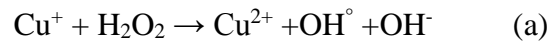
شده‌ای وجود ندارد که این نوع اکسیژن فعال را از بین ببرد، تولید این نوع اکسیژن فعال به مرگ سلول می‌انجامد [۲۴]. یکی از اقدامات سلول برای حفاظت خود در برابر این نوع اکسیژن فعال این است که از تشکیل آن جلوگیری به عمل آورد. آنزیم‌های درون سلولی منجمله کاتالاز، پراکسیداز (H_2O_2) و سوپراکسید دیسموتاز ($O_2^{\cdot-}$) با خنثی کردن سایر اکسیژن‌های فعال که در شکل‌گیری این نوع اکسیژن فعال مؤثرند، مانع از تشکیل آن می‌شوند [۲۵].

رادیکال هیدروپروکسیل که از پروتونه شدن آنیون سوپر اکسید در محیط‌های آبی تولید می‌شود، می‌تواند از غشاهای زیستی عبور کند و اتم‌های هیدروژن را از اسیدهای چرب اشباع نشده و لیپید هیدروپراکسیدها بگیرد و موجب اتواکسیداسیون لیپیدی شود [۲۴]. اتواکسیداسیون لیپیدها مربوط به اسیدهای چرب غیر اشباع است که در اثر عواملی مثل حرارت، نور، اکسیژن و یون‌های فلزات، تولید هیدرو پروکسیل می‌نماید و این ترکیبات در مراحل بعدی تجزیه و تبدیل به آلدئیدها، کتون‌ها، اسیدها و الکل‌ها می‌شوند [۲۶].

۳-۱. مکان‌های تولید ROS در گیاهان

گونه‌های اکسیژن فعال گیاهی از طریق زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست، پراکسیدازهای چسبیده به دیواره سلولی و اکسیدازهای موجود در فضای آپوپلاستی ($NADPH$ اکسیداز، $NADH$ اکسیداز، زانتین اکسیداز، لیپواکسیژناز، گلیکولات اکسیداز و آمین اکسیداز) و کلروفیل برانگیخته، در قسمت‌های مختلف سلول تولید می‌شوند [۲۷]. گونه‌های اکسیژن فعال علاوه بر میتوکندری، کلروپلاست و پراکسی‌زوم، در غشا پلاسمایی، دیواره سلولی (شکل ۱-۳) فضای آپوپلاست (شکل ۱-۴) و سیتوپلاسم نیز تولید می‌شوند [۲۸].

۴-۱. ترکیبات و آنزیم‌های تجزیه کننده ROS در گیاهان:



شکل ۱-۲: واکنش فنتون یا چرخه هابر-وایس. در طی این چرخه رادیکال هیدروکسیل می‌تواند از پراکسید هیدروژن و در حضور فلزات کاتالیزور مانند مس یا آهن تولید شود. (a) پراکسید هیدروژن می‌تواند توسط مس یک بار مثبت (کوپروس^۱) احیا شود و رادیکال هیدروکسیل را تولید نماید این واکنش در یک مرحله صورت می‌پذیرد. پراکسید هیدروژن می‌تواند توسط آهن دو بار مثبت (فرو^۲) احیا شود و رادیکال هیدروکسیل را تولید نماید (a) آنیون سوپر اکسید با آهن سه بار مثبت (فریک^۳) واکنش می‌دهد و آهن دوبار مثبت و اکسیژن تولید می‌نماید. (b) آنیون سوپر اکسید می‌تواند با پروتون‌ها واکنش دهد و پراکسید هیدروژن تولید نماید. (c) آهن دو بار مثبت توسط پراکسید هیدروژن اکسید می‌شود و رادیکال هیدروکسیل و آهن سه بار مثبت تولید می‌کند [۱۴].

به دلیل سمیت گونه‌های اکسیژن فعال و همچنین نقش مهم آن‌ها در علامت‌دهی باید میزان ROS در سلول‌ها به کمک شبکه‌ای از ژن‌ها موسوم به شبکه ژنی ROS^۴ تحت کنترل دربیاید. در گیاه گلدار آرابیدوبسیس تالیاننا^۵، متجاوز از ۱۵۰ ژن در شبکه ژنی ROS وجود دارند که به تنظیم نقش سطح ROS در سلول‌ها می‌پردازند. شبکه ROS بسیار پویا و دارای ژن‌های بسیار، با فعالیت مشابه هستند که در صورت ضرورت یکی جایگزین دیگری می‌شود تا در نهایت پروتئین‌های جمع‌آوری کننده و تولید کننده ROS را کد کند [۲۹].

گیاهان سیستم دفاعی گسترش یافته‌ای در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال دارند. این سیستم شامل روش‌های محدودسازی تولید و همچنین حذف سازمان یافته آن می‌باشد. گیاهان برای حذف اکسیژن فعال از ترکیبات و آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می‌نمایند.

1- Coprus
2- Ferro
3- Ferric
4- ROS gene network
5- *Arabidopsis thaliana*

در سلول‌های گیاه آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی را عمدتاً گلوکاتینون، آسکوربات، توکوفرول، پرولین، بتائین و کاروتنوئیدها تشکیل می‌دهند و سایر ترکیباتی که ظرفیت احیاکنندگی سلول را بالا می‌برند و این آنتی-اکسیدان‌ها از طریق اکسیداسیون-احیا (ردوکس^۱) در پیام‌دهی سلول، سیستم دفاعی، کوفاکتور آنزیم‌ها و رشد و نمو نقش دارند.

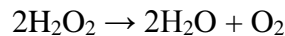
آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز [۳۱] در بخش‌های مختلف سلول مانند میتوکندری، کلروپلاست، دیواره سلولی، غشای پلاسمایی و آپوپلاست دیده می‌شوند که به تجزیه انواع اکسیژن فعال می‌پردازند. برخی از این آنزیم‌ها مانند آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز برای تجزیه انواع اکسیژن فعال نیاز به ترکیبات غیر آنزیمی مانند NA(D)PH، آسکوربات و ترکیبات فنولی به عنوان دهنده الکترون دارند. در این مطالعه در خصوص برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه شامل کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز که سطح بیان آنها در قالب mRNA مورد مطالعه قرار گرفت، صحبت خواهد شد.

۱-۴-۱. کاتالاز

سه خانواده پروتئینی آنزیم‌های هم دار، کاتالاز (هیدروپروکسیداز)، کاتالاز-پروکسیدازها و منگنز-کاتالازها در واکنش تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن در سلول نقش دارند. کاتالازها در یوباکترها، آرکئو-باکترها، آغازیان^۲، قارچها، گیاهان و حیوانات به وفور یافت می‌شوند درحالی که کاتالاز-پروکسیدازها در گیاهان و جانوران یافت نمی‌شوند و این نوع آنزیم‌ها هم فعالیت کاتالازی و هم فعالیت پروکسیدازی از خود نشان می‌دهند. گروه سوم کاتالازها، خانواده کوچکی در باکتری‌ها هستند که دارای دو جایگاه فعال برای منگنز می‌باشند و از اینرو منگنز-کاتالاز نامیده می‌شوند [۳۲].

واکنش کلی که توسط کاتالاز کاتالیز می‌شود شامل تجزیه دو مولکول پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن است.

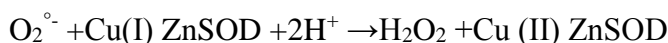
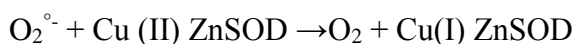
1- Redox
2- Protista



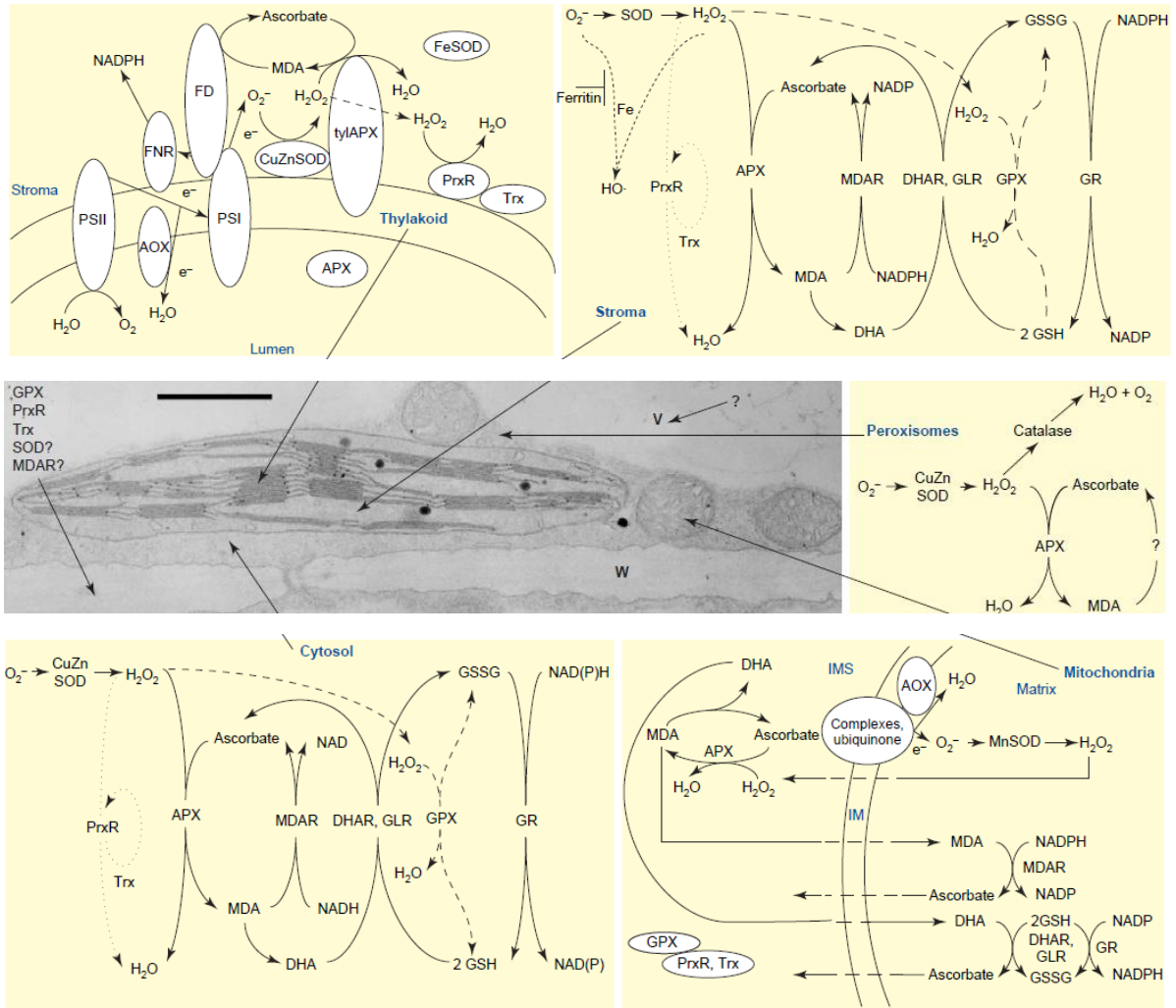
این واکنش به ظاهر ساده می‌تواند به صورت دو مرحله‌ای انجام شود، اما اتفاقی که در هر یک از این مراحل رخ می‌دهد به نوع کاتالاز بستگی دارد [۳۲].

۲-۴-۱. سوپر اکسید دیسموتاز

مس، منگنز و آهن، در جایگاه فعال آنزیم سوپراکسید دیسموتاز قرار دارند و دیسموتاسیون در این جایگاه رخ می‌دهد. برای نمونه دیسموتاسیون Cu/ZnSOD در دو مرحله از دست‌دهی الکترون سوپراکسید دیسموتاز و تبدیل مس به فرم کوپریک (اکسید) و گرفتن الکترون توسط سوپراکسید دیسموتاز و احیا آن به فرم کوپروس است.



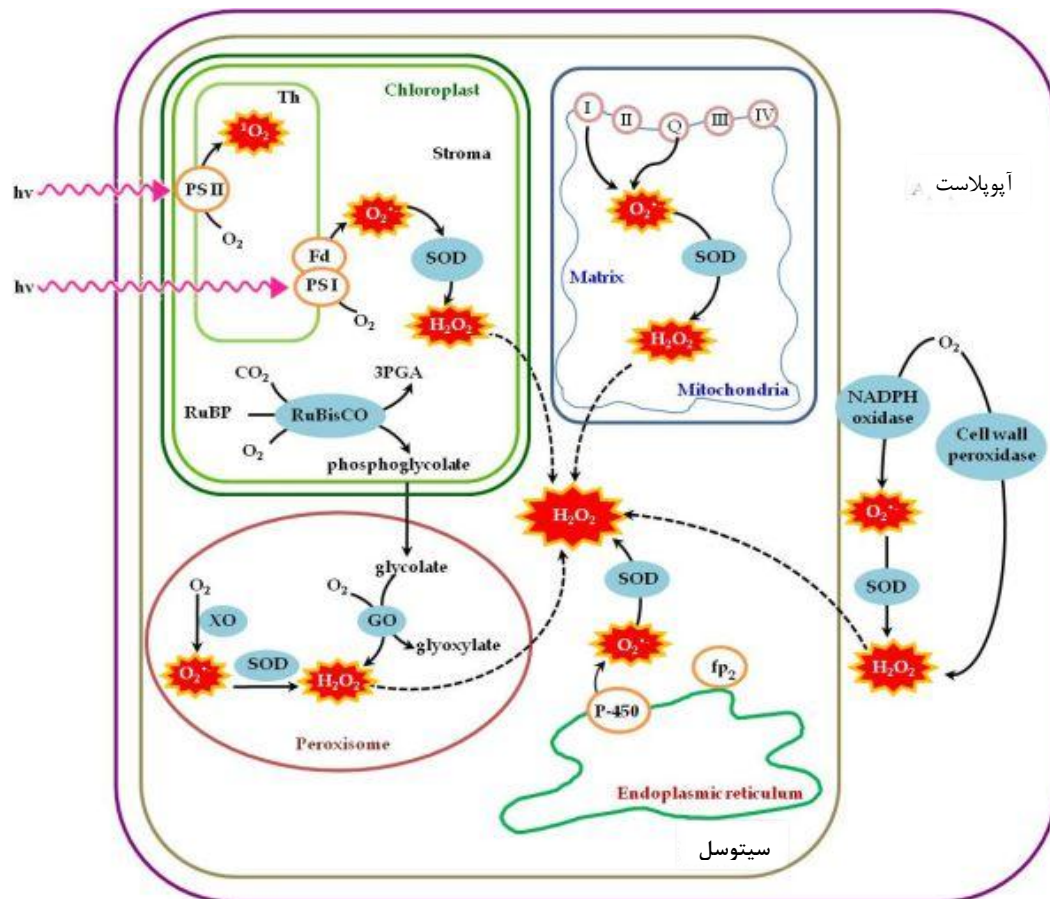
سوپراکسید دیسموتاز به چهار شکل FeSOD، MnSOD، Cu/ZnSOD و NiSOD (در گیاهان وجود ندارد) دیده می‌شود [۳۳]. در یوکاریوت‌ها MnSOD در ماتریکس میتوکندری یافت می‌شود [۳۴]. در جلبک کلامیدوموناس رینهاردی (*Chlamydomonas reinhardtii*)، MnSOD در کلروپلاست نیز وجود دارد اما در گیاهان عالی این نوع سوپراکسید دیسموتاز در پلاستیدها یافت نمی‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که در طول تکامل گیاهان MnSOD های با منشأ باکتریایی را از دست داده‌اند [۳۵]. FeSOD در اغلب پروکاریوت‌ها، به خصوص در سیانوباکترها به وفور یافت می‌شود [۳۶]. در گیاهان FeSOD اغلب در پلاستیدها گزارش شده است. با این حال گزارشات اخیر حاکی از وجود برخی ایزوفرم‌های FeSOD در سیتوسل نیز می‌باشد [۳۷]. Cu/ZnSOD در برخی باکتری‌ها و در سیتوسل یوکاریوت‌هایی مانند مخمرها، پستانداران و گیاهان گزارش شده است [۳۸]. در گیاهان، Cu/ZnSOD، در پلاستیدها و پراکسی‌زوم‌ها گزارش شده است [۳۹]. Cu/ZnSOD در بیشتر یوکاریوت‌های ابتدایی فتوسنتز کننده مانند جلبک کلامیدوموناس رینهاردی و خزه‌های *Barbula unguiculata* یافت نمی‌شود [۴۰].



شکل ۱-۳: مکان‌های حذف و خنثی‌سازی گونه‌های واکنشگر اکسیژن درون سلول گیاهی. تصویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به سلول گیاه برای مشخص نمودن حجم نسبی بخش‌های مختلف سلولی و قسمت‌هایی که به طور فیزیکی از آن‌ها جدا شده‌اند (سمت چپ تصویر میانی). مسیرهای آنزیمی مسئول در تجزیه و خنثی‌سازی ROS نشان داده شده‌اند. چرخه آب-آب- O_2^- و H_2O_2 را تجزیه می‌کند و آلترناتیو اکسیداز (AOX) سرعت تولید O_2^- را در لومن تیلاکوئید کاهش می‌دهد (سمت چپ تصویر بالایی)؛ در برخی از گیاهان سوپر اکسید دیسموتاز آهن‌دار (Fe SOD) ممکن است با سوپر اکسید دیسموتاز مس/روی (Cu/Zn SOD) درون کلروپلاست جایگزین شود. ROS هایی که از این چرخه فرار می‌کنند و یا در استروما تولید می‌شوند به وسیله آنزیم SOD یا چرخه گلوکوتایون-آسکوربات تجزیه می‌شوند. پروکسی‌ردوکسین (Pex R) و گلوکوتایون پراکسیداز (GPX) نیز در خنثی‌سازی H_2O_2 در استروما شرکت می‌کنند (بالا تصویر سمت راست). در پراکسی‌زومها ROS بر اثر فعالیت‌هایی مانند تنفس نوری، اکسیداسیون اسیدهای چرب یا سایر واکنش‌هایی که به وسیله کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) انجام می‌شود، تولید می‌شوند (سمت راست تصویر وسطی). در ابتدا، سیتوسل حاوی همان مجموعه آنزیم‌هایی است که در استرومای کلروپلاست وجود دارد (سمت چپ، تصویر پایینی). با این وجود، این آنزیم‌ها به وسیله ژن‌های متفاوتی رمز-گذاری می‌شوند و فعالیت گسترده کلات آهن در سیتوسل مانع از تشکیل رادیکال هیدروکسیل در سیتوسل می‌شود و هنوز مکانیسم عمل آن به خوبی شناخته نشده است. ترکیبات آنزیمی مسئول تجزیه ROS در دیواره سلولی (W) و آپوپلاست تا حدودی شناخته شده‌اند و مسیرهای خنثی‌سازی ROS در واکوئل (V) هنوز شناخته نشده است. آنزیم‌های متصل به دیواره با رنگ سفید متمایز شده‌اند، مسیر گلوکوتایون پراکسیداز با خطوط فاصله‌دار و مسیر پروکسی‌ردوکسین

پایخ مولکولی گیاه سویا در تیمار بانانوذه نیتروژن اکسید-آزمی یوسخی کیا

با نقطه چین در استروما و سیتوسل مشخص شده اند. با وجود اینکه مسیرهای مختلف در بخش‌های مختلف عمدتاً از هم جدا هستند، H_2O_2 به راحتی می‌تواند از طریق غشا پلاسمایی به سایر بخش‌ها منتشر شود و آنتی اکسیدان‌هایی مانند گلوکاتایون و اسید آسکوربیک (اکسید شده یا احیا شده) نیز می‌توانند بین بخش‌های مختلف جابه جا شوند. دی هیدروآسکوربات (DHA)، دی هیدرو آسکوربات ردوکتاز (DHAR)، فردوکسین (FD)، فردوکسین NADPH ردوکتاز (FNR)، گلوکاتردوکسین (GLR)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)؛ گلوکاتایون احیا شده (GSH)، گلوکاتایون اکسید شده (GSSG)؛ غشا داخلی (IM) فضای غشا داخلی (IMS)، مونو دهیدرو اسکوربات (MDA)، مونو دهیدرواسکوربات ردوکتاز (MDAR)، فتوسیستم I (PSI)، فتوسیستم II (PSII)، تیوردوکسین (Trx)، تیلاکوئید (tyl). [۲۹]



شکل ۱-۴: مکان‌های مهم تولید ROS در سلول گیاه را نشان می‌دهد. پراکسیدازهای چسبیده به دیواره سلولی موجب تولید پراکسید هیدروژن در فضای آپوپلاستی هنگام تشخیص حمله پاتوژن‌ها می‌شوند. همچنین آمین اکسیداز، دی آمین اکسیداز و پلی آمین اکسیداز موجود در آپوپلاست نیز موجب تولید انواع اکسیژن فعال در این فضا می‌شوند [۳۰].

