ارزیابی تأثیر نانوذرات نقره بر شاخصهای سیتوژنتیکی در ۶ رقم جو زراعی

فرزانه قاسمی سراب بادیه[۱]، آرش فاضلی[۱*]، علی آرمینیان[۱]، رضا صحرایی[۲] و هوشمند صفری[۳]

[۱] ایلام، دانشگاه ایلام، دانشکده کشاورزی

[۲] ایلام،دانشگاه ایلام، دانشکده علوم پایه

[۳] کرمانشاه، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۱۴

چکیده

نانو مواد بخشی از انقلاب صنعتی برای توسعه مواد سبک و قوی برای هدفهای مختلف می باشد. اثرات سمی نانو ذرات در مطالعات زیادی ارزیابی شده، با این حال اثرات محیطی آنها روی گیاهان هنوز به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. این تحقیق به منظور اثر ذرات نانونقره بر شاخصهای سیتوژنتیکی سلولهای در حال تقسیم شش رقم جو انجام گرفته است. جوانه‌زنی بذور در غلظتهای مختلف نانوذره (صفر، یک درصد، پنج درصد، ۱۰ درصد مولار) در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. صفات شاخص میتوزی، شاخص متافازی و انحرافات کروموزومی اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین غلظتهای مختلف نانوذره اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد برای خصوصیات مورد بررسی وجود دارد. در بین شش رقم مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری تنها برای صفت شاخص‌میتوزی درسطح یک درصد مشاهده شد. مقایسه میانگینها به روش دانکن مشخص نمود که شاخص متافازی و شاخص میتوزی با افزایش غلظت نانوذره تا سطح پنج درصد به صورت معنی‌دار افزایش می یابد و در غلظت ۱۰ درصد این دو شاخص کاهش می یابند. برای شاخص انحرافات کروموزومی بیشترین میزان برای غلظت پنج درصد مشاهده شد و در غلظت ۱۰ درصد میزان انحرافات کروموزومی کاهش معنی داری را نشان داد. در مجموع غلظتهای پایین نانوذره (یک درصد و پنج درصد) سبب افزایش شاخص میتوزی، متافازی و انحرافات کروموزومی و غلظت ۱۰ درصد سبب کاهش شاخصهای مورد بررسی، نسبت به شاهد در ارقام جو شد. به نظر می‌رسد نانونقره پتانسیل ایجاد جهش در مواد ژنتیکی را دارا بوده که جنبه‌های ایمنی زیست محیطی آن بایستی مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: جو، نانونقره، شاخص میتوزی، شاخص متافازی، شاخص انحرافات کروموزومی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۴۳۷۳۰۲ ، پست الکترونیکی: arashfazeli57@gmail.com

مقدمه

فرآورده‌های غلات در طی هزاران سال از جمله با اهمیت‌ترین منابع غذایی بشر بوده‌اند، به طوری که تقریباً هرکس در جهان حداقل یک نوع از غلات را مصرف می نماید. سالانه در حدود دو بیلیون تن غلات در جهان تولید می‌گردد (۷). جو یکی از اولین گیاهانی است که توسط انسان اهلی گردید و از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی محسوب می‌شود (۱۸). با توجه به افزایش اهمیت روز افزون جمعیت و نیاز به مواد گوشتی، پروتئینی و حیوانی افزایش تولید جو که دارای میزان بالایی از پروتئین و اسید آمینه ضروری لایسین بوده و نیز مهم‌ترین ماده تشکیل دهنده جیره غذایی دامداریها را تشکیل می‌دهد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۶).