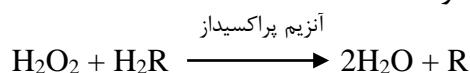
به احتمال زیاد FeSOD ها قدیمی ترین نوع سوپراکسید دیسموتازها هستند. MnSOD ها از نظر ساختاری به FeSOD ها شباهت دارند و احتمالاً از FeSOD ها تکامل یافته اند. جزئیات ساختارهای سه بعدی نشان می دهند که FeSOD و MnSOD از نظر تاخوردگی ساختمانی، بسیار به هم شبیه هستند و پایانه های اسید آمینه ای حفاظت شده ای مشابهی را برای اتصال فلز به کار می برند. در عوض، Cu/ZnSOD از نظر ساختاری به هیچ کدام از ایزوفرم های سوپراکسید دیسموتاز شباهت ندارد و به عنوان سوپراکسیدازی تازه تکامل یافته شناخته می شود [۴۱، ۴۲].

۳-۴-۱. پراکسیداز

این آنزیم در همه گیاهان وجود دارد و در رشد و تقسیم سلولی گیاهان نقش دارد. پراکسیدازها، در مراحل مختلف فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند لیگنینی شدن، کاتابولیسم اکسین، سوبرینی شدن، بهبود زخم و مکانیسم دفاع در برابر پاتوژن ها دخالت دارند. پراکسیدازهای گیاهی موجود در فضای آپوپلاستی به عنوان کاتالیزورهای رادیکال اکسیل های مشتق از ترکیبات آروماتیک در نظر گرفته می شوند [۴۳].

پراکسیدازها ترکیبات زیادی را در حضور پراکسید هیدروژن اکسید می کنند. پراکسیدازهای گیاهی گلیکوپروتئین های هم دار هستند و معمولاً براساس نقطه ایزوالکتریک خود به انواع اسیدی، بازی و خنثی دسته بندی می شوند. بسیاری از گیاهان عالی دارای شمار زیادی از ایزوآنزیم های پراکسیدازی هستند که توسط خانواده های چند ژنی رمزگذاری می شوند [۴۴].

تخریب مؤثر و مداوم H_2O_2 برای زندگی موجودات هوایی ضروری است. کاتالاز و پراکسیداز برای حذف H_2O_2 اضافی و برای تنظیم دقیق غلظت آن در مسیرهای علامت دهی ضروری هستند. واکنش کلی کاتالاز شامل تخریب دو مولکول پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن است. آنزیم پراکسیداز مانند کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می شود ولی بر خلاف کاتالاز با اکسیداسیون یک پیش ماده مانند ترکیبات فنولیک یا آنتی اکسیدان های دیگر باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می شود [۴۵].



۴-۴-۱. آسکوربات پراکسیداز

آسکوربات پراکسیداز آنزیمی کلیدی در حذف پراکسید هیدروژن در گیاهان است [۴۶]. آسکوربات پراکسیداز از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون استفاده می‌کند. آسکوربات اکسید شده توسط مونو دی هیدرو آسکوربات ردوکتاز و در چرخه گلوتاتیون-آسکوربات به آسکوربات احیا می‌شود [۴۷].



۴-۴-۵. گلوتاتیون ردوکتاز

این آنزیم مانند سایر آنزیم‌های درگیر در تنش اکسیداتیو دارای چندین ایزوفرم می‌باشد که در قسمت‌های مختلف سلول مانند کلروپلاست و سیتوسل قرار دارند. این آنزیم‌ها در تنش‌های محیطی مختلف و در شرایط مختلف سلولی بیان می‌شوند و به عنوان آنزیم‌های کمکی در کاهش آسیب‌های وارده به سلول عمل می‌کنند [۴۸]. آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز آنزیمی است که در چرخه گلوتاتیون-آسکوربات با استفاده از NAD(P)H به عنوان دهنده الکترون گلوتاتیون اکسید شده را به گلوتاتیون احیا می‌کند [۲۹].

۵-۱. فواید اکسیژن فعال برای گیاهان

گونه‌های اکسیژن فعال در ابتدا به عنوان محصولات جانبی و سمی حاصل از متابولیسم هوازی شناخته می‌شدند که توسط آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو حذف می‌شدند. در سال‌های اخیر، آشکار شد که گونه‌های اکسیژن فعال نقش مهمی در فرآیندهای کنترلی گیاه مانند رشد، نمو، پاسخ به محرک‌های زنده و غیر زنده و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بازی می‌کنند. این نوع مکانیسم حذف و غلبه بر سمیت گونه‌های اکسیژن فعال بسیار کارآمد است و احتمالاً گیاهان را قادر می‌سازد که سمیت گونه‌های اکسیژن فعال را حذف و بسیاری از این مولکول‌های واکنش‌پذیر را به عنوان مبدل علامت استفاده نمایند. شناسایی آنزیم تولید کننده گونه‌های اکسیژن فعال مانند NADPH-اکسیداز گیاهی دخیل در تنفس، نشان می‌دهد که سلول‌های گیاهی مانند سلول‌های پستانداران، می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال را تولید و به احتمال زیاد آن را تکثیر نمایند و از آن برای اهداف پیام‌رسانی استفاده نمایند. تولید موضعی گونه‌های اکسیژن فعال در اندامک‌هایی مانند پلاستیدها، میتوکندری و پراکسی‌زوم‌ها نیز می‌تواند آبخاری از پیام‌های درون سلولی

را ایجاد نماید [۴۹]. اینکه گیاهان از ROS به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان استفاده می‌کنند می‌تواند حاکی از این موضوع باشد که در جریان تکامل، سلول‌های گیاهی توانسته‌اند که بر سمیت ROS فائق آیند و برای اینکه گیاهان بطور هم‌زمان هم سمیت ROS را کنترل و هم از آن به عنوان ابزاری پیام‌رسان استفاده کنند متجاوز از ۱۰ ژن درگیر هستند [۵۰]. همچنین شاید دلیل اینکه سلول‌ها از ROS به عنوان مولکول‌های علامت‌ده به طور گسترده‌ای استفاده می‌کنند این باشد که این مولکول‌ها در حس و دریافت تنش مؤثرتر عمل می‌کنند زیرا بسیاری از تنش‌ها تعادل متابولیکی سلول را بر هم زده و باعث تغییر در میزان و نوع تولید ROS می‌گردند [۴۹].

۱-۶. روش‌های اندازه‌گیری تنش اکسیداتیو:

رها شدن نانوذرات در محیط زیست خطرات بالقوه‌ای را برای سلامتی انسان، گیاهان و حیوانات در پی دارد. در این میان گیاهان به عنوان اولین حلقه در زنجیره غذایی دارای اهمیتی ویژه هستند، چرا که نانوذرات می‌توانند به همراه گیاهان وارد زنجیره غذایی شوند. بنابراین لازم است برای جلوگیری از خطرات احتمالی این یافته نوظهور تمام جوانب آن از جمله سمیت احتمالی مواد وارده به محیط زیست مورد ارزیابی قرار گیرد [۵۱، ۵۲]. سمیت نانوذرات را می‌توان در قالب تنش اکسیداتیو به عنوان شاخص بر هم خوردن تعادل سلول مورد مطالعه قرار داد.

تنش اکسیداتیو به عنوان پاسخی برای آسیب سلولی در نظر گرفته می‌شود [۵۳]. اندازه‌گیری تنش اکسیداتیو در سلول‌ها نیازمند روش‌های حساس و قوی برای تشخیص ROS و سنجش کمی و دقیق آن و اندازه‌گیری پاسخ‌های دفاعی سلولی می‌باشد. اندازه‌گیری ROS در موجودات زنده دارای چالش‌های تحلیلی و قابل توجهی می‌باشد چرا که بسیاری از گونه‌های اکسیژن فعال بسیار واکنش‌پذیر و دارای عمر کوتاهی هستند بنابراین تعیین و تشخیص آنها در محیط‌های زیستی بسیار مشکل است. به دو روش مستقیم (اسپکتروسکوپی تشدید الکترون - اسپین^۱) و غیر مستقیم (از طریق اندازه‌گیری میزان بیان ژن و پروتئین-های درگیر در خنثی‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال مانند کاتالاز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و بررسی

1- Resonance Spectroscopy Electron-Spin

ماکرومولکول‌هایی که به وسیله این ترکیبات مورد حمله قرار می‌گیرند مانند لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها) می‌توان میزان گونه‌های اکسیژن فعال را در سلول اندازه‌گیری نمود [۵۴] که در این پایان‌نامه به دلیل استفاده از روش اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های درگیر در خنثی‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال، صرفاً به معرفی روش‌های مذکور می‌پردازیم.

برای بررسی بیان ژن‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی مانند میکرو آری، لکه‌گذاری نورترن، PCR نیمه کمی و کمی، اندازه‌گیری بیان ژن‌ها براساس تعداد (EST)، روش تجزیه و تحلیل پیاپی بیان ژن‌ها (SAGE) و روش آرایه‌های مرتب (Tiling array) استفاده نمود. در این پایان‌نامه از روش qRT-PCR نیمه کمی، برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد تا به سؤالات ذیل پاسخ دهیم

آیا نانوذره منیزیم اکسید دارای سمیت احتمالی بر روی گیاه سویا می‌باشد؟ آیا این سمیت در مراحل رشدی مختلف متفاوت می‌باشد؟

۷-۱. منیزیم

منیزیم از عناصر ماکرو مورد نیاز برای گیاهان است و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی فعالیت می‌کند. منیزیم از کاتیون‌های دو ظرفیتی موجود در سیتوپلاسم گیاهان است و هسته مرکزی در مولکول کلروفیل را تشکیل می‌دهد و عنصری ضروری برای تجمع و ایجاد ساختار صحیح ریبوزوم می‌باشد. این ماکروالمان برای فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها مانند RNA پلی‌مراز، ATPase، پروتئین کینازها، فسفاتازها، گلوکاتایون سنتتاز و کربوکسیلازها ضروری است و نقشی کلیدی در فتوسنتز ایفا می‌کند و بسیاری از آنزیم‌های کلیدی کلروپلاست (مانند آنزیم‌های درگیر در فرآیند فتوسنتز) به طور قابل ملاحظه‌ای به وسیله تغییرات اندکی در غلظت منیزیم کلروپلاستی یا سیتوسولی تحت تأثیر قرار می‌گیرند [۵۵].

۸-۱. مسیرهای جذب منیزیم به گیاه:

در تمام موجودات زنده، فعالیت سلولی نیازمند برقراری تعادل کاتیون‌های فلزی به‌ویژه در اطراف غشاهای زیستی است. تمام اشکال حیات به منیزیم نیاز دارند. از آنجایی که منیزیم جزو عناصر مهم

مورد نیاز سلول می باشد جذب این عنصر بر خلاف شیب الکتروشیمیایی و با مصرف انرژی و توسط پروتئین های ناقل صورت می گیرد. در باکتری ها، احتمالاً منیزیم به وسیله پروتئین CorA جذب می شود و در غیاب این پروتئین، پروتئین دیگری به نام MgtE این وظیفه را بر عهده می گیرد. در مخمرها، جذب اولیه از طریق Alr1p و Alr2p صورت می گیرد اما پروتئین دیگری به نام Mrs2p مسئول توزیع منیزیم درون سلول می باشد. در پروتوزوا فقط یک ناقل منیزیم به نام XntAp شناخته شده است. در متازوا، همولوگ های Mrs2p و MgtE همچنین دو سیستم انتقال منیزیم به نام های TRPM6/TRPM7 و PCLN-1 شناسایی شده اند و در گیاهان، خانواده ژنی Mrs2p به همراه پروتئین دیگری به نام AtMHX شناسایی شده اند که این پروتئین ها با مصرف انرژی، موجب حرکت منیزیم در عرض غشا می شوند [۵۶].

۹-۱. مروری بر مطالعات انجام شده بر روی آنزیم های مورد مطالعه

رودری گیوز و همکاران ریشه های نخود (*Pisum sativum* L.) را در معرض ۵۰ میکرو مولار کادمیوم کلرید قرار دادند و مشاهده کردند که این فلز میزان بیان ژن کاتالاز را کاهش داد. همچنین میزان بیان ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز نیز تحت این تیمار کاهش یافت. اما میزان بیان ژن منگنز سوپراکسید دیسموتاز و سوپر اکسید دیسموتاز آهن دار زیاد تحت تأثیر این تیمار قرار نگرفت [۵۷]. در آزمایشی دیگر گالئو و همکاران گیاه آفتابگردان را در معرض ۰/۵ میکرو مولار مس، آهن و کادمیوم و در محیط کشت پرلیت قرار دادند. پس از دو هفته عصاره آنزیم ها را از برگ های گیاهان تحت تیمار استخراج کردند و مشاهده کردند که کادمیوم و آهن موجب کاهش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز شد اما مس موجب افزایش فعالیت این آنزیم شد. همچنین گزارش کردند که این تیمارها موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و دی هیدروآسکوربات ردوکتاز شدند [۵۸].

بالستریس و همکاران گیاهان سویا را با ۵۰ و ۲۰۰ میکرو مولار کادمیوم کلرید تیمار کردند و میزان بیان ژن کاتالاز و هم-اکسیژناز آن را پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در بافت ریشه و گرهک های گیاهان چهارده روزه اندازه گیری نمودند. این محققان مشاهده کردند که میزان بیان ژن کاتالاز در ریشه

گیاه سویا پس از ۲۴ ساعت تغییری نکرد، اما میزان بیان این ژن پس از ۴۸ ساعت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار کاهش یافت و غلظت ۵۰ میکرومولار بر بیان این ژن در مدت زمان ۴۸ ساعت تأثیری نداشت. بیان ژن کاتالاز در این آزمایش پس از ۷۲ ساعت به طور معنی داری در هر دو غلظت مورد بررسی کاهش یافت [۵۹].

رضایی و همکاران گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum* L) را در معرض غلظت‌های مختلف بر (صفر، ۰/۰۵ و ۰/۱) و آلومینیوم (۰/۸۸) میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت قرار دادند و مشاهده نمودند که بیان ژن‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تأثیر این تیمارها تغییر نمود. این محققان گزارش نمودند که بیان ژن کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در مواجهه با غلظت ۰/۱ بور و ۰/۸۸ آلومینیوم افزایش یافت [۶۰]. کارتس و همکاران دو نوع گیاه چچم یکساله (حساس و نیمه مقاوم به آلومینیوم) را در طی زمان‌های مختلف (۴۸ و ۱۲، ۴، ۲) تحت تأثیر ۰/۲ میلی‌مولار آلومینیوم قرار دادند. این محققان گزارش کردند که میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز آهن‌دار در گیاه نیمه مقاوم معنی‌دار نشد اما میزان بیان این ژن در گیاه حساس پس از ۸ ساعت افزایش یافت و با افزایش زمان تماس میزان بیان این ژن در این گیاهان کاهش یافت. همچنین گزارش کردند که میزان بیان ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز در هر دو گیاه و پس از ۸ ساعت تیمار با آلومینیوم افزایش یافت و با افزایش زمان میزان بیان این ژن در گیاه مقاوم زودتر از گیاه حساس کاهش یافت [۶۱]. بوکوا و همکاران گیاهچه‌های جو را در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم (۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکرو مولار) به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادند و نوک ریشه گیاهچه‌ها را پس از سپری شدن ۳، ۶ و ۹ ساعت از زمان تیمار با کادمیوم بردند و میزان بیان ژن کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را بررسی نمودند و مشاهده کردند که بیان ژن کاتالاز در تیمار با ۱۵ میکرومولار کادمیوم افزایش یافت و با افزایش غلظت کادمیوم میزان بیان ژن کاتالاز متوقف شد در حالیکه میزان بیان ژن آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر تیمار کادمیوم قرار نگرفت [۶۲]. پاندا و ماتسوموتو گیاهان ۴ روزه نخود مقاوم به آلومینیوم را تحت تأثیر ۱۰ و ۵۰ میکرو مولار آلومینیوم کلراید قرار دادند و میزان بیان ژن‌های کاتالاز، منگنز سوپر اکسید دیسموتاز، مس/روی سوپر

اکسید دیسموتاز و آهن-سوپر اکسید دیسموتاز را پس از سپری شدن ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، در بافت ریشه و ساقه اندازه گیری نمودند و مشاهده کردند که میزان بیان ژن کاتالاز در غلظت ۵۰ میکرومولار و پس از گذشتن ۲۴ و ۴۸ ساعت در بافت ریشه دو تا سه برابر افزایش یافت در حالی که در بافت ساقه این تغییر ناچیز بود. این محققان گزارش کردند که میزان بیان ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز و منگنز سوپر اکسید دیسموتاز در هیچ کدام از بافت‌های مورد مطالعه تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت اما میزان بیان ژن آهن-سوپر اکسید دیسموتاز در ساقه و در غلظت ۵۰ میکرو مولار پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش یافت [۶۳]. پنا و همکاران دانه‌رست‌های دو روزه آفتابگردان را به مدت ۴ و ۸ ساعت تحت تیمار ۵ و ۱۰ میکرو مولار کلرید مس قرار دادند و مشاهده کردند که پس از چهار ساعت بیان ژن‌های *CATA1* و *CATA2* تحت تأثیر این تیمارها قرار نگرفت و بیان ژن‌های *CATA3* و *CATA4* تحت تأثیر این تیمارها افزایش یافت [۶۴]. ساندلیو و همکاران (۲۰۰۱) گیاهان نخود را تحت تیمار کادمیوم قرار دادند و مشاهده کردند که این تیمار باعث کاهش فعالیت مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز و سپس کاهش فعالیت منگنز سوپر اکسید دیسموتاز و بعد از این آهن-سوپر اکسید دیسموتاز می‌گردد [۶۵]. پاولک و همکاران (۲۰۰۹) گیاهچه‌های سویا را در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم و سرب قرار دادند و مشاهده نمودند که با افزایش غلظت سرب میزان بیان ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز کاهش می‌یابد و اما در تیمار کادمیوم با افزایش غلظت کادمیوم، میزان بیان ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد و بیشترین بیان در غلظت ۱۰ میکرومولار کادمیوم رخ می‌دهد [۶۶].



پایخ مولکولی گیاه سویا در تیمار نانانو ذره نیتزیم اکسید- آمیزه یوسنی گیاه

فصل دوم

مواد و روش ها

۱-۲. مواد

نیترات پتاسیم (KNO_3)، نیترات کلسیم ($CaN_2O_6 \cdot 4H_2O$)، آمونیوم دی هیدروژن فسفات ($NH_4H_2PO_4$)، سولفات آهن ($FeSO_4 \cdot 6H_2O$)، اسید مولیبدیک ($H_2MoO_4 \cdot 4H_2O$)، اسید بوریک (HBO_3)، کلرور منگنز ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)، سولفات روی ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)، سولفات مس ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد. $dNTP$ MIX، $MgCl_2$ ، 10X PCR Buffer، Smart Taq DNA، Polymerase، DNase Free Deionized water، Agarose، DEPC Treated Water، Loading Buffer، Gene Ruler 100 bp، EDTA، Bioscience (کمبریج، انگلستان) تهیه گردید. آنزیم DNase I، Oligo d(T)، 10X Buffer M-MuL V، MuL V Reverse Transcriptase، Bioscience (کمبریج، انگلستان) خریداری شد. کلروفرم، اتانول و ایزوپروپانل از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شد. کیت سنتز cDNA از شرکت ویوانتیس (مالزی) تهیه گردید. محلول RNX-PLUS از شرکت سینا کلون (کرج، ایران) خریداری شد. بذور سویا رقم DPX از شرکت سویابین (گرگان، ایران) تهیه گردید. پرایمرهای 18S، CAT، SOD و PRX از شرکت Bioneer (کره جنوبی) تهیه گردیدند. نانوذرات منیزیم اکسید از شرکت US Research Nanomaterials, Inc (آمریکا) خریداری شد.

۲-۲. تجهیزات

اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، آون Heraeus (هانوا، آلمان)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، هود میکروبی Farpajouh (تهران، ایران)، ترموسایکلر TaKaRa (اتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ یخچال دار Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، مایکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل داگ QUANTUM ST4 (سوئیا، آلمان)، ترانس ایلومینیتور (تهران، ایران)، سمپلر ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو لیتر Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، هات پلیت IKA RH B2 (نورنبرگ، آلمان)، pH متر Metrohm (پلیکان کریک، آمریکا)، یخچال فریزر ۲۰- پارس (تهران، ایران)، اسپکتوفتومتر Jenway (بدفوردشایر، انگلستان) هود شیمیایی Farpajouh (تهران، ایران)، ترازوی

SARTURIUS (گوتینگن، آلمان)، الکتروفورز پدیده نوژن پارس (مشهد، ایران)، Drybath شرکت Lab net (کره)، میکرو سانتریفیوژ Lab net (کره)، EC متر Jenway (بدفوردشایر، انگلستان) در این پایان نامه مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳. کشت هیدروپونیک سویا:

برای تهیه محلول غذایی برای کشت گیاهان سویا، از محلول غذایی هوگلند استفاده گردید. بدین منظور، محلول غذایی شامل ۲ میلی مولار نیترات پتاسیم (KNO_3)، ۰/۰۴ میلی مولار نیترات کلسیم ($CaN_2O_6 \cdot 4H_2O$)، ۵/۲ میلی مولار آمونیوم دی هیدروژن فسفات ($NH_4H_2PO_4$)، ۶/۴ میلی مولار سولفات آهن ($FeSO_4 \cdot 6H_2O$)، ۱/۲ میلی مولار اسید مولیبدیک ($H_2MoO_4 \cdot 4H_2O$)، ۰/۴ میلی مولار اسید بوریک (HBO_3)، ۰/۰۹ میلی مولار کلرور منگنز ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)، ۰/۰۷ میلی مولار سولفات روی ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)، ۰/۰۳ میلی - مولار سولفات مس ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) و ۶ میلی مولار EDTA تهیه گردید (جدول ضمیمه ۱ و ۲).

برای هر ظرف به میزان دو لیتر محلول غذایی هوگلند به روش بالا تهیه گردید. سپس محلول ها به ظروف کشت با بدنه تیره رنگ منتقل گردید، در هر ظرف ۲۴ عدد دانه رست ۵ روزه سویا که در پتری دیش و تحت آبیاری با آب مقطر جوانه زده بود، قرار گرفت. تیمارهای اعمال شده در این آزمایش شامل محلول های حاوی ۱، ۲، ۵/۰ و ۲۵/۰ گرم در لیتر نانوذره و بالک منیزیم اکسید بود. در این آزمایش از محلول خالص هوگلند به عنوان شاهد استفاده گردید. گیاهان در طی این مدت تحت دمای ۲۴ درجه سانتی گراد، رطوبت ۶۵/۵ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در گلخانه قرار گرفتند. پس از رسیدن گیاهان به مرحله دو برگگی و چهار برگگی، گیاهان برای استخراج RNA استفاده شدند (شکل ۱-۲).

۲-۴. استخراج RNA

ابتدا هاون چینی، به مدت نیم ساعت داخل هیپوکلراید سدیم ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) قرار داده شد. با آب مقطر آب کشی و با فویل آلومینیومی پوشانیده شد و درون آون با دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد به مدت بیست و چهار ساعت قرار داده شد. ظروف از آون خارج گردید و پس از سرد شدن، جهت کوبیدن نمونه گیاهی مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌های برگ، ریشه و لپه سویا به میزان ۱۲۰ میلی گرم (۰/۱۲ گرم) درون هاون چینی و در حضور ازت مایع به صورت پودر درآمد و ۰/۱ گرم از نمونه داخل تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری استریل قرار گرفت. محلول RNX_Plus (یک میلی لیتر) به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و میکروتیوب‌ها به مدت ۲-۳ دقیقه ورتکس شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. کلروفورم (۲۰۰ میکرو لیتر) به آن اضافه شد و میکروتیوب‌ها خوب تکان داده شدند تا مخلوط کدوری بدست آید. میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۸۱۷ Xg قرار گرفتند.

فاز رویی به میکروتیوبی تازه منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانل اضافه شد و میکروتیوب‌ها به آرامی تکان داده شدند. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۵۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حذف و به میزان یک میلی‌لیتر اتانول سرد (۷۵ درصد) اضافه شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۸ دقیقه در سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۸۴۰۳ Xg سانتریفیوژ شدند.

نمونه‌ها برای حذف اتانول به مدت ۵-۷ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس برای حل کردن RNA استخراج شده از آب تیمار شده با DEPC (۵۰ میکرولیتر) استفاده گردید و برای حل شدن بهتر RNA استخراج شده، به مدت ۱۰ دقیقه در Dry bath با دمای ۶۰-۵۵ قرار گرفتند. نمونه‌ها در یخچال فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۵-۲. تعیین کیفیت و کمیت RNA

برای بررسی کیفیت RNA، پنج میکرولیتر از نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل با استفاده از رنگ Safe Stain صورت گرفت و با استفاده از دستگاه عکس برداری ژل ۲۳، باندهای مورد نظر بررسی شدند.



شکل ۱-۲: گیاهان سویا در مرحله دو برگگی در محیط کشت هیدروپونیک. تیمار حاوی نانوذرات به میزان ۰/۲۵ گرم بر لیتر

برای تعیین کمیت، از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. به این ترتیب که دو میکرولیتر از نمونه‌ی استخراجی به همراه ۱۹۸ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC درون کوت کوارتز قرار داده شد و میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر یادداشت شد. سپس مقدار کل RNA بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر بر اساس معادله زیر محاسبه گردید. از آب تیمار شده با DEPC به عنوان شاهد برای کالیبره کردن دستگاه استفاده شد.

$$RNA = (OD_{260} * 40) / \text{Dilution factor}$$

۲-۶. تیمار DNaseI

برای از بین بردن DNA ژنومی میزان ده میکروگرم از RNA داخل تیوب ریخته شد و یک واحد آنزیم DNaseI، دو میکرولیتر بافر DNaseI به آن اضافه شد و حجم نهایی با آب تیمار شده با DEPC به ده میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه Dry bath قرار گرفت. به هر تیوب

یک میکرو لیتر بافر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^{۲۴} اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در دستگاه بن ماری قرار داده شد.

۲-۷. ساخت cDNA

میزان پنج میکروگرم از هر نمونه RNA بعد از تیمار DNaseI داخل تیوب ریخته شد و به هر تیوب یک میکرولیتر مخلوط dNTP MIX ۱۰ میکرو مولار، یک میکرولیتر آغازگر oligodT (۴۰ میکرومولار) اضافه گردید. سه میکرولیتر آب دو بار تقطیر افزوده شد تا به حجم ۱۰ برسد و مخلوط را در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد و نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه روی یخ سرد شدند و پس از یک اسپین مختصر ۱۰ میکرولیتر مخلوط سنتز cDNA شامل ۲ میکرو لیتر بافر 10X M-MuLV، ۱۰۰ یونیت آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase و آب عاری از اسید نوکلئیک تا به ۱۰ میکرو لیتر برسد، به هر میکرو تیوب اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا واکنش خاتمه یابد. پس از این مرحله نمونه‌ها تا زمان PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲-۸. طراحی پرایمر

طراحی پرایمر برای ژن‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز و ژن همیشه بیان 18S با استفاده از نرم افزار پرایمر ۳ انجام شد. توالی، شماره دسترسی مورد استفاده در سایت NCBI و طول محصول پرایمر ژن همیشه بیان و ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۲-۱ ارائه شده است.

۲-۹. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استاندارد جهت تأیید ساخت cDNA

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مواد مورد نیاز طبق دستور العمل زیر مخلوط گشت (در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر برای هر نمونه) و بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای، محصول آن جهت تأیید بر ژل الکتروفورز بارگذاری گردید. دمای تنظیم شده دستگاه بر اساس نقطه ذوب پرایمرها بود. قابل ذکر است که این مرحله یکبار آغازگر ژن همیشه بیان و یکبار هم برای آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت.

مواد مورد نیاز به منظور ساخت مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای یک نمونه (1X) cDNA شامل؛ ۲ میکرولیتر بافر (10X)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP Mix ده میلی مولار، ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase، ۱۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، یک میکرولیتر آغازگر پسر^{۲۵}، یک میکرولیتر آغازگر پیشرو^{۲۶}، و یک میکرولیتر (۰/۲۵ میکروگرم/میکرولیتر) نمونه cDNA بودند. پس از تهیه مخلوط واکنش تیوب‌ها در دستگاه PCR و طبق چرخه‌ی حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه ادامه یافت.

با اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، ۵ میکرو لیتر از نمونه‌ها به همراه ۲ میکرو لیتر Loading dye برای بررسی بیان ژن درون چاهک‌های ژل الکتروفورز افقی بارگذاری شدند. ژل‌های حاصل برای عکس‌برداری به دستگاه ژل داک منتقل شدند.

۱۰-۲. آنالیز آماری داده‌ها

در این تحقیق برای کمی کردن باندها براساس شدت درخشندگی از نرم‌افزار Image J و برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد. مقایسه میانگین با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام گرفت.

جدول ۱-۲ ویژگی پرایمر کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (Prx) و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) به همراه Tm

| نام ژن | شماره دسترسی | Tm(°C) | توالی پرایمر ۵'→۳' | طول ژن (bp) |
|----------------------|---------------|--------|---|-------------|
| <i>18s</i> | M۸۲۶۳۸ | ۶۰ | GGCTACCACATCCAAGGAA CTATTGGAGCTGGAATTACGG | ۱۹۳ |
| <i>CAT</i> | ۲۶۶۱۰۱۴ | ۶۰ | TTCAAGCAACCTGGGGAGAGATAC C GCTAGGGTTTCCACCACCAATCTT AGATAC | ۲۲۰ |
| <i>Prox</i> | ۲۲۴۵۶۸۲ | ۵۹ | GGAAGTGGCAAACCTGATCCAAC C CAGTGAGCACACCAATGTTACCCA TC | ۳۰۶ |
| <i>FeSOD</i> | ۱۶۹۹۵۵ | ۶۰ | GCTCAAGAGTCCCAATGCTGTGAA C CTGAGATTTAGCCCTGATAACCACA ACACC | ۳۵۹ |
| <i>Cu/ZnSO D</i> | ۱۲۷۱۱۶۴ ۴ | ۶۶ | GGACGATCTGTGGTGGTATATGC GTAGAGCTGATGGGCGACAAG | ۲۳۷ |
| <i>MnSOD</i> | ۱۴۷۹۴۵۶ ۳۲ | ۶۶ | CAGGACCCACTGGTTACTAAGG CCACATCTCTTACCGTGCTGC | ۲۳۷ |

فصل سوم

نتایج

۱-۳. ژن ریپوزومی 18s

ژن ریپوزومی 18s از گیاه سویا (*Glycine max L.*) پس از انجام ۳۰ سیکل PCR حاصل گردید (شکل ۳-۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کمی کردن بیان ژن 18s با استفاده از نرم‌افزار Image J در گیاهان سویا در پاسخ به محیط کشت‌های مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ در جداول ضمیمه (۳ تا ۵) آورده شده است. نتایج نشان داد که بین میزان بیان ژن 18s در محیط کشت‌های مختلف و در دو مرحله رشدی متفاوت و در کلیه صفات مورد بررسی (برگ، لپه و ریشه) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۳-۲).

۲-۳. ژن کاتالاز

ژن کاتالاز از گیاه سویا (*Glycine max L.*) پس از انجام ۳۵ سیکل PCR حاصل گردید و تکثیر این ژن برای گیاهان در شکل (۳-۳) آورده شده است. جدول تجزیه واریانس ژن کاتالاز در گیاهان، در محیط کشت‌های مختلف و در دو مرحله رشدی در جداول ضمیمه (۶ تا ۸) آورده شده است.

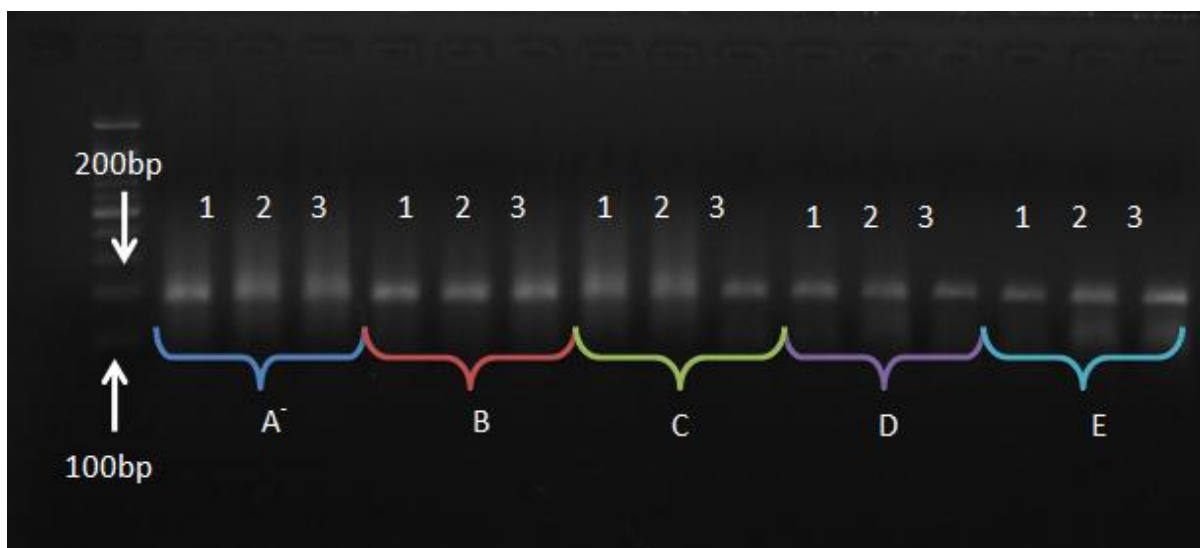
۱-۳-۲. نتایج تجزیه واریانس ژن کاتالاز در بافت برگ

نتایج حاصل نشان می‌دهد که اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در بافت برگ در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ضمیمه ۶). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی نشان داد میزان بیان ژن کاتالاز در تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) با عبور گیاه از مرحله دو برگگی به چهار برگگی افزایش یافت و این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۳-۴).

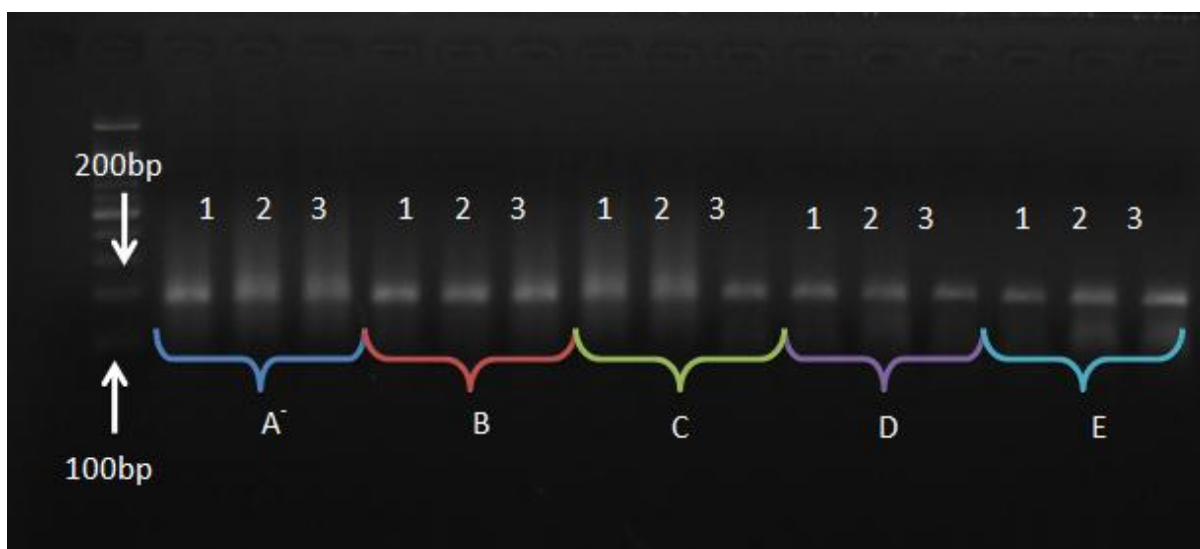
۲-۳-۲. نتایج تجزیه واریانس ژن کاتالاز در بافت لپه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در بافت لپه در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی‌دار نشد (جدول ضمیمه ۷). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی نشان داد میزان بیان ژن کاتالاز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله دو برگگی بیشترین مقدار است و با عبور گیاه از مرحله دو برگگی به چهار برگگی کاهش یافت که این کاهش معنی‌دار نبود (شکل ۳-۵).