نانو مواد بخشی از انقلاب صنعتی برای توسعه مواد سبک ولی قوی برای هدفهای مختلف هستند (۱۱). با توجه به

خواص فیزیکی و شیمیایی جدیدی که مواد در مقیاس نانو پیدا می‌کنند، نانو مواد برای محصولات مصرفی جدید و کاربردی برای علوم زیستی و بیوتکنولوژی استفاده می‌شوند. نانو ذرات به لحاظ شیمیایی بسیار متنوع هستند. تخمین زده شده که از تمام نانو مواد مورد استفاده در محصولات مصرفی، نانو ذرات نقره در حال حاضر بالاترین درجه تجاری را دارند (۶)، که به مقدار تقریباً زیادی در تماس با انسانها و محیط هستند و دارای اثرات متفاوتی می‌باشند. اثرات سمی نانو ذرات در مطالعات زیادی ارزیابی شده، با این حال اثرات محیطی آنها بر روی سلامتی بالقوه گیاهان هنوز به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. اندازه کوچک منحصر به فرد و سطح تماس وسیع یک شاخص کلیدی برای سمیت مواد نانو است که امکان جا به جایی و استنشاق آنها را فراهم می آورد(۱۹). نقره به عنوان یک عامل خطر محیطی به وسیله آژانس حفاظت از محیط زیست طبقه‌بندی شده است زیرا برای گیاهان آبزی و حیوانات از هر فلز دیگری به جز جیوه سمی‌تر می‌باشد. حتی اگر یک نانو ذره به خودی خود سمیت نداشته باشد، نانو ذرات نقره به علت اثربخشی سمیت یونهای نقره هنگام جابه‌جایی، ایجاد مسمومیت را افزایش می‌دهند (۳). بنابراین درک چگونگی انتقال و رفتار نانومواد آزاد شده در محیط و اثرمتقابل آنها با موجودات زنده و اجزا غیرزیستی محیط، که بتواند مبنای اقدامات پیشگیرانه در ساخت و مصرف مطمئن تر محصولات نانویی شود از اهمیت خاصی برخوردار است (۱، ۸، ۲۳).

تحقیقات نشان داد که نانو ذرات Tio2 پس از جذب توسط سلولهای گیاه ذرت منجر به کاهش شاخص میتوزی و افزایش انحرافات کروموزومی شده است(۲۱). در بررسی اثر نانومواد نقره، مس و Tio2 بر موجودات آبزی شامل ماهی زیرا، پلانکتون و گونه‌های جلبکی مشخص شد که نانوذره نقره و نانوذره مس در تمام موجودات آبزی تحت آزمایش سمیت ایجاد کرده در حالی که Tio2 در هیچ کدام از آنها مسمومیت ایجاد نکرده است (۵).

زانگ و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی اثر نانونقره بر تقسیم سلولی و شاخصهای میتوزی گیاه *Allium* گزارش کردند که در غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ ppm نانونقره به صورت معنی داری شاخص میتوزی کاهش و انحراف ساختاری در کروموزوم افزایش یافت (۲۶).

پسنیا (۲۰۱۳) در تحقیقی به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک و ژئوتوکسیک نانونقره پوشش داده شده با چیتوزان بر روی *Allium* در غلظتهای (۲/۵، ۱، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده کردند که در غلظتهای پایین پنج میلی‌گرم در لیتر به دلیل فقدان تعامل مستقیم نانوذره با سلولها به خاطر پوشش چیتوزان هیچ نوع اختلالی وجود ندارد اما در غلظتهای بالا ناهنجاریهای میتوزی و کروموزومی و افزایش شاخص میتوزی مشاهده شد (۲۰).