(الف)

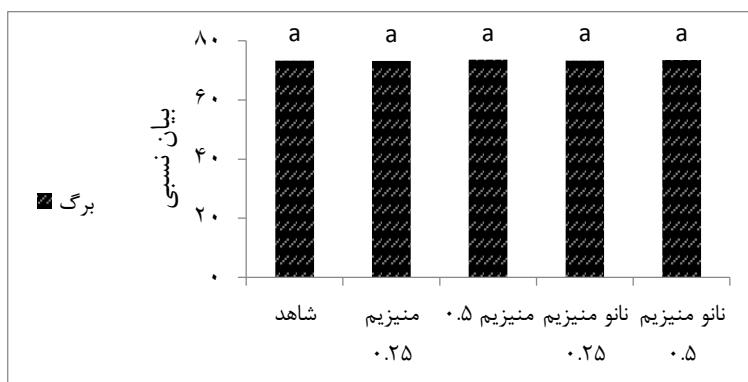


(ب)

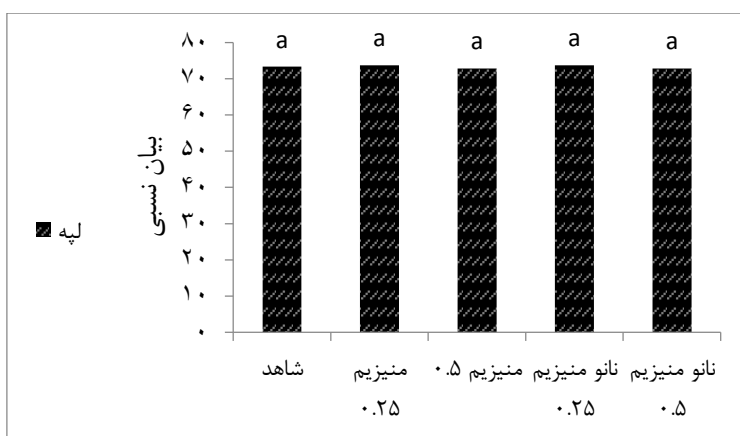


شکل ۳-۱. بررسی بیان ژن همیشه بیان (18s). الگوی باندی حاصل از محصولات PCR (۳۰ سیکل) با پرایمرهای ژن 18s بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۱۹۳ جفت باز می‌باشد، A، تیمار شاهد، B، تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر)، C، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر)، D، تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر)، E، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). عدد ۱، برگ، ۲، لپه، ۳، ریشه می‌باشد. (الف). مرحله دو برگ (ب) مرحله چهار برگ

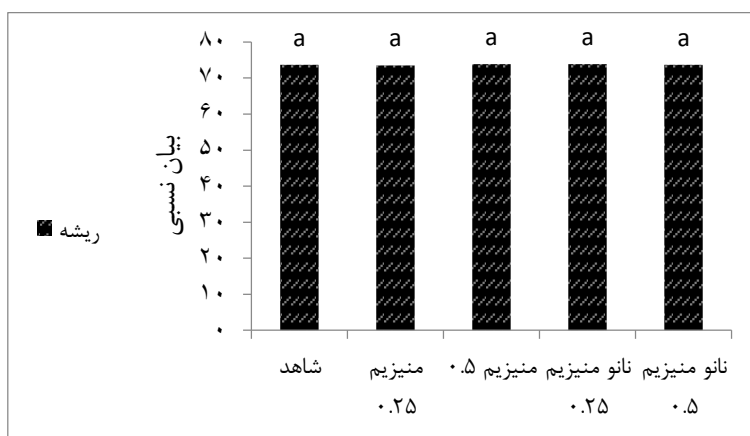
(الف)



(ب)

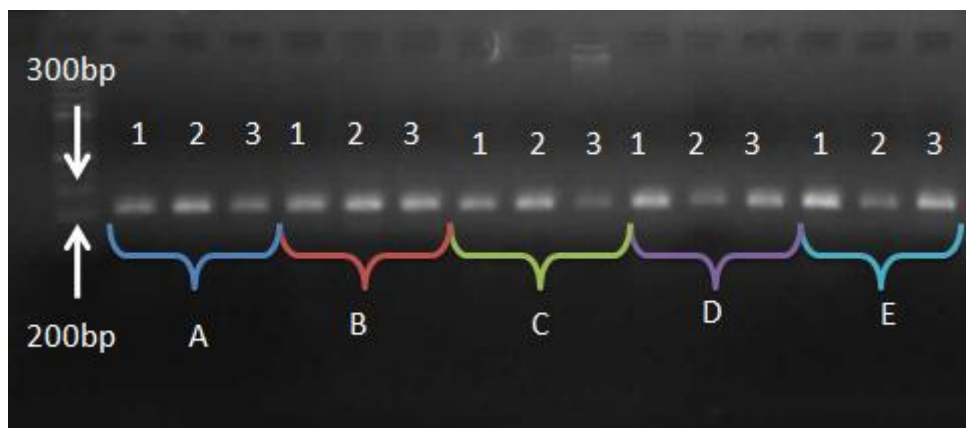


(ج)

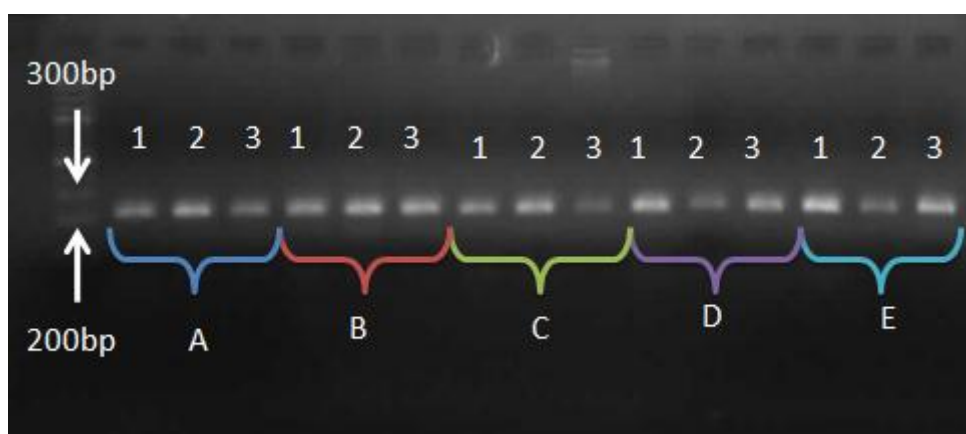


شکل ۳-۲. بیان نسبی ژن 18s در برگ (الف)، لپه (ب)، ریشه (ج) گیاهان سویا.

(الف)



(ب)



شکل ۳-۳. بررسی بیان ژن (Catalase). الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن CAT بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۲۲۰ جفت باز می‌باشد، A، تیمار شاهد، B، تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر)، C، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر)، D، تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر)، E، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). عدد ۱، برگ، ۲، لپه، ۳، ریشه می‌باشد. (الف) الگوی بانندی حاصل در مرحله دو برگی (ب) الگوی بانندی حاصل در مرحله چهار برگی

۳-۲-۳. نتایج تجزیه واریانس ژن کاتالاز در بافت ریشه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت ریشه معنی‌دار شد اما اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در بافت ریشه معنی‌دار نشد (جدول ضمیمه ۸). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی نشان داد میزان بیان ژن کاتالاز در تیمار نانوذره

منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دو برگی به طور معنی داری بیشتر از شاهد می باشد اما با عبور گیاه از مرحله دو برگی به چهار برگی میزان بیان در این دو تیمار تفاوت معنی داری ندارد. میزان بیان این ژن در سه تیمار منیزیم و نانو منیزیم (۰/۵ گرم بر لیتر) و منیزیم (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در هر دو مرحله رشدی تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳-۶).

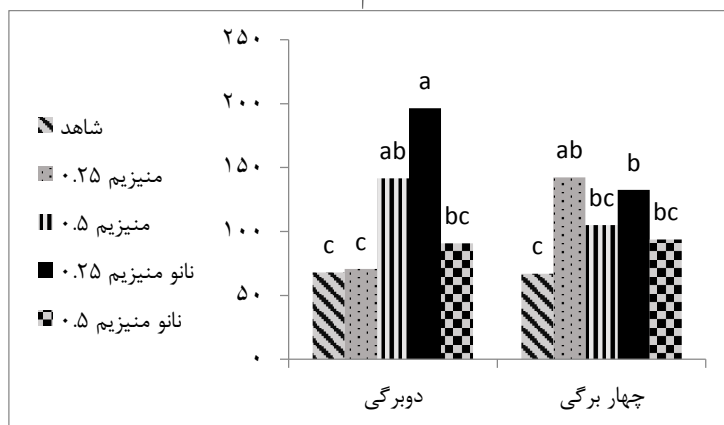
۳-۳. پراکسیداز

ژن پراکسیداز از گیاه سویا (*Glycine max L.*) طولی معادل ۱۲۸۷ جفت باز دارد، که پروتئین تجزیه کننده پراکسید هیدروژن، به طول ۳۵۴ اسید آمینه را کد می کند، طول قطعه تکثیری از روی cDNA با دو پرایمر FPRX و RPRX در این پایان نامه قطعه ای به طول ۳۰۶ باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از انجام ۳۵ سیکل PCR و تکثیر این ژن برای گیاهان در شکل ۳-۷ آورده شده است. جدول تجزیه واریانس ژن پراکسیداز در گیاهان، در محیط کشت های مختلف و در دو مرحله رشدی در جداول ضمیمه (۹ تا ۱۱) آورده شده است.

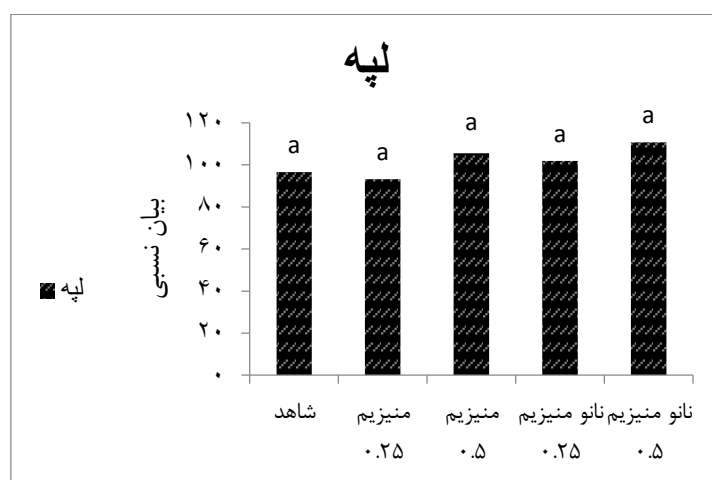
۳-۳-۱. نتایج تجزیه واریانس ژن پراکسیداز در بافت برگ

نتایج حاصل نشان می دهد که میزان منیزیم در بافت برگ معنی دار شد اما اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در بافت برگ معنی دار نشد (جدول ضمیمه ۹). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن پراکسیداز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) بیشترین مقدار بود و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به چهار برگی تغییری نکرد. میزان بیان این ژن در سه تیمار شاهد، منیزیم و نانو منیزیم (۰/۵ گرم بر لیتر) با عبور گیاه از مرحله دو برگی به چهار برگی تفاوت معنی داری نداشت. در تیمار منیزیم (۰/۲۵ گرم بر لیتر) میزان بیان ژن در مرحله رشدی چهار برگی افزایش یافت اما این افزایش معنی دار نبود (شکل ۳-۸).

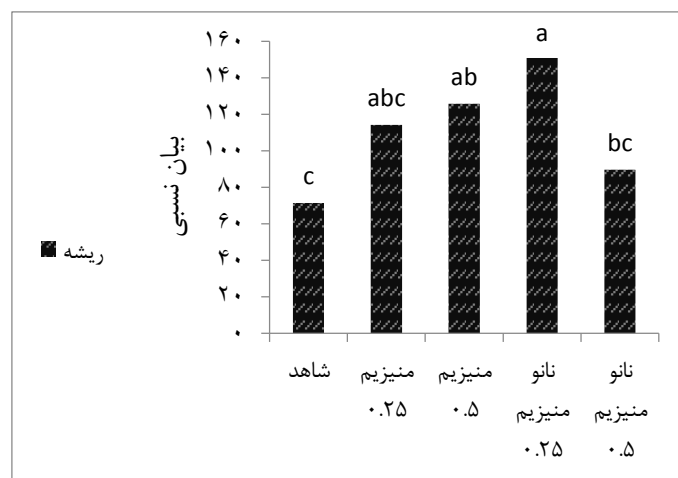
فصل سوم - نتایج



شکل ۳-۴. نتایج مقایسه میانگین زن کاتالاز در بافت برگ سویا.



شکل ۳-۵. نتایج مقایسه میانگین زن کاتالاز در بافت لپه سویا.



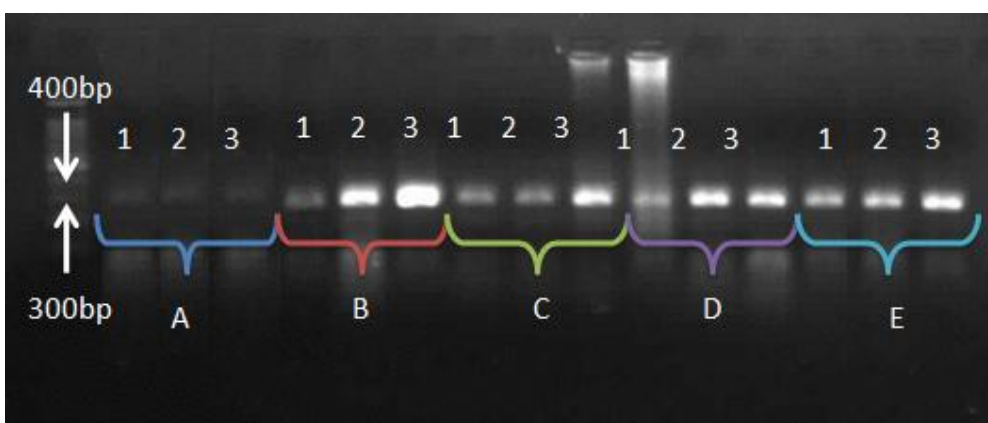
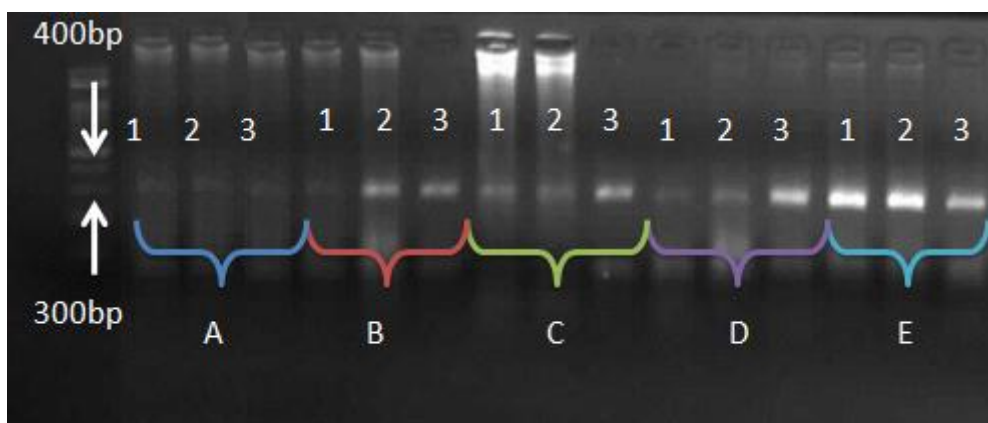
شکل ۳-۶. نتایج مقایسه میانگین زن کاتالاز در بافت ریشه سویا.

۲-۳-۳. نتايج تجزيه واريانس ژن پراکسيداز در بافت لپه

نتايج حاصل نشان مي دهد که ميزان منيزيم در بافت لپه در سطح ۱ درصد معني دار شد همچنين اثر متقابل منيزيم × مرحله رشدی در سطح ۱ درصد معني دار شد (جدول ضميمه ۱۰). بين تيمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معني داری وجود دارد. نتايج مقايسه ميانگين بين مراحل رشدی مختلف نشان داد ميزان بيان ژن پراکسيداز در تيمار منيزيم اکسيد (۰/۲۵ گرم بر ليتر) و منيزيم اکسيد (۰/۵ گرم بر ليتر) با عبور گیاه از مرحله دو برگی به چهار برگی به طور معني داری افزايش يافت اما افزايش ميزان بيان در تيمار نانوذره منيزيم اکسيد (۰/۵ گرم بر ليتر) بين دو مرحله رشدی معني دار نبود. همچنين ميزان بيان اين ژن در تيمار نانو ذره منيزيم اکسيد (۰/۲۵ گرم بر ليتر) با عبور گیاه از مرحله دو برگی به چهار برگی تفاوت معني داری نداشت و اين تيمار بيشترين ميزان بيان را در هر دو مرحله رشدی داشت (شکل ۳-۹).

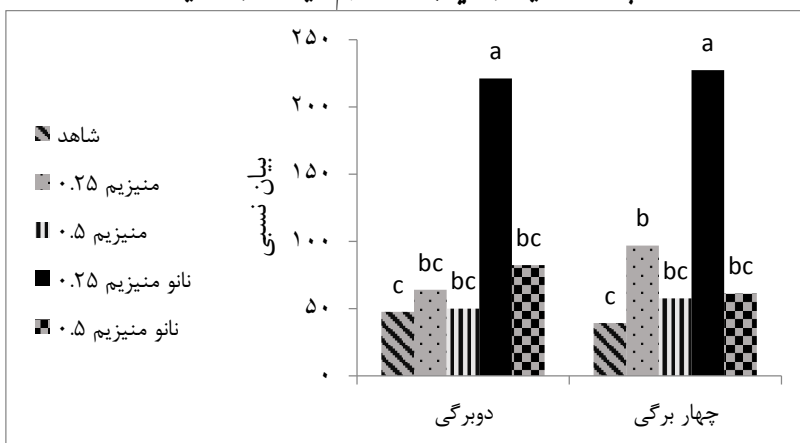
۳-۳-۳. نتايج تجزيه واريانس ژن پراکسيداز در بافت ريشه

نتايج حاصل نشان مي دهد که ميزان منيزيم در بافت ريشه در سطح ۱ درصد معني دار شد همچنين اثر متقابل منيزيم × مرحله رشدی در سطح ۱ درصد معني دار شد. بنا بر اين بين تيمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معني داری وجود دارد. نتايج مقايسه ميانگين بين مراحل رشدی مختلف نشان داد ميزان بيان ژن پراکسيداز در تيمار نانوذره منيزيم اکسيد (۰/۲۵ گرم بر ليتر) در مرحله دو برگی بيشتر از ساير تيمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به چهار برگی ميزان بيان اين ژن تغيير نکرد. ميزان بيان اين ژن در تيمارهای منيزيم اکسيد (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر ليتر) و تيمار نانوذره منيزيم اکسيد (۰/۵ گرم بر ليتر) در مرحله چهار برگی نسبت به مرحله دو برگی افزايش معني داری داشت (شکل ۳-۱۰).

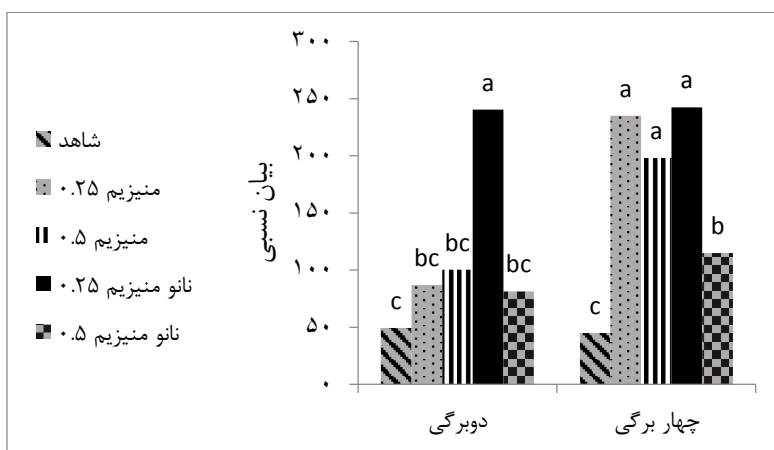


شکل ۳-۷. بررسی بیان ژن (Peroxidase). الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن PRX بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۳۰۶ جفت باز می‌باشد، A، تیمار شاهد. B، تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر). C، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر). D، تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). E، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). عدد ۱، برگ. ۲، لپه. ۳، ریشه می‌باشد. (الف) الگوی بانندی حاصل در مرحله دو برگگی (ب) الگوی بانندی حاصل در مرحله چهار برگگی

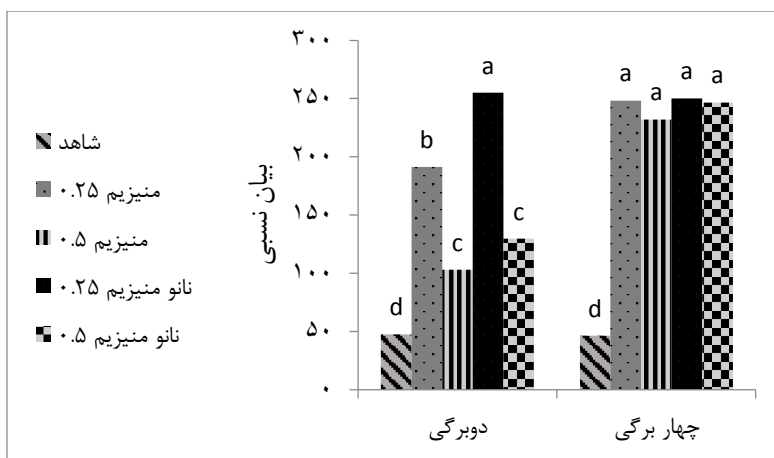
پانخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره منیزیم اکسید- آمه یونسی گیاه



شکل ۳-۸. نتایج مقایسه میانگین ژن پراکسیداز در بافت برگ سویا.



شکل ۳-۹. نتایج مقایسه میانگین ژن پراکسیداز در بافت لپه سویا.



شکل ۳-۱۰. نتایج مقایسه میانگین ژن پراکسیداز در بافت ریشه سویا.

۳-۴. سوپر اکسید دیسموتاز آهن دار

ژن سوپر اکسید دیسموتاز آهن دار از گیاه سویا (*Glycine max. L*) طولی معادل ۱۰۶۷ جفت باز دارد، که پروتئین تجزیه کننده پراکسید هیدروژن، به طول ۲۴۸ اسید آمینه را کد می کند، طول قطعه تکثیری از روی cDNA با دو پرایمر FSOD و RSOD در این پایان نامه قطعه ای به طول ۳۵۹ باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از انجام ۳۵ سیکل PCR و تکثیر این ژن برای گیاهان در شکل (۳-۱۱) آورده شده است. جدول تجزیه واریانس ژن سوپر اکسید دیسموتاز آهن دار در گیاهان، در محیط کشت های مختلف و در دو مرحله رشدی در جداول ضمیمه (۱۲ تا ۱۴) آورده شده است.

۳-۴-۱. نتایج تجزیه واریانس ژن آهن - سوپر اکسید دیسموتاز در بافت برگ

نتایج حاصل نشان می دهد که میزان منیزیم در بافت برگ در سطح ۱ درصد معنی دار شد اما اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در هیچ یک از سطوح (۱ درصد و ۵ درصد) معنی دار نشد (جدول ضمیمه ۱۲). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز - آهن دار در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن تغییر نکرد. میزان بیان این ژن در تیمارهای منیزیم اکسید (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر) و تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهار برگی نسبت به مرحله دو برگی کاهش یافت اما این کاهش معنی دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد نیز کاهش یافت اما این کاهش معنی دار نبود (شکل ۳-۱۲).

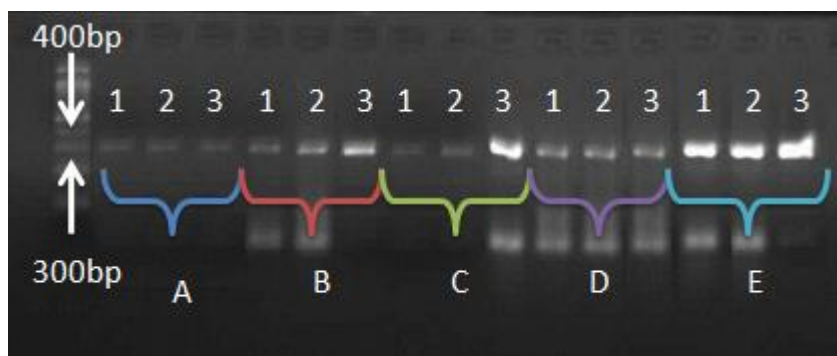
۳-۴-۲. نتایج تجزیه واریانس ژن آهن - سوپر اکسید دیسموتاز در بافت لپه

نتایج حاصل نشان می دهد که میزان منیزیم در بافت برگ در سطح ۱ درصد معنی دار شد اما اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در هیچ یک از سطوح (۱ درصد و ۵ درصد) معنی دار نشد (جدول ضمیمه ۱۳). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی

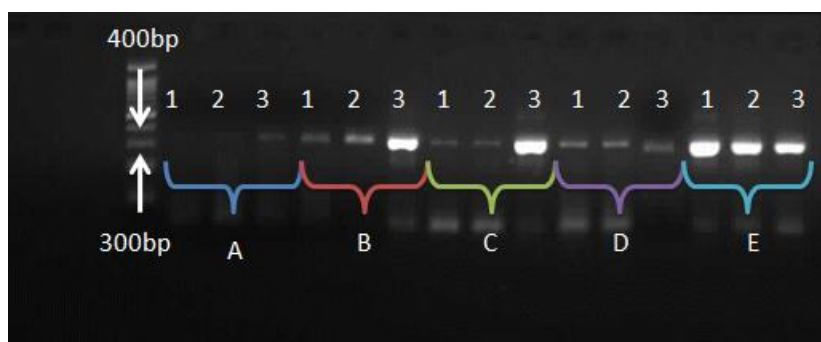
پانخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره منیزیم اکسید-آمنه یوسنی کیا

مختلف نشان داد میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز - آهن دار در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن تغییر نکرد. میزان بیان این ژن در تیمارهای منیزیم اکسید (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر) و تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهار برگی نسبت به مرحله دو برگی کاهش یافت اما این کاهش معنی دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد نیز کاهش یافت اما این کاهش معنی دار نبود (شکل ۳-۱۳).

(الف)



(ب)



شکل ۳-۱۱. بررسی بیان ژن (Fe-Superoxide dimutase). الگوی باندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن Fe SOD بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۲۴۸ جفت باز می باشد، A، تیمار شاهد. B، تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر). C، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر). D، تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). E، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). عدد ۱، برگ. ۲، لپه. ۳، ریشه می باشد. (الف) الگوی باندی حاصل در مرحله دو برگی (ب) الگوی باندی حاصل در مرحله چهار برگی

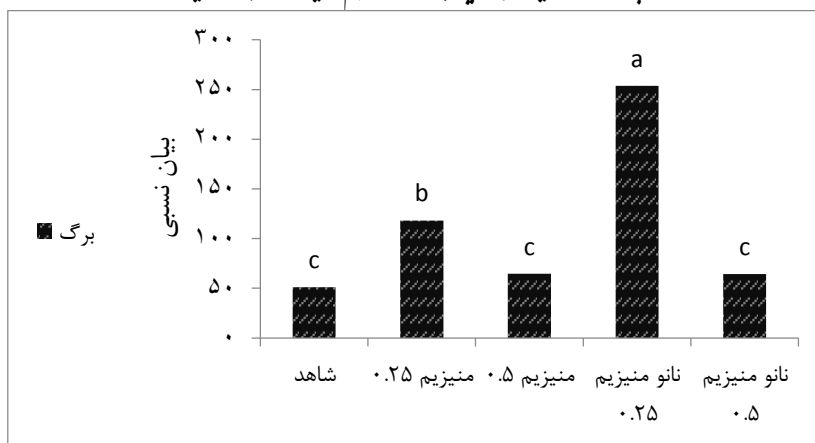
۳-۴-۳. نتایج تجزیه واریانس ژن آهن - سوپراکسید دیسموتاز در بافت ریشه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد همچنین اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ضمیمه ۱۴). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز - آهن‌دار در هر دو تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن تغییر نکرد. میزان بیان این ژن در تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهار برگی نسبت به مرحله دو برگی افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود (شکل ۳-۱۴).

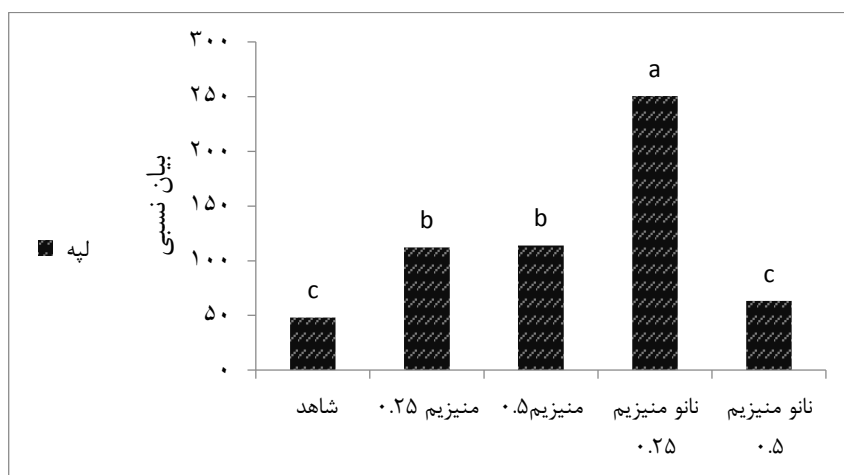
۳-۵. مس/روی سوپراکسید دیسموتاز

ژن مس/روی سوپراکسید دیسموتاز از گیاه سویا (*Glycine max. L*) طولی معادل ۱۱۴۳ جفت بازدارد، که پروتئین تجزیه کننده پراکسید هیدروژن، به طول ۳۰۴ اسید آمینه را کد می‌کند، طول قطعه تکثیری از روی cDNA با دو پرایمر FSOD1 و RSOD1 در این پایان نامه قطعه‌ای به طول ۲۳۷ باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از انجام ۳۵ سیکل PCR و تکثیر این ژن برای گیاهان در شکل (۳-۱۵) آورده شده است. جدول تجزیه واریانس ژن مس/روی سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان، در محیط کشت‌های مختلف و در دو مرحله رشدی در جداول ضمیمه (۱۵ تا ۱۷) آورده شده است.

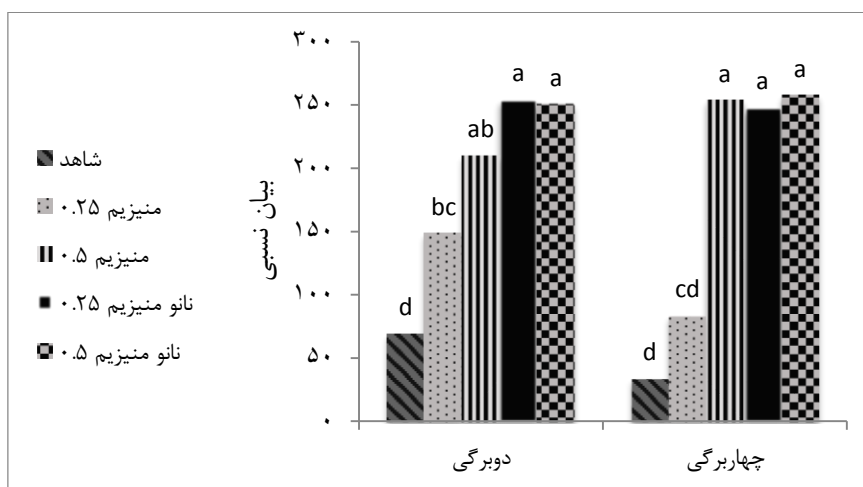
پانخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره منیزیم اکسید-آمنه یونسی گیاه



شکل ۳-۱۲. نتایج اثرات ساده ژن Fe-Superoxide dismutase در بافت برگ سویا.



شکل ۳-۱۳. نتایج مقایسه میانگین Fe-Superoxide dismutase در بافت لپه سویا.



شکل ۳-۱۴. نتایج مقایسه میانگین Fe-Superoxide dismutase در بافت ریشه سویا.

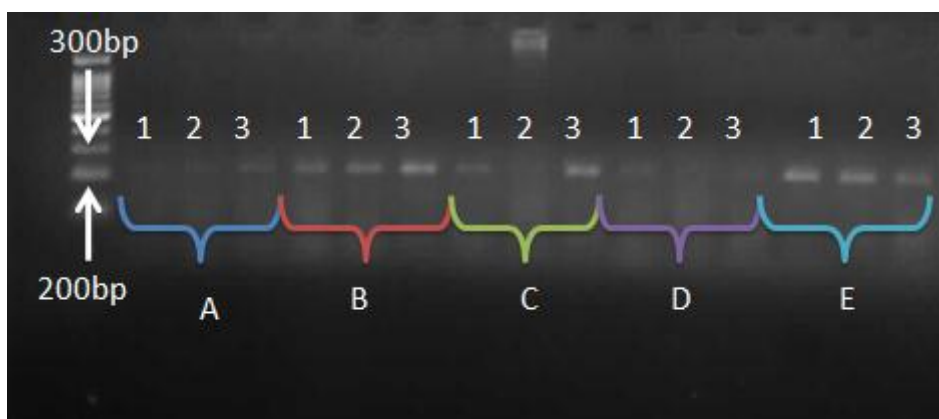
۱-۵-۳. نتایج تجریه واریانس ژن مس/رووی سوپر اکسید دیسموتاز در بافت برگ

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت برگ در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد همچنین اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ضمیمه ۱۵). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن مس/رووی سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن به طور معنی‌داری کاهش یافت. میزان بیان این ژن در تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهار برگی نسبت به مرحله دو برگی کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد و منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳-۱۶).

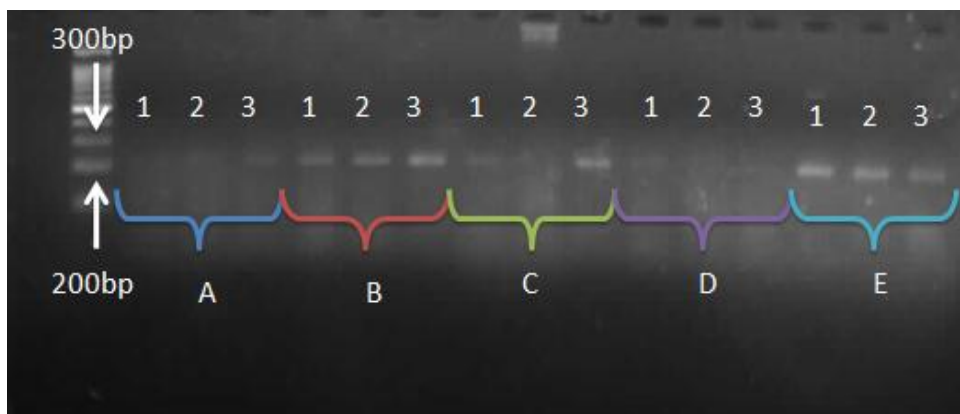
۲-۵-۳. نتایج تجریه واریانس ژن مس/رووی سوپر اکسید دیسموتاز در بافت لپه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت لپه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد همچنین اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ضمیمه ۱۶). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن مس/رووی سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن به طور معنی‌داری کاهش یافت. میزان بیان این ژن در تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهار برگی نسبت به مرحله دو برگی کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد و منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳-۱۷).

(الف)



(ب)



شکل ۳-۱۵. بررسی بیان ژن (Cu/Zn-Superoxide dimutase). الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن Mn-SOD بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۱۹۳ جفت باز می‌باشد، A، تیمار شاهد، B، تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر)، C، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر)، D، تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر)، E، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر)، عدد ۱، برگ، ۲، لپه، ۳، ریشه می‌باشد. (الف) الگوی بانندی حاصل در مرحله دو برگی (ب) الگوی بانندی حاصل در مرحله چهار برگی

۳-۵-۳. نتایج تجزیه واریانس ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز در بافت ریشه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد همچنین اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ضمیمه ۱۷). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن مس/روی سوپر اکسید دیسموتاز در هر دو سطح تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر

لیتر) و تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن در این تیمارها به طور معنی داری کاهش یافت. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد و منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل ۳-۱۸).

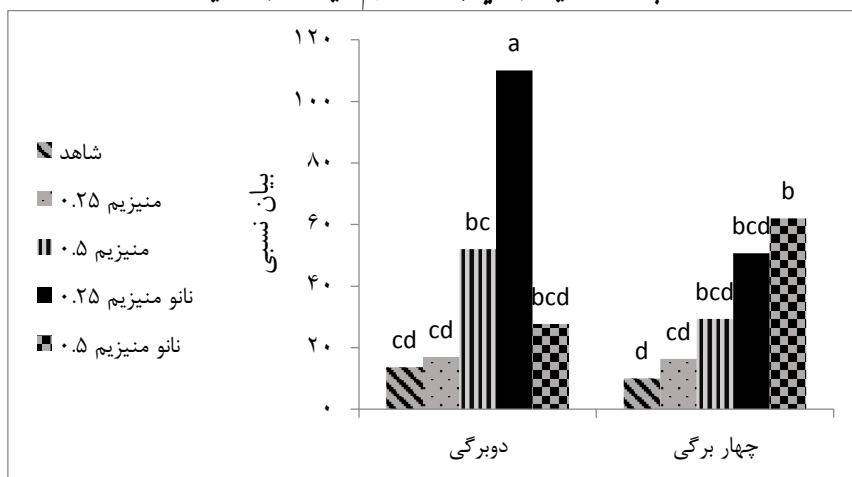
۳-۶. منگنز - سوپر اکسید دیسموتاز

ژن منگنز- سوپر اکسید دیسموتاز از گیاه سویا (*Glycine max. L*) طولی معادل ۱۰۰۱ جفت باز دارد، که پروتئین تجزیه کننده پراکسید هیدروژن، به طول ۲۴۱ اسید آمینه را کد می کند، طول قطعه تکثیری از روی cDNA با دو پرایمر FSOD2 و RSOD2 در این پایان نامه قطعه ای به طول ۲۳۷ باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از انجام ۳۵ سیکل PCR و تکثیر این ژن برای گیاهان در شکل (۳-۱۹) آورده شده است. جدول تجزیه واریانس ژن منگنز -سوپر اکسید دیسموتاز در گیاهان، در محیط کشت های مختلف و در دو مرحله رشدی در جدول ضمیمه (۱۸ تا ۲۰) آورده شده است.