هدف از این تحقیق بررسی تأثیر نانو ذرات نقره با ابعاد مختلف بر خصوصیات سیتوژنتیکی شش رقم جو می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه محلول نانونقره: برای تهیه غلظت یک دهم مولار نانو نقره میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر آب چندبار تقطیر شده را جوشانده تا اکسیژن آن گرفته شود طوری که ۴۰۰ میلی‌لیتر آن باقی بماند سپس سریع آب را به ظرف دیگری منتقل کرده، در آن را محکم بسته که اکسیژن وارد نشده و به منظور سرد شدن در دمای یخچال گذاشته شد. سه ماده شیمیایی نیترات نقره (AgNo3=.1698gr)، سدیم سیترات (C6H5Na3Of=.2499gr) وسدیم بورهیبریدات (NaBH4=.0236gr) به طور جداگانه در بالون حجمی توسط آب دو بار تقطیر شده به حجم ده میلی‌لیتر رسانده شد و به ترتیب از هرکدام یک میلی‌لیتر به آب سرد شده اضافه گردید سپس به مدت ده دقیقه با استفاده از دستگاه استیرر حل شد تا یک سوسپانسیون زرد رنگ به دست آمد. به منظور به دست آوردن محلولهای یک صدم وپنج

صدم مولار، محلول یک دهم مولار با استفاده از فرمول زیر رقیق گردید.

M1V1=M2V2

شش رقم جو زراعی (*Hordeum vulgare*) از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی تأثیر نانوذره نقره بر خصوصیات سیتوژنتیکی ارقام مورد بررسی، چهار سطح صفر (آب مقطر)، یک صدم، پنج صدم و یک دهم مولار نانوذره در آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور رقم (شش رقم) و سطوح نانوذره (چهار سطح) در پنج تکرار انجام شد. به منظور جوانه‌زنی بذور، تعداد ۲۰ بذر از هر رقم در پتری‌دیش بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند و تیمارهای مختلف نانوذره در هر پتری‌دیش اعمال گردید. پتری‌دیشهای حاوی بذور به مدت ۴۰ ساعت در دمای اتاق، سپس ۱ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و مجدداً به مدت ۷ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس بذور به محلول تثبیت کننده لویتسکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. بذور از محلول تثبیت کننده خارج و بعد از شست وشو با آب مقطر به مدت ۲ ساعت، در الکل ۷۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۵).

به منظور تهیه اسلاید، پس از شستشوی نمونه‌های ذخیره شده در الکل، عمل هیدرولیز با NaOH یک نرمال به مدت هشت دقیقه در دمای ۶۳ درجه سانتیگراد انجام شد و با استفاده از رنگ هماتوکسیلین رنگ آمیزی انجام گردید. برای هر سطح نانوذره در هر رقم تعداد پنج اسلاید (تکرار) تهیه شد و مورد مطالعه قرار گرفت. برای هر اسلاید به طور تصادفی تعداد ۱۰ میدان دید با استفاده از عدسی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus مدل BH2 مورد بررسی و شمارش قرار گرفت (۲۵). در هر میدان دید تعداد کل سلولها، تعداد سلولهای اینترفازی، تعداد سلولها در هر کدام از مراحل مختلف تقسیم میتوز و سلولهای با انحراف کروموزومی از قبیل متافاز چسبیده، متافاز به هم ریخته، C-متافاز، آنافاز چسبیده، آنافاز به هم ریخته، پل آنافازی، تلوفاز چسبیده، پل تلوفازی، عقب ماندگی کروموزومی شمارش گردید و با استفاده از داده‌های حاصل خصوصیات شاخص میتوزی، شاخص متافازی، شاخص انحرافات کروموزومی محاسبه شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین برای داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و نمودارهای مربوط با نرم افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج

میانگین صفات مورد اندازه‌گیری تحت تیمار غلظتهای مختلف نانونقره برای شش رقم محاسبه شد. این نتایج (جداول ۱ و ۲) نشان دادند که صفات اندازه‌گیری شده برای همه ارقام تا سطح پنج درصد نانونقره روند افزایشی داشته، اما در سطح ۱۰ درصد نانونقره همه صفات روند کاهشی نشان دادند. همان طور که در جداول ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد صفات پروفاز، تلوفاز، پروفاز چسبیده و آنافاز چسبیده بیشترین فراوانی را در بین بقیه صفات از خود نشان دادند.

جدول ۱-داده‌ها، میانگینها و انحراف معیار صفات سیتوژنتیکی تحت تیمار غلظتهای نانوذره نقره

ژنوتیپ	نانو نقره	میانگین مربعات± انحراف معیار							
		کل سلول ها	سلول های اینترفازی	پروفاز	متافاز	متافاز چسبیده	متافاز به هم خورده	انافاز	انافاز چسبیده
نیمروز	0	228.18±18.37	222.36±17.88	1.7±0.28	0.73±0.03	1.50±0.14	0.78±0.08	0.79±0.06	0.92±0.10
	1	214.20±48.76	205.72±49.42	1.85±0.14	0.89±0.18	1.68±0.18	1.02±0.10	0.88±0.09	0.90±0.07
	5	216.24±47.47	207.76±46.26	1.46±0.12	0.77±0.07	1.93±0.33	0.78±0.08	0.83±0.06	1.17±0.08
	10	255.6±39.56	248.76±38.36	1.45±0.31	0.72±0.03	1.68±0.13	0.75±0.03	0.83±0.08	0.98±0.08

نصرت	0	319.24±41.57	311.56±41.19	1.57±0.21	0.76±0.07	1.92±0.23	0.71±0	0.83±0.07	0.96±0.13
	1	221.84±27.06	213.14±23.71	1.49±0.39	0.81±0.07	1.92±0.29	1.00±0.20	0.86±0.09	0.93±0.17
	5	302.4±36.93	288.5±37.41	2.12±0.36	0.83±0.07	2.17±0.19	1.05±0.17	0.88±0.10	1.11±0.15
	10	236.36±17.91	233.28±19.18	1.26±0.28	0.71±0.00	1.16±0.22	0.73±0.03	0.78±0.08	0.92±0.15
صحرا	0	215.76±43.45	210.62±42.51	1.28±0.19	0.77±0.05	1.46±0.17	0.72±0.03	0.72±0.03	0.93±0.17
	1	244.16±51.46	235.52±52.27	1.73±0.34	0.78±0.08	1.70±0.32	0.90±0.23	0.92±0.17	0.99±0.20
	5	284.28±42.45	275.48±42.79	1.65±0.28	0.79±0.09	1.83±0.14	1.03±0.11	0.80±0.04	1.08±0.13
	10	300.8±23.70	295.26±22.83	1.29±0.37	0.73±0.06	1.52±0.50	0.77±0.07	0.75±0.06	0.99±0.23
ایذه	0	225.74±14.65	220±13.83	1.68±0.21	0.73±0.03	1.50±0.16	0.78±0.08	0.77±0.07	0.91±0.09
	1	194.48±22.28	186.1±23.06	1.67±0.31	0.90±0.09	1.62±0.16	1.01±0.20	0.85±0.05	0.92±0.08
	5	187.18±20.87	176.08±21.32	1.68±0.20	0.72±0.03	2.18±0.22	0.84±0.12	0.84±0.13	1.22±0.18
	10	237.88±16.53	233.44±15.03	1.17±0.23	0.72±0.03	1.45±0.36	0.75±0.06	0.83±0.09	0.93±0.11
ده سراسری	0	238.68±36.11	232.54±35.22	1.8±0.34	0.73±0.03	1.44±0.08	0.77±0.09	0.76±0.05	0.93±0.09
	1	258.28±26.03	249.82±23.69	1.60±0.21	0.79±0.07	1.74±0.29	0.83±0.06	0.86±0.08	1.04±0.10
	5	265.04±44.75	256.46±42.08	1.47±0.37	0.76±0.05	1.91±0.36	0.98±0.15	0.84±0.07	1.23±0.23
	10	248.56±17.02	244.14±17.19	1.29±0.35	0.71±0	1.37±0.40	0.76±0.05	0.75±0.03	1.01±0.20
ماهور	0	223.5±11.61	217.72±10.61	1.73±0.25	0.73±0.03	1.44±0.12	0.79±0.08	0.76±0.07	0.92±0.08
	1	257.16±48.05	248.4±46.94	1.78±0.23	0.84±0.07	1.69±0.25	1.08±0.08	0.83±0.12	1.01±0.11
	5	254.76±49.65	244.64±48.17	1.72±0.14	0.75±0.06	1.98±0.39	0.88±0.05	0.86±0.10	1.18±0.19
	10	302.04±14.16	293.14±14.50	1.63±0.34	0.72±0.03	1.85±0.13	0.78±0.03	0.82±0.10	0.98±0.04