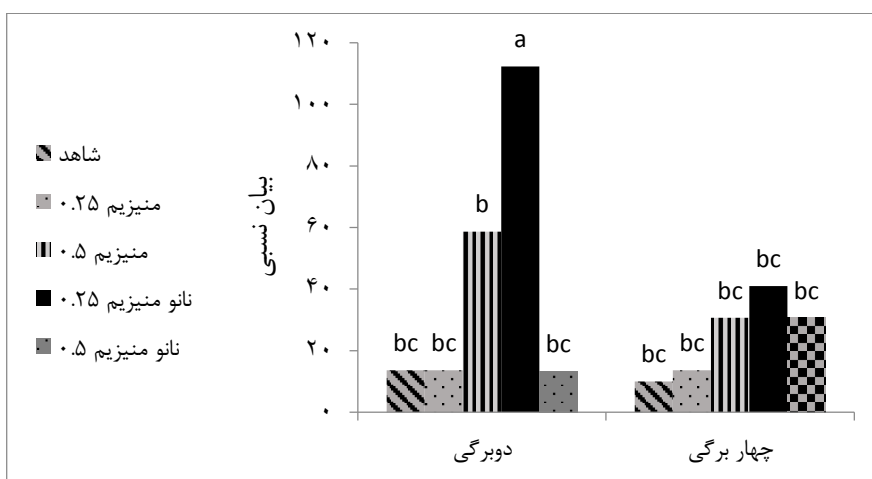
۳-۷-۱. نتایج تجزیه واریانس ژن منگنز - سوپر اکسید دیسموتاز در بافت برگ

نتایج حاصل نشان می دهد که میزان منیزیم در بافت برگ در سطح ۱ درصد معنی دار شد همچنین اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ضمیمه ۱۸). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن منگنز سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگی به مرحله چهار برگی میزان بیان این ژن کاهش یافت اما این کاهش معنی دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد و نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی افزایش یافت اما این افزایش معنی دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی تغییر نکرد (شکل ۳-۲۰).

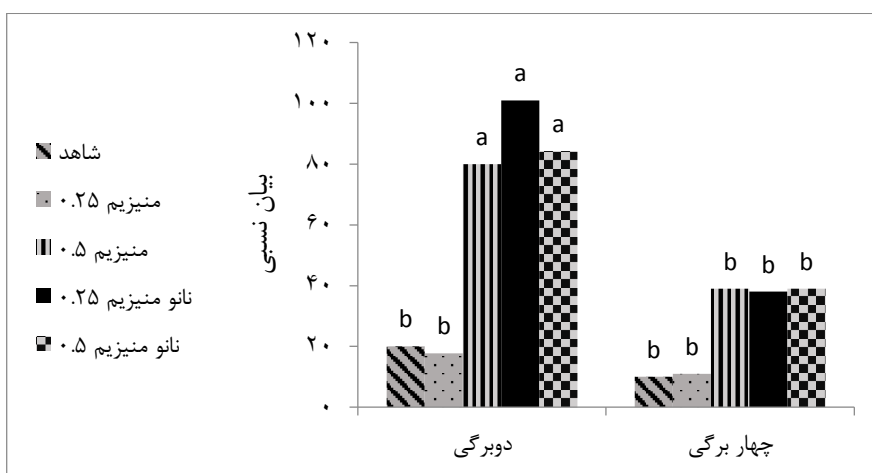
پانخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره منیزیم اکسید-آمنیونیتی گیاه



شکل ۳-۱۶. نتایج مقایسه میانگین Cu/Zn-Superoxide dismutase در بافت برگ سویا.



شکل ۳-۱۷. نتایج مقایسه میانگین Cu/Zn-Superoxide dismutase در بافت لپه سویا.



شکل ۳-۱۸. نتایج مقایسه میانگین Cu/Zn-Superoxide dismutase در بافت ریشه سویا.

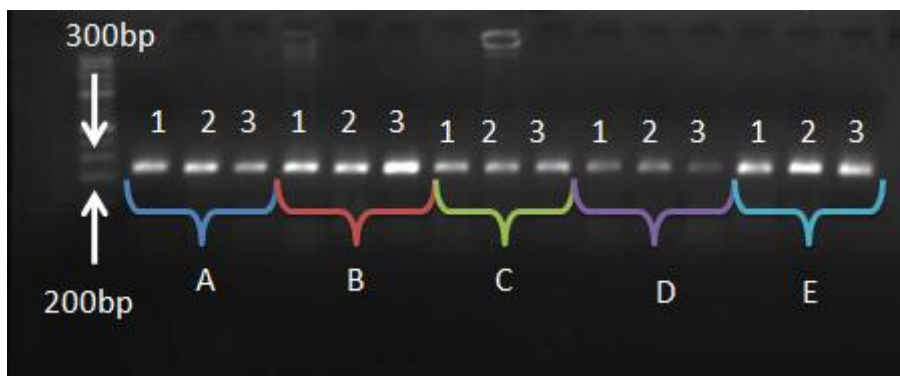
۲-۷-۳. نتایج تجریه واریانس ژن منگنز - سوپر اکسید دیسموتاز در بافت لپه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت لپه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد همچنین اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ضمیمه ۱۹). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن منگنز سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهارم برگ‌ها بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگ‌ها به مرحله چهارم برگ‌ها میزان بیان این ژن افزایش یافته است اما این افزایش معنی‌دار نبوده است. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد، نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) و منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی تفاوتی نداشت (شکل ۳-۲۱).

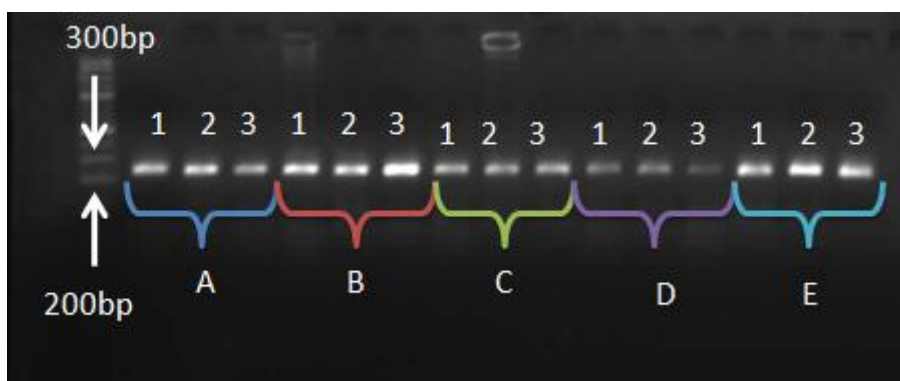
۳-۷-۳. نتایج تجریه واریانس ژن منگنز - سوپر اکسید دیسموتاز در بافت ریشه

نتایج حاصل نشان می‌دهد که میزان منیزیم در بافت ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد اما اثر متقابل منیزیم × مرحله رشدی در هیچ سطحی معنی‌دار نشد (جدول ضمیمه ۲۰). بنابراین بین تیمارها در مراحل رشدی مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین بین مراحل رشدی مختلف نشان داد میزان بیان ژن منگنز سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در مرحله دوبرگی بیشتر از سایر تیمارها است و با عبور گیاه از مرحله دو برگ‌ها به مرحله چهارم برگ‌ها میزان بیان این ژن کاهش می‌یابد اما این کاهش معنی‌دار نیست. میزان بیان این ژن در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) و منیزیم اکسید در دو سطح (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر) در طی دو مرحله رشدی افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود. میزان بیان این ژن در تیمار شاهد نیز افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۳-۲۲).

(الف)

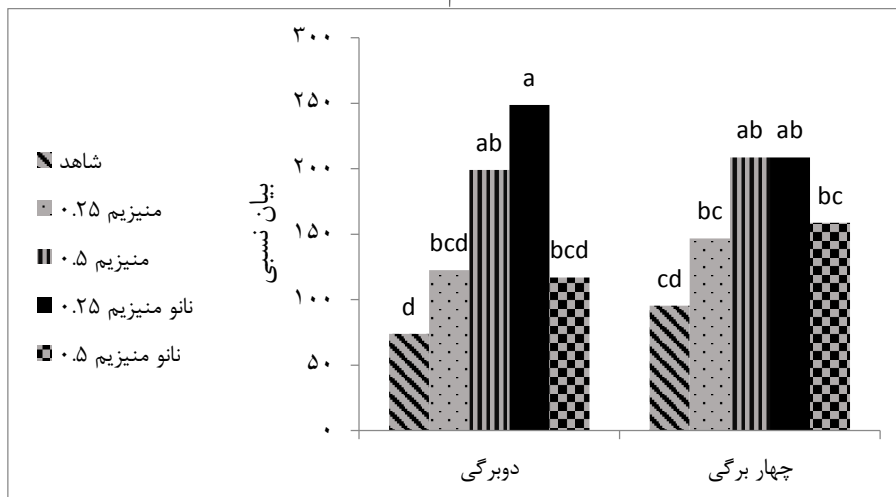


(ب)

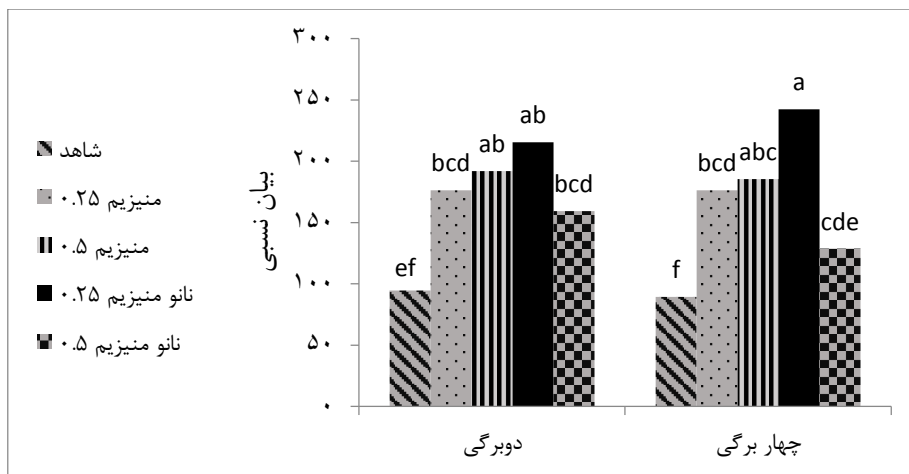


شکل ۳-۱۹. بررسی بیان ژن (Mn-Superoxide dimutase). الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن Mn-SOD بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۲۳۷ جفت باز می‌باشد، A، تیمار منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). B، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر). C، تیمار منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر). D، تیمار شاهد. E، تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر). عدد ۱، برگ. ۲، لپه. ۳، ریشه می‌باشد. (الف) الگوی بانندی حاصل در مرحله دو برگی (ب) الگوی بانندی حاصل در مرحله چهار برگی

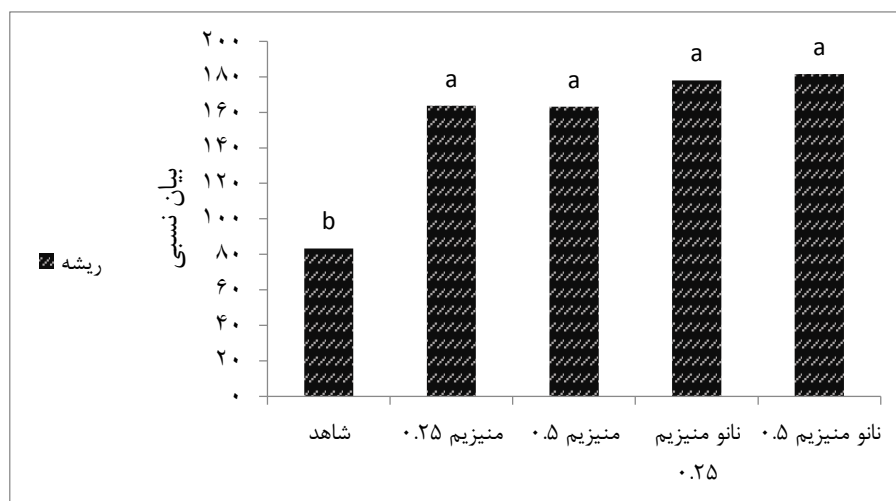
فصل سوم - نتایج



شکل ۳-۲۰. نتایج مقایسه میانگین Mn-Superoxide dismutase در بافت برگ سویا.



شکل ۳-۲۱. نتایج مقایسه میانگین Mn-Superoxide dismutase در بافت لپه سویا.



شکل ۳-۲۲. نتایج مقایسه میانگین Mn-Superoxide dismutase در بافت ریشه سویا.

فصل چهارم

بحث و پیشنهادات

امروزه، نانوذرات به طور فزاینده‌ای در حال تأثیرگذاری بر جامعه انسانی می‌باشند. نانوذرات مبتنی بر اکسیدهای فلزی به طور گسترده در بسیاری از برنامه‌های کاربردی مانند کاتالیزورها، نیمه‌رساناها، محصولات بهداشتی و در کشاورزی به عنوان نانوکودها مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین درک سلامت محیطی و جنبه‌های ایمنی زیستی نانومواد به یک مسئله حیاتی تبدیل شده است. در این مطالعه با اندازه‌گیری بیان برخی از ژن‌های درگیر در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن به تعیین سمیت احتمالی نانوذرات منیزیم-اکسید بر روی گیاهان سویا در محیط کشت هیدروپونیک پرداخته شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تیمارهای یک و دو گرم بر لیتر نانوذره موجب آسیب شدیدی به ریشه گیاه می‌گردند که این آسیب مانع از رشد گیاه و تکمیل مرحله دوبرگی در گیاه می‌گردد (شکل ۱۸ و ۱۹ ضمیمه). میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در بافت لپه و برگ از تمام تیمارها حتی نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) بیشتر بود. بیشتر بودن بیان ژن‌ها در این تیمار نسبت به نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) احتمالاً حاکی از این است که نانوذرات در غلظت‌های بالا به یکدیگر می‌چسبند و این ذرات قادر به عبور از کانال‌های پروتئین‌های ناقل نمی‌باشند بنابراین میزان بیان در این بافت‌ها نسبت به تیمار نانوذره منیزیم اکسید ۰/۲۵ گرم بر لیتر کمتر می‌باشد. در بافت ریشه ژن‌های مورد بررسی میزان بیان ژن در هر دو تیمار برابر بود که این موضوع نیز صحتی بر مدعای قبلی می‌باشد. همچنین مشاهده شد که ریشه‌های تیمار نانوذرات منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) نسبت به سایر تیمارها دچار پوسیدگی بیشتری شدند (شکل ۱۸، ۲۰ و ۲۱ ضمیمه) بنابراین میزان انتقال نانوذرات به سایر بخش‌های گیاه در این تیمار نسبت به سایر تیمارها کاهش یافته است.

۴-۱. ژن کاتالاز

کاتالاز پورفیرینی آهن‌دار و تترامر است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند و در پراکسی-زوم تمام گیاهان قرار دارد اما در دانه‌های روغنی علاوه بر پراکسی‌زوم، در گلی‌اکسی‌زوم‌ها نیز وجود دارد.

کاتالاز آنزیمی مهم در تمام دانه‌های روغنی است که به تجزیه پراکسید هیدروژن حاصل از بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب در گلی‌اکسی‌زوم‌ها می‌پردازد [۶۴].

تاکنون مطالعه‌ای روی بیان ژن کاتالاز در گیاه سویا و در شرایط مشابه صورت نگرفته است. نتایج این مطالعه حاکی از این بود که میزان بیان ژن کاتالاز در بافت برگ، در مرحله دو برگی و در تیمار نانوذره ۰/۲۵ گرم بر لیتر افزایش یافت و با ورود گیاه به مرحله چهار برگی میزان کاهش یافت. افزایش بیان ژن کاتالاز در برگ گیاه و در مرحله دوبرگی حاکی از فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز برای خنثی نمودن سطوح بالای پراکسید هیدروژن در این بافت می‌باشد. به نظر می‌رسد با رسیدن گیاه به مرحله چهاربرگی به دلیل تخریب یا غیرفعال شدن آنزیم در حضور نانوذرات، بیان ژن کاهش می‌یابد.

در بافت لپه و در طی مراحل رشدی متفاوت افزایش بیان معنی‌داری در ژن کاتالاز مشاهده نشد که این امر حاکی از این است که در لپه گیاهان روغنی بیان این ژن بسیار بالا می‌باشد. مؤید این مطلب آزمایش پنا و همکاران روی کوتیلدون دانه‌رست‌های آفتابگردان است که میزان بیان ژن کاتالاز (*CATA1* و *CATA2*) در تیمار کلرید مس تحت تأثیر قرار نگرفت [۶۴]. همچنین گچو و همکاران بیان داشتند که با افزایش پراکسید هیدروژن در سلول ابتدا سایر آنزیم‌ها و ترکیبات غیر آنزیمی تجزیه کننده این نوع اکسیژن فعال، بیان می‌شوند و میزان بیان ژن کاتالاز در صورتی افزایش می‌یابد که غلظت پراکسید هیدروژن بسیار بالا باشد چرا که کاتالاز این توانایی را دارد که پراکسید هیدروژن را تجزیه نماید بدون اینکه قدرت تجزیه‌کنندگی‌اش کاهش یابد [۶۷].

۴-۲. ژن پراکسیداز

پراکسیدازهای گیاهی گلیکوپروتئین‌های هم‌دار و مونومری هستند که توسط شمار زیادی از خانواده‌های چند ژنی رمزگذاری می‌شوند. در گیاه سویا پراکسیدازها در پراکسی‌زوم‌ها، دیواره سلولی و تونوپلاست یافت می‌شوند. آنزیم پراکسیداز نیز مانند آنزیم کاتالاز به تجزیه پراکسید هیدروژن می‌پردازد [۶۸].

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمارهای منیزیم (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم بر لیتر) در هر دو مرحله دو و چهار برگی بیان ژن پراکسیداز در بافت‌های مورد مطالعه را همراه داشتند که این طور به نظر می‌رسد که در تیمار با

نانوذرات نقش پاسخی پراکسیداز در قیاس با کاتالاز در جهت سمیت زدایی پراکسید هیدروژن تولیدی پر رنگ تر است.

۴-۳. ژن سوپر اکسید دیسموتاز - آهن دار

بیان این ژن در هر دو مرحله دو و چهار برگی، در حضور غلظت ۰/۲۵ گرم بر لیتر نانوذره منیزیم اکسید در بافت های برگ و لپه افزایش فاحشی نشان داد که خود حاکی از شکل گیری تنش حتی در این غلظت پایین نانوذره است که افزایش بیان حداقل ۶۰ درصدی ژن را به همراه داشته است تا سوپر اکسیدهای شکل گرفته را به نوعی خنثی نماید. عدم پاسخ به غلظت بالاتر نانوذره (۰/۵ گرم بر لیتر) مجدداً حاکی از میل ترکیبی نانوذرات در غلظت های بالاتر را نشان می دهد.

۴-۴. ژن مس / روی سوپر اکسید دیسموتاز

نتایج نشان داد که فقط تیمار نانوذره منیزیم اکسید (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در برگ و لپه گیاهان و در مرحله دوبرگی موجب افزایش بیان این ژن گردید و با ورود گیاه به مرحله چهار برگی میزان بیان کاهش یافت. تیمار نانوذره و منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) به همراه تیمار نانوذره (۰/۲۵ گرم بر لیتر) در ریشه گیاهان و در مرحله دو برگی موجب افزایش بیان این ژن گردیدند که با ورود گیاه به مرحله چهار برگی این میزان کاهش یافت. سوپر اکسید دیسموتاز آنزیمی است که با گذشت زمان و به آرامی توسط پراکسید هیدروژن غیر فعال می شود [۶۹ و ۷۰].

۴-۵. منگنز - سوپر اکسید دیسموتاز

در بررسی بیان این ژن، مشاهده شد که بیات این ژن در تمامی تیمارها نسبت به شاهد معنی دار نشد.

۴-۶. نتیجه گیری کلی:

استفاده از نانوذرات منیزیم اکسید موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می گردد زیرا آنزیم های مهم درگیر در تنش اکسیداتیو را فعال می کند. نانوذرات منیزیم اکسید در غلظت (۰/۲۵ گرم بر لیتر) موجب ایجاد بیشترین تنش در اندام های مورد مطالعه (برگ، لپه و ریشه) گیاهان سویا شدند. منیزیم اکسید در غلظت

(۰/۵ گرم بر لیتر) نیز موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه گردید اما این تنش نسبت به نانوذرات کمتر بود و در برخی از ژن‌ها با رسیدن گیاه به مرحله چهارم برگ، این تنش تعدیل شد.

۴-۷. پیشنهادات

- مطالعه تغییرات سطوح پروتئین سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز
- تکرار آزمایش برای غلظت نانوذره ۰/۵ گرم بر لیتر در حضور پروب تولید کننده امواج فرا صوت تا مانع از گردهم‌آیی نانوذرات در غلظت‌های بالاتر گردد.

-انجام Real Time PCR

- مطالعه بیان خانواده‌های ژنی و تعیین چگونگی تغییرات آنها و تعیین اینکه کدام‌ها به طور اختصاصی در پاسخ دهی به نانوذرات منیزیم مؤثر هستند و آیا اگر نانوذره‌ی دیگری استفاده شود همین پاسخ‌ها را از همین ژن‌ها می‌گیریم یا خیر. به عبارت دیگر، آیا پاسخ در برابر نانوذرات فارغ از نوع آنها، مشابه است یا متفاوت.

پانچ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره نیتروژن اکسید-آمنه یوسفی گیاه

ضمائم

جدول ضمیمه ۱: عناصر ماکرو مورد استفاده در محلول هوگلند

| نام ماده شیمیایی | فرمول ماده شیمیایی | وزن نمک مورد نیاز در ۱۰۰۰ میلی لیتر |
|-------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| نیترات پتاسیم | KNO_3 | ۰/۲ |
| نیترات کلسیم | $CaN_2O_6 \cdot 4H_2O$ | ۰/۰۰۹ |
| آمونیم دی هیدروژن فسفات | $NH_4H_2PO_4$ | ۰/۶ |

جدول ضمیمه ۲: عناصر میکرو مورد نیاز در محلول هوگلند

| نام ماده شیمیایی | فرمول ماده شیمیایی | وزن نمک مورد نیاز (گرم در لیتر) | حجم مورد نیاز از محلول های میکرو (میلی لیتر) |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------------|--|
| سولفات آهن | $FeSO_4 \cdot 6H_2O$ | ۰/۳۶۴ | ۱۰۰ |
| اتیلن دی آمین تترا استیک اسید | EDTA | ۰/۸۹ | ۱۰۰ |
| اسید مولیبدیک | $H_2MoO_4 \cdot 4H_2O$ | ۰/۲۰۱ | ۱۰۰ |
| اسید بوریک | H_3BO_3 | ۰/۰۳ | ۱۰۰ |
| کلرور منگنز | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | ۰/۰۱۸ | ۱۰۰ |
| سولفات روی | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | ۰/۰۲۱ | ۱۰ |
| سولفات مس | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | ۰/۰۰۹ | ۱۰ |

جدول ضمیمه ۳. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن 18s در برگ گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۰/۵ | ۰/۳ | ۰/۶ | ۲ | تکرار |
| ۰/۳۵ | ۰/۲۱ | ۰/۸ | ۴ | منیزیم |
| ۴/۱۸ | ۰/۵۹ | ۴/۷ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۰/۹۴ | ۰/۱۳ | ۰/۱ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱/۵۳ | ۰/۲۱ | ۰/۸ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۳/۰۶ | ۰/۴۳ | ۰/۸ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۰/۱۴۱ | ۱/۱۳ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۴. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن 18s در لپه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|-------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۰/۰۲۲ | ۰/۰۳ | ۰/۰۶۶ | ۲ | تکرار |
| ۰/۶ | ۰/۸ | ۳/۲ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۵۴ | ۱/۳۲ | ۱۰/۶ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۳/۱۵ | ۲/۷ | ۲/۷ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱/۲ | ۱/۰۳ | ۴/۱ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۴/۵۴ | ۳/۹ | ۷/۸ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۰/۸۵ | ۶/۸۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۵. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن 18s در ریشه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|------|----------------|--------------|------------|----------------|
| ۰/۱۶ | ۰/۳ | ۰/۶ | ۲ | تکرار |
| ۰/۰۵ | ۰/۱۱ | ۰/۴ | ۴ | منیزیم |
| ۳/۰۳ | ۱/۸۴ | ۱۴/۷۳ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۳ | ۰/۰۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| | | ۶۳ | | |

پانچ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانو ذره منیزیم اکسید-آزمایش یونی گیاه

| | | | | |
|------|------|------|---|---------------------|
| ۰/۴۷ | ۰/۲۸ | ۱/۱۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۰/۳۸ | ۰/۲۳ | ۰/۴ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۰/۶ | ۴/۸۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۶. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Catalase در برگ گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۲۱/۰۸ | ۷۹۰۶/۰۳ | ۱۵۸۱۲/۰۶ | ۲ | تکرار |
| ۲۱/۰۱ | ۷۸۷۸/۸۶ | ۳۱۵۱۵/۴۶ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۰۸ | ۳۷۴/۹۹ | ۲۹۹۹/۹۳ | ۸ | خطای اول |
| ۰/۵۸ | ۲۰۲/۸ | ۲۰۲/۸ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱۱/۲۵** | ۳۹۰۲/۹ | ۱۵۶۱۱/۸۶ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۱۵/۸۲** | ۵۴۹۰/۷ | ۱۰۹۸۱/۴ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۳۴۶/۹۹ | ۲۷۷۵/۹ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۷. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Catalase در لپه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۱۵/۱۳** | ۳۹۷۹/۲۳ | ۷۹۵۸/۴۶ | ۲ | تکرار |
| ۱/۱۱ ^{n.s} | ۲۹۱/۸۶ | ۱۱۶۷/۴۶ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۷۹ ^{.s} | ۲۶۲/۹ | ۲۱۰۳/۵ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۷/۸۵* | ۱۱۵۳/۲ | ۱۱۵۳/۲ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۲/۶۳ ^{n.s} | ۳۸۶/۲ | ۱۵۴۴/۸ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۲۲/۹۲** | ۳۳۶۸/۱ | ۶۷۳۶/۲ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۱۴۶/۹۷ | ۱۱۷۵/۸ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۸ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Catalase در ریشه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۶/۹* | ۸۴۴۹/۳۰ | ۱۶۸۹۸/۶ | ۲ | تکرار |
| ۴/۶۹* | ۵۷۴۵/۴۶ | ۲۲۹۸۱/۸۶ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۰۷ ^{n.s} | ۱۲۲۲/۹۶ | ۹۷۸۳/۷۳ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۲/۱۰ ^{n.s} | ۲۳۹۴/۱۳ | ۲۳۹۴/۱۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱/۶۲ ^{n.s} | ۱۸۴۳/۴۶ | ۷۳۷۳/۸۶ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۵/۸۳* | ۶۶۴۲/۲۳ | ۱۳۲۸۴/۴۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۱۱۳۹/۸۱ | ۹۱۱۸/۵۳ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۹ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Peroxidase در برگ گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۰/۵۶ ^{n.s} | ۱۱۴/۷۰ | ۲۲۹/۴۰ | ۲ | تکرار |
| ۱۶۰/۹۸ | ۳۲۷۳۱/۲۰ | ۱۳۰۹۲۴/۸۰ | ۴ | منیزیم |
| ۰/۹۳ ^{n.s} | ۲۰۳/۳۲ | ۱۶۲۶/۶۰ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۰/۴۱ ^{n.s} | ۹۰/۱۳ | ۹۰/۱۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۲/۸۰ ^{n.s} | ۶۱۲/۸۰ | ۲۴۵۱/۲۰ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۰/۴۴ ^{n.s} | ۹۶/۶۳ | ۱۹۳/۲۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۲۱۸/۹۲ | ۱۷۵۱/۴۰ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۰ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Peroxidase در لپه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|----------------|
| ۴/۱۵ ^{n.s} | ۱۲۹۵/۰۳ | ۲۵۹۰/۰۶ | ۲ | تکرار |
| ۱۱۱/۱۶** | ۰/۴۵ | ۱۲۷۳۶۹/۸۰ | ۴ | منیزیم |
| ۰/۹۱ ^{n.s} | ۲۸۶/۴۵ | ۲۲۹۱/۶۰ | ۸ | تکرار × منیزیم |

پانخ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانو ذره منیزیم اکسید - آمیزه یونسی گیاه

| | | | | |
|----------|-----------|-----------|---|---------------|
| ۷۳.۴۸** | ۲۳۰.۷۴/۱۳ | ۲۳۰.۷۴/۱۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۲۰/۷۷** | ۶۵۲۱/۸۸ | ۲۶۰.۸۷/۵۳ | ۴ | مرحله رشدی × |
| | | | | منیزیم |
| ۳/۳۱ n.s | ۱۰۳۹/۰۳ | ۲۰۷۸/۰۶ | ۲ | تکرار × مرحله |
| | | | | رشدی |
| | ۳۱۴/۰۳ | ۲۵۱۲/۲۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۱. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Peroxidase در ریشه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|----------|----------------|--------------|------------|----------------|
| ۴/۳* | ۶۲۰/۸۰ | ۱۲۴۱/۶۰ | ۲ | تکرار |
| ۲۵۸/۳** | ۳۶۹۴۴/۸۳ | ۱۴۷۷۷۹/۳۳ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۰۸ n.s | ۱۴۳ | ۱۱۴۴/۰۶ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۱۹۸/۸۱** | ۲۶۴۰.۳/۳۳ | ۲۶۴۰.۳/۳۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۴۵/۱۹** | ۶۰۰.۱/۳۳ | ۲۴۰۰.۵/۳۳ | ۴ | مرحله رشدی × |
| | | | | منیزیم |
| ۲/۸۲ n.s | ۳۷۴/۹۳ | ۷۴۹/۸۶ | ۲ | تکرار × مرحله |
| | | | | رشدی |
| | ۱۳۲/۸۰ | ۱۰۶۲/۴۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۲. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Fe-Superoxid dimutase در برگ گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|----------|----------------|--------------|------------|----------------|
| ۱/۷۱ n.s | ۳۸۴/۴۰ | ۷۶۸/۸۰ | ۲ | تکرار |
| ۱۸۹/۴۱** | ۴۲۵۰.۳/۹۵ | ۱۷۰۰۱۵/۸۰ | ۴ | منیزیم |
| ۰/۵۰ n.s | ۲۲۴/۴ | ۱۷۹۵/۲۰ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۱۳/۳۲** | ۵۹۶۴/۳۰ | ۵۹۶۴/۳۰ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱/۵۷ n.s | ۷۰۳/۷۱ | ۲۸۱۴/۸۶ | ۴ | مرحله رشدی × |
| | | | | منیزیم |
| ۰/۵۶ n.s | ۲۵۰ | ۵۰۰ | ۲ | تکرار × مرحله |
| | | | | رشدی |
| | ۴۴۷/۶۶ | ۳۵۸۱/۳۳ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۳ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Fe- Superoxid dimutase در لپه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|----------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۱/۶۱ ^{n.s} | ۵۷۱/۰۳ | ۱۱۴۲/۰۶ | ۲ | تکرار |
| ۱۰۸/۴۵ ^{**} | ۳۸۲۶۹/۸۶ | ۱۵۳۰۷۹/۴۶ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۱۱ ^{n.s} | ۳۵۲/۸۶ | ۲۸۲۲/۹۳ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۲۴/۵۸ ^{**} | ۷۸۰۸/۵۳ | ۷۸۰۸/۵۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۲/۰۵ ^{n.s} | ۶۵۰/۳۶ | ۲۶۰۱/۴۶ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۰/۷۵ ^{n.s} | ۲۳۸/۶۳ | ۴۷۷/۲۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۳۱۷/۷۱ | ۲۵۴۱/۷۳ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۴ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Fe- Superoxid dimutase در ریشه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۱/۲ ^{n.s} | ۴۸۳/۶۰ | ۹۶۷/۲۰ | ۲ | تکرار |
| ۱۲۶/۸ ^{**} | ۵۰۷۷۸/۵۸ | ۲۰۳۱۱۴/۳۳ | ۴ | منیزیم |
| ۰/۷۵ ^{n.s} | ۴۰۰/۴۳ | ۳۲۰۳/۴۶ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۱/۷۹ ^{n.s} | ۹۵۲/۰۳ | ۹۵۲/۰۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۴/۸۴ [*] | ۲۵۷۹/۲۸ | ۱۰۳۱۷/۱۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۰/۴۹ ^{n.s} | ۲۵۲/۷۳ | ۵۱۹/۴۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۵۳۲/۹۸ | ۴۲۶۳/۸۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۵. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Cu/Zn Superoxid dismutase در برگ گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۳/۱۱ ^{n.s} | ۶۴۶/۶۳ | ۱۲۹۳/۲۶ | ۲ | تکرار |
| ۲۱/۷ ^{**} | ۴۵۱۴/۵۵ | ۱۸۰۵۸/۲۰ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۳۱ ^{n.s} | ۲۰۷/۳۰ | ۱۶۵۸/۴۰ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۵/۲۷ [*] | ۸۳۲/۱۳ | ۸۳۲/۱۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱۱/۲۹ ^{**} | ۱۷۸۱/۸۸ | ۷۱۲۷/۵۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۳/۵۲ ^{n.s} | ۵۵۶/۰۳ | ۱۱۱۲/۰۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۱۵۷/۷۸ | ۱۲۶۲/۲۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۶. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Cu/Zn Superoxid dismutase در لپه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۳/۳۴ ^{n.s} | ۳۲۸/۶۳ | ۶۵۷/۲۶ | ۲ | تکرار |
| ۴۳/۲ ^{**} | ۴۲۴۹/۲ | ۱۶۹۹۶/۸ | ۴ | منیزیم |
| ۰/۴۸ ^{n.s} | ۹۸/۱۷ | ۷۸۵/۴ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۶/۶۰ [*] | ۱۳۴۶/۷۰ | ۱۳۴۶/۷ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱۱/۵۸ ^{**} | ۲۳۵۶/۵۳ | ۹۴۲۶/۱۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۱/۸۸ ^{n.s} | ۳۸۴/۷ | ۷۶۹/۴ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۲۰۴/۱۵ | ۱۶۳۳/۲۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۷ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Cu/Zn Superoxid dismutase در ریشه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۹/۲۳** | ۱۵۱۹/۶۳ | ۳۰۳۹/۲۶ | ۲ | تکرار |
| ۲۶/۹** | ۴۴۳۷/۱۱ | ۱۷۷۴۸/۴۶ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۰۴ ^{n.s} | ۱۶۴/۳۴ | ۱۳۱۴/۷۳ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۵۲/۳۹** | ۸۲۶۶/۸۰ | ۸۲۶۶/۸۰ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۵/۵۶* | ۸۷۶/۸۸ | ۳۵۰۷/۵۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۸/۲۱* | ۱۲۹۶/۱۰ | ۲۵۹۲/۲۰ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۱۵۷/۸۰ | ۱۲۶۲/۴۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۸ . جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Mn Superoxid dismutase در برگ گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۴۶/۳۲** | ۱۲۱۲۱/۲۳ | ۲۴۲۴۲/۴۶ | ۲ | تکرار |
| ۱۱/۸** | ۹۷۵۵/۲۱ | ۳۹۰۲۰/۸۶ | ۴ | منیزیم |
| ۳/۱۵ ^{n.s} | ۸۲۵/۱۹ | ۶۶۰۱/۵ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۱/۵۴ ^{n.s} | ۴۰۳/۳۳ | ۴۰۳/۳۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۱۰/۶۶** | ۲۷۸۸/۲۵ | ۱۱۱۵۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۲/۱۲ ^{n.s} | ۵۵۴/۶۳ | ۱۱۰۹/۲۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۲۶۱/۶۷۵ | ۲۰۹۳/۴ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۱۹. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Mn Superoxid dismutase در لپه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۱۲/۸** | ۵۳۲۰/۲۳ | ۱۰۶۴۰/۴۶ | ۲ | تکرار |
| ۳۴/۹** | ۱۴۵۰۷/۰۸ | ۵۸۰۲۸/۳۳ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۱۷ ^{n.s} | ۴۱۴/۷ | ۳۳۱۷/۸۶ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۵/۰۴* | ۱۷۷۸/۷ | ۱۷۷۸/۷ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۶/۵۵* | ۲۳۱۳/۲۸ | ۹۲۵۳/۱۳ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۰/۸۵ ^{n.s} | ۲۹۹/۷ | ۵۹۹/۴ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۳۵۳/۰۳ | ۲۸۲۴/۲۶ | ۸ | خطا |

جدول ضمیمه ۲۰. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن Mn Superoxid dismutase در ریشه گیاهان سویا تیمار شده با منیزیم اکسید

| F | میانگین مربعات | مجموع مربعات | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|----------------|--------------|------------|---------------------|
| ۸/۱۵** | ۴۱۸۲/۵۳ | ۸۳۶۵/۰۶ | ۲ | تکرار |
| ۳۶/۴** | ۱۸۷۱۰/۲ | ۷۴۸۴۰/۸ | ۴ | منیزیم |
| ۱/۱۷ ^{n.s} | ۵۱۲/۷ | ۴۱۰۱/۶ | ۸ | تکرار × منیزیم |
| ۶/۵۳* | ۲۸۶۱/۶۳ | ۲۸۶۱/۶۳ | ۱ | مرحله رشدی |
| ۲/۲۶ ^{n.s} | ۹۸۸/۹۶ | ۳۹۵۵/۸۶ | ۴ | مرحله رشدی × منیزیم |
| ۰/۱۶ ^{n.s} | ۷۰/۵۳ | ۱۴۱/۰۶ | ۲ | تکرار × مرحله رشدی |
| | ۴۳۸/۳ | ۳۵۰۶/۹۳ | ۸ | خطا |



شکل ۱۸- مقایسه میان طول ریشه و ساقه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات. تیمار ۱ و ۲ گرم بر لیتر موجب آسیب شدید به ریشه گیاهان می‌گردند.