جدول ۲-داده‌ها، میانگینها و انحراف معیار صفات سیتوژنتیکی تحت تیمار غلظتهای نانوذره‌نقره

ژنوتیپ	نانو نقره	میانگین مربعات± انحراف معیار							
		پل آنافازی	آنافاز به هم ریخته	تلوفاز	تلوفاز چسبیده	پل تلوفازی	عقب ماندگی کروموزومی	شاخص میتوزی	شاخص متافازی	شاخص انحرافات کروموزومی
نیمروز	0	0.75±0.03	0.72±0.03	1.13±0.13	0.71±0	0.72±0.03	0.74±0.06	0.72±0.01	0.91±0.06	0.96±0.05
	1	0.77±0.07	0.75±0.03	1.36±0.10	0.72±0.03	0.72±0.03	0.79±0.12	0.74±0.01	0.95±0.05	0.96±0.04
	5	0.78±0.03	0.72±0.03	1.55±0.16	0.72±0.03	0.75±0.03	0.75±0.03	0.74±0	0.96±0.07	1.02±0.08
	10	0.76±0.05	0.71±0	1.52±0.26	0.71±0	0.71±0	0.77±0.09	0.72±0.01	0.91±0.04	0.95±0.03
نصرت	0	0.72±0.03	0.72±0.03	1.45±0.21	0.71±0	0.71±0	0.71±0	0.73±0.01	0.97±0.02	1±0.01
	1	0.75±0.06	0.73±0.03	1.54±0.58	0.71±0	0.71±0	0.72±0.03	0.74±0.01	0.99±0.08	1.01±0.06
	5	0.82±0.10	0.75±0.08	1.83±0.32	0.72±0.03	0.77±0.09	0.94±0.15	0.74±0.01	0.93±0.04	0.98±0.04
	10	0.73±0.03	0.71±0	0.97±0.14	0.71±0	0.71±0	0.72±0.03	0.72±0.01	0.83±0.03	0.86±0.04
صحرا	0	0.78±0.07	0.71±0	1.46±0.07	0.71±0	0.71±0	0.71±0	0.72±0	0.92±0.07	0.95±0.08
	1	0.77±0.09	0.73±0.03	1.53±0.32	0.73±0.03	0.71±0	0.75±0.06	0.74±0.01	0.91±0.06	0.95±0.08
	5	0.77±0.07	0.86±0.05	1.38±0.25	0.75±0.08	0.71±0	0.83±0.07	0.73±0.01	0.98±0.04	1.03±0.04
	10	0.77±0.09	0.71±0	1.32±0.36	0.71±0	0.74±0.06	0.72±0.03	0.72±0.01	0.90±0.12	0.93±0.14
ایذه	0	0.75±0.03	0.72±0.03	1.15±0.18	0.71±0	0.72±0.03	0.73±0.03	0.73±0.01	0.91±0.06	0.96±0.05
	1	0.80±0.11	0.75±0.06	1.52±0.23	0.81±0.12	0.73±0.03	0.77±0.07	0.74±0.01	0.96±0.04	0.99±0.03
	5	0.84±0.11	0.83±0.15	1.68±0.15	0.78±0.13	0.72±0.03	0.75±0.08	0.75±0.01	0.95±0.04	1.02±0.03
	10	0.73±0.03	0.71±0	1.23±0.32	0.71±0	0.71±0	0.72±0.03	0.72±0.01	0.89±0.06	0.94±0.07
ده سراسری	0	0.73±0.03	0.72±0.03	1.21±0.18	0.71±0	0.72±0.03	0.74±0.06	0.73±0.01	0.89±0.04	0.94±0.02
	1	0.74±0.06	0.75±0.06	1.63±0.28	0.76±0.05	0.76±0.05	0.76±0.08	0.73±0.01	0.93±0.04	0.97±0.04
	5	0.80±0.10	0.73±0.03	1.30±0.27	0.73±0.03	0.72±0.03	0.83±0.07	0.73±0.01	0.99±0.04	1.06±0.05
	10	0.77±0.07	0.71±0	1.14±0.26	0.71±0	0.71±0	0.71±0	0.72±0.01	0.85±0.09	0.89±0.12
ماهور	0	0.73±0.03	0.72±0.03	1.15±0.18	0.71±0	0.73±0.03	0.75±0.06	0.73±0	0.88±0.01	0.94±0.03