شکل ۱۹- گیاهان تیمار شده با ۱ گرم بر لیتر نانوذره منیزیم اکسید.

(الف)



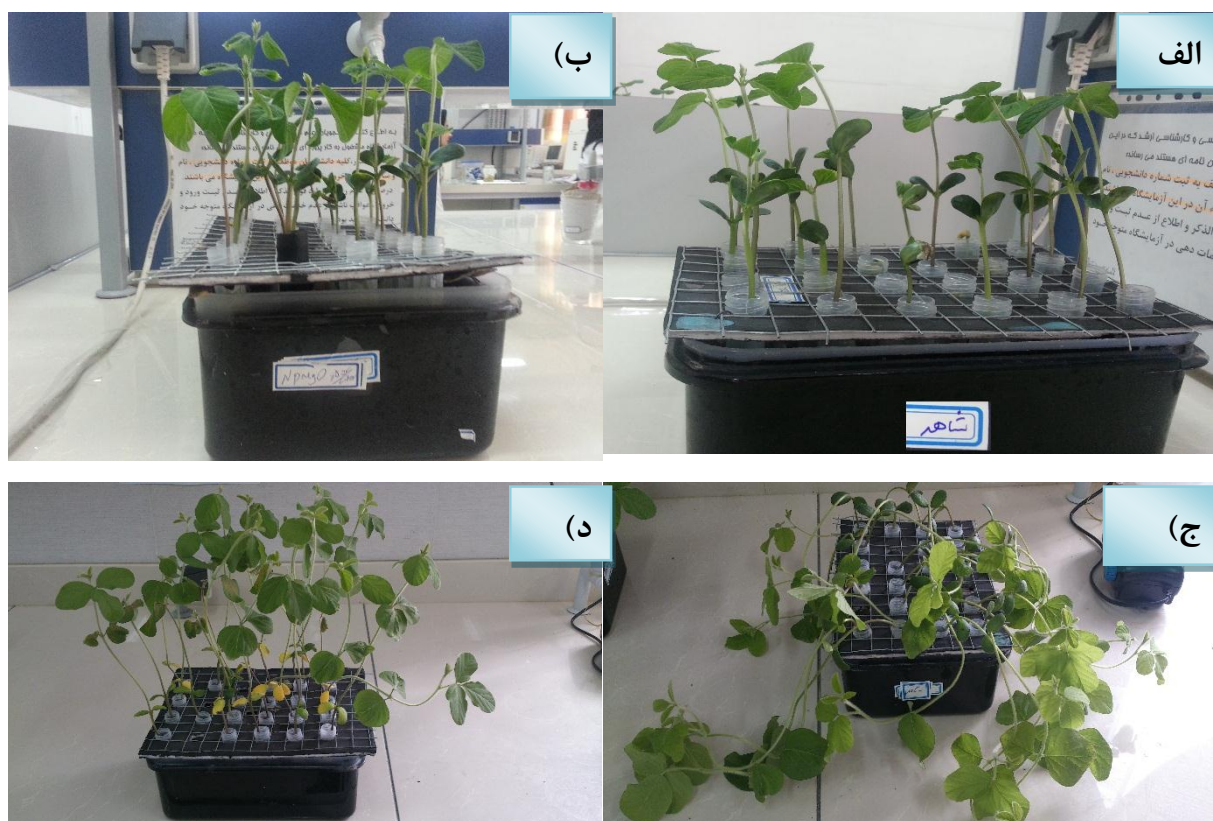
(ب)



شکل ۲۰- ریشه گیاهان تیمار شده با نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در دو مرحله رشدی. الف)

دوبرگی (ب) چهار برگی

(الف)



شکل ۲۱- گیاهان تیمار شده با نانوذره منیزیم اکسید در دو برگگی و چهار برگگی در مقایسه با شاهد. (الف) شاهد در مرحله دو برگگی (ب) نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله دو برگگی. (ج) شاهد در مرحله چهار برگگی. (د) نانوذره منیزیم اکسید (۰/۵ گرم بر لیتر) در مرحله چهار برگگی.

پانچ مولکولی گیاه سویا در تیمار با نانوذره نیتروژن اکسید-آمنه یوسفی گیاه

منابع

- 1- Buzea c. Pacheco I. I. and Robbi K. (2007). "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity." *Biointerphases*. 2 (4): pp MR 17-MR 71.
- 2- Predicala B. (2007). "Nanotechnology: Potential for Agriculture". Prairie Swine Centre Inc, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, pp 123-134.
- 3- Mongillo, J. (2007). "Nanotechnology 101".
- 4- Shemetov A. Nabiev A. I. and Sukhanova A. (2012). "Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles." *ACS Nano* 6, pp 4585-4602.
- 5- Petersen E. J. Nelson B.C. (2010). "Mechanisms and measurements of nanomaterial-induced oxidative damage to DNA" *Anal Bioanal* 398, pp 613-650.
- 6- Jarrett R. F. (2006). "Viruses and lymphoma/leukaemia." *Pathology* 208, pp 176-186.
- 7- Monica R. C. Cremonini R. (2009). "Nanoparticles and higher plants." *Caryology* 62(2), 161-165.
- ۸- مهري چروده، م. بنی نعيمه، س. بنی نعيمه، م. (۱۳۹۲). اولين همایش ملی نانوتکنولوژی مزایا و کاربردها
- 9- Biswal S.K. Nayak A.K. Parida U.K. Nayak P.L.(2012). "Applications of nanotechnology in agriculture and food science." *International Journal of Science Innovations and Discoveries* 2(1), pp 21-36.
- 10- Khot L.R Sankaran S. Maja J.M. Ehsani R. Schuster E. W. (2012). "Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review." *crop protection* 35, pp 64-70.
- 11- Bergeron S. Archambault E. (2005). "Canadian Stewardship Practices for Environmental Nanotechnology."
- 12- Landsiedel R. Kapp M. D. Schulz M. Wiench K. and Oesch F. (2009). "Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations- Many questions, some answers." *Mut Research* 681, pp 241-258.
- 13- Oberdörster G. (2002). "Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles." *Inhalation Toxicol* 14; pp 29-56.
- 14- Turrens, J. F. (2003). "Topical Review Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *Physiol* 552(2), pp 335-344.
- 15- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach *Agriculture, Ecosystems and Environment* . Vol 106 pp: 119–133.
- 16- Zhao F. Guo S. Zhang H. Zhao Y. (2006). "Expression of yeast SOD2 in transgenic rice results in increased salt tolerance." *Plant Science* 170, pp 216-224.
- 17- Fridovich I. (1989). "Superoxide dismutases: An adaptation to a paramagnetic gas." *Biol Chem* 264, pp 7761-7764.
- 18- Hall D. O. Rao K. K. (1998). "Photosynthesis. Edward Arnold, England."
- 19- Endo T. Shikana T. Takabayashi A. Asada K. Sato F. (1999). "The role of chloroplastic NAD (P) H dehydrogenase in photoprotection." *FEBS Letters*, pp 457-508.
- 20- Jimenez A. Hernandez J. A. Pastori G. Rio L. A. D. Sevilla F. (1998). "Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea Leaves." *Plant Physiology* 118, pp 1327-1335.
- 21- Anisimov V. N. Popovich I. G. Zabezhinski I. G. Anisimov M. A. Vesnushkin S. V. Vinogradova I. A. (2006). *Biochim. Biophys* 1757, pp 573-589.
- 22- Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." *Plant Physiology* 14, pp 312-322.
- 23- Gupta P. K. (2002). "Cell and Molecullar Biology." Rastogi Publications, India.
- 24- Vranova E. Inzé D. Breusegem, F.V. (2002). "Signal transduction during oxidative stress." *Experimental Botany* 53(372), pp 1227-1236.

- 25- Rodríguez-Serrano M. Romero-Puertas M. C. Pazmiño D. M. Testillano, P. S. Risueno M. C. del Río L. A. Sandalio, L. M. (2009). "Cellular Response of Pea Plants to Cadmium Toxicity: Cross Talk between Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, and Calcium." *Plant Physiology* **150**, pp 229-243.
- 26- WU S. Y. Brewer M. S. (1994). "Soy protein isolate antioxidant effect on lipid peroxidation of ground beef and microsomal lipids." *Food Science* **59**(4), pp 702-706.
- 27- Dat J. Vandenabeele S. Vranova E. Van Montagu M. Inzé D. Van Breusegem F. (2000). "Dual action of the active oxygen species during plant stress." *Cell. Mol. Life Sci* **57**, pp 779–795.
- 28-. Bolwell G.P. (1999). "Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses." *Curr.Opin. Plant Biol*, **2**: pp 287–294.
- 29-. Mittler R. (2002). "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance." *Trends in plant science* **7**(9), pp. 405-410.
- 30-. Anwar Hossain M. Teixeira da Silva J.A. and Fujita M. (2011). "Glyoxalase System and Reactive Oxygen Species Detoxification System in Plant Abiotic Stress Response and Tolerance: An Intimate Relationship". *Abiotic Stress in Plants*, pp. 235-266.
31. Corpas F.J. Barroso. J.B. and del Río. L.A. (2001). "Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells." *Trend in plant science* **6**(4) : pp. 145-150.
- 32-. Chelikania P. Fitab I. and Loewen P.C. (2004). "Diversity of structures and properties among catalases." *Cell. Mol. Life Sci* **61**: pp. 198-208.
- 33-. Wolfe-Simon F. Grzebyk D. Schofield O. Falkowski P.G. (2005). "The role and evolution of superoxide dismutase in algae." *Phycol* **41**: pp. 453-465.
- 34-. Xiang H. Zhang R. Li N. Vossbrinck Ch. R. (2014) "Searching for convergent evolution in manganese superoxidase dismutase using hydrophobic cluster analysis." *Genet Mol Biol* **37**(2): pp. 460-474.
- 35-. Myouga F. Hosoda C. Umezawa T. Iizumi H. Kuromori T. Motohashi R. Shono Y. Nagata N. Ikeuchi M. and Shinozaki K.A. (2008). "Heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*". *plant cell* **20**: p. 3148-3162.
- 36-. Thomas D. J. Avenson T. J. Thomas J. B. Herbert S. K. (1998). "A Cyanobacterium Lacking Iron Superoxide Dismutase Is Sensitized to Oxidative Stress Induced with Methyl Viologen but Is Not Sensitized to Oxidative Stress Induced with Norflurazon." *Plant Physiology* **116**(4): pp. 1593-1602.
- 37-. Armbruster U. Hertle A. Makarenko E. Zuhlke J. Pribil M. Dietzmann A. Schliebner I. Aseeva E. Fenino E. Scharfenberg M. Voigt C. Leister D. (2009). "Chloroplast proteins without cleavable transit peptides: rare exceptions or a major constituent of the chloroplast proteome" *Mol. Plant* **2**: p. 1325–1335.
- 38.- Bi Z. Yang X. Yu W. Shu J. Zhang Y (2014). "Diapause-Associated Protein3 Functions as Cu/Zn Superoxide Dismutase in the Chinese Oak Silkworm (*Antheraea pernyi*)." *PLoS One* **9**(3): pp. e90435.
- 39-. Ara N. Nakkonong K. Lv W. Yang J. Hu Zh. Zhang M. (2013). "Associated with Heat Tolerance in the Stems and Roots of Two Cucurbit Species ("Cucurbita maxima" and "Cucurbita moschata") and Their Interspecific Inbred Line "Maxchata"." *Molecular Sciences* **14**: pp. 24008-24028.
- 40-. Nagae M. Nakata M. and Takahashi Y. (2008). "Identification of negative cis-acting elements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata*." *Plant Physiology* **146**: pp. 1687–1696.
- 41-. Alscher R.G. Erturk N. and Heath L.S. (2002). "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants." *Experimental Botany* **53**(372): pp. 1331-1341.
- 42-. Pilon M. Ravet K. and Tapken W. (2011). "The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases". *Biochim. Biophys* **1807**: pp. 989-998.

- 43-. Passardi F. Longet B. Penel C. and Dunan, Ch. (2004). "The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants." *Phytochemistry* **65**: pp. 1879-1893.
- 44-. Yoshida K. Kaothien P. Matsui T. Kawaoka A. Shinmyo A. (2003). "Molecular biology and application of plant peroxidase genes." *Microbiol Biotechnol* **60**: pp. 665-670.
- 45.- Zamock, M, Furtmüller P.G. and Obinger C. (2008). "Evolution of Catalases from Bacteria to Humans." *PMC* **10**(9): pp. 1527-1548.
- 46.- Rizhsky L. Davletova Sh. Liang H. and Mittle, R.(2004). "The Zinc Finger Protein Zat12 Is Required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 Expression during Oxidative Stress in Arabidopsis." *Biological Chemistry* **279**: pp. 11736-11743.
- 47.- Shikanaia T. Takeda T. Yamauchi H. Sano S. Tomizawa k. I. Yokota A. and Shigeoka Sh. (1998). "Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts." *FEBS Letters* **428**: pp. 47-51.
- 48.- Hu X. Jiang M. Zhang A. and Lu L.(2005). "Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves." *Planta* **223**: pp. 57-68.
- 49.- Bailey-Serres. J. and Mittler. R. (2006). "The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells." *Plant Physiology* **141**: pp. 311.
- 50.- del Río L.A. and A. Puppo.(2011). "Reactive Oxygen Species in Plant Signaling." *Plant science* **141**,pp311-320.
- 51.- Dietz K. J. and Herth S. (2011). "Plant nanotoxicology." *Trnds in plant science* **16**(11): pp. 582-589.
- 52.- Naddafi K. Zare M. R. and Nazmara S. (2011). "Investigating potential toxicity of phenanthrene adsorbed to nano-ZnO using *Daphnia magna*." *Toxicol Environ Chem* **93**(4): pp. 729-737.
- 53.- Sikka S. Rajasekaran M. and Hellstrom W.J. (1995). "Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility." *Androl* **16**: pp. 464-468.
- 54.- Shulaev V. and Oliver D.J. (2006). "Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research." *Plant Physiology* **141**: pp. 367-372.
- 55- Grusak, M. A. (2001). Plant Macro- and Micronutrient Minerals. *E nyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group / www.els.net.
- 56- Gardner, R. G. (2003). Genes for magnesium transport. *Current Opinion in Plant Biology* Vol 6:263–267.
- 57.- Rodriguez-Íguez-Serrano M. Romero-Puertas M. C. Zabalza A. Corpas F. J. Gómez M. Del Río L. A. Sandalio L. M. (2006). "Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisumsativum*L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo." *Plant, Cell and Environment* **29**: pp. 1532-1544.
- 58.- Gallego S.M. Benavides M.P. and Tomaro M.L. (1996). "Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress." *plant science* **121**: pp. 151-159.
- 59.- Balestrasse K. B. Yannarell, G. G. Noriega G. O. Batlle A. Tomaro M. L. (2008). "Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress." *Biometals* **21**: pp. 433-441.
- 60.-Rezaee F. Ghanati F. and Behmanesh M. (2013). "Antioxidant activity and expression of catalase gene of (*Eustoma grandiflorum* L) in response to boron and aluminum" *South African Journal of Botany* **84**: pp. 13-18.

- 61.- Cartes P. McManus M. Wulff-Zottele C. Leung S. Gutiérrez-Moraga A. and de la Luz Mora M. (2012). "Differential superoxide dismutase expression in ryegrass cultivars in response to short term aluminium stress." *plant soil* **350**: pp. 353-363.
- 62.- BOËOVÁ B. HUTTOVÁ J. LIPTÁKOVÁ L. MISTRÍK I. OLLÉ, M. TAMÁS L. (2012). "Impact of short-term cadmium treatment on catalase and ascorbate peroxidase activities in barley root tips." *Bilogia plantarum* **56**(4): pp. 724-728.
- 63.- Panda S. K. and Matsumoto H. (2010). "Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress." *Biometals* **23**: pp. 753-762.
- 64.- Pena B.L. Azpilicueta C.E. and Gallego S.M.(2010). "Sunflower cotyledons cope with copper stress by inducing catalase subunits less sensitive to oxidation." *Trace Elements in Medicine and Biology* **25**: pp. 125-129.
- 65.- Sandalio L. M. Dalurzo H. C. Gómez M. Romero-Puertas M. C. and del Río L. A. (2001). "Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants." *Exp Bot* **52**: pp. 2115–2126.
- 66.- Pawlak S. Firych A. Rymer K. and Deckert J. (2009). "Cu,Zn-superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings." *Acta hysiol plant* **31**: pp. 1741-1747.
- 67- Gechev T. S. Breusegem F. Stone J. M. Denev I. Laloi C. (2006). "Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death." *Bioessays* **28**(11), 1091-101.
- 68- Griffing L. R. and Fowke L. C. (1985). "Cytochemical localization of peroxidase in soybean suspension culture cells and protoplasts: Intracellular vacuole differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies." *Protoplasma* **128**(1), pp22-30.
- 69- Yim M. B. Chock P. B. and Stadtma E. R. (1990). "Copper,Zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Biochemistry* **87**, 5006-5010.
- 70- Liochev S. I. and Fridovich I. (2002) "Copper, Zinc superoxide dismutase and H₂O₂ " *Biological chemistry* **227**(38) pp34674-34678.

Agriculture faces many challenges such as climate change, urbanization, sustainable use of natural resources and environmental issues such as runoff, accumulation of pesticides and chemical fertilizers faces. In recent years, claims are indicative of the usefulness of nanotechnology in agriculture. In contrast some other reports are suggestive of the nanotoxicity on biological systems. Accordingly, we have evaluated the effect of magnesium oxide nanoparticles on the expression levels of genes involved in oxidative stress in soybean. The experiment was carried out in a hydroponic system using split plot in time with randomized complete block design in three replicates. Treatments were magnesium oxide nanoparticles on two levels (0.5 and 0.25 g/l), magnesium oxide at two levels (0.5 and 0.25 g/l) and control having no MgO. The results were suggestive of toxicity of nano-MgO through transcript analysis of catalase, superoxide dismutase and peroxidase in cotyledon, leaf and root tissues via RT-PCR. The severe stress was noted at 0.25 g/l nano-Mg. In 0.5 g/l nano-MgO, toxicity was also observed. However, the severity of the up-regulation of genes were lower compared to 0.25 g/l nano-Mgo. It seems that tendency to agglomerate in higher concentration of nanoparticles may in fact suppress their actual effect.

Key words: oxidative stress, reactive oxygen species, nanoparticles



Shahrooduniversity of technology

Faculty of agriculture

in treatment with magnesium

Soybean molecular response nanoparticle

Amene Yousefikia

Supervisor:

Dr. Naser Farrokhi

Dr. Shahrokh Gharanjik

Advisor:

Mahdi Baradaran Firooz Ababi

September 2014