1	0.73±0.03	0.72±0.03	1.50±0.30	0.72±0.03	0.71±0	0.76±0.03	0.74±0.01	0.94±0.1	0.98±0.09
5	0.80±0.08	0.78±0.08	1.63±0.08	0.75±0.06	0.73±0.03	0.73±0.03	0.74±0	0.94±0.05	1.01±0.04
10	0.72±0.03	0.72±0.03	1.76±0.10	0.73±0.03	0.78±0.10	0.77±0.07	0.73±0.01	0.93±0.04	0.97±0.03

نتایج تجزیه واریانس(جدول ۳) نشان داد که بین غلظتهای متفاوت نانونقره برای صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. همچنین در بین ژنوتیپهای مورد بررسی برای صفت شاخص میتوزی اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده گردید، اما برای صفات شاخص متافازی و شاخص انحرافات کروموزومی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. برای اثر متقابل سطوح متفاوت نانونقره در ژنوتیپها نیز در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار تنها برای صفت شاخص میتوزی مشاهده گردید. لازم به ذکر است باتوجه به اینکه داده‌ها به صورت شاخص بودند به منظور کاهش میزان ضریب تغییرات داده‌ها با استفاده از جذر ریشه دوم داده‌های اصلی تبدیل شدند که درصد ضریب تغییرات بین ۱/۰۳ درصد تا ۶/۳۷ درصد بود.

جدول ۳- میانگین مربعات صفات شاخص میتوزی، متافازی و انحرافات کروموزومی تحت تیمار غلظتهای مختلف نانو نقره در ژنوتیپهای مورد بررسی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		شاخص میتوزی	شاخص متافازی	شاخص انحرافات کروموزومی
نانو نقره	3	0.002**	0.001**	0.05**
ژنوتیپ	5	0.0002**	0.033 ns	0.0006ns
نانونقره×ژنوتیپ	15	0.0001*	0.001ns	0.005ns
خطا	96	0.00006	0.006	0.004
درصد ضریب تغییرات(٪)		1.03	6.37	6.42

نتایج مقایسه میانگین با روش دانکن (جدول ۴) در سطح پنج درصد نشان داد که گروه‌بندی متفاوتی در بین ارقام به علت تأثیر نانونقره برای شاخصهای متافازی و انحرافات کروموزومی وجود ندارد و تمام ژنوتیپهای این دو شاخص در یک گروه قرار گرفتند و برای شاخص میتوزی نیز با توجه به مقایسه میانگین مشاهده شده ارقام ایذه و ماهور دارای بیشترین میزان شاخص میتوزی بودند، که با ارقام نیمروز و نصرت اختلاف معنی‌داری با توجه به آزمون دانکن در سطح پنج درصد نشان ندادند. از طرف دیگر ارقام صحرا و ده سراسری کمترین شاخص میتوزی را به خود اختصاص دادند و این ارقام نیز با ارقام نیمروز و نصرت اختلاف معنی‌دار نداشتند.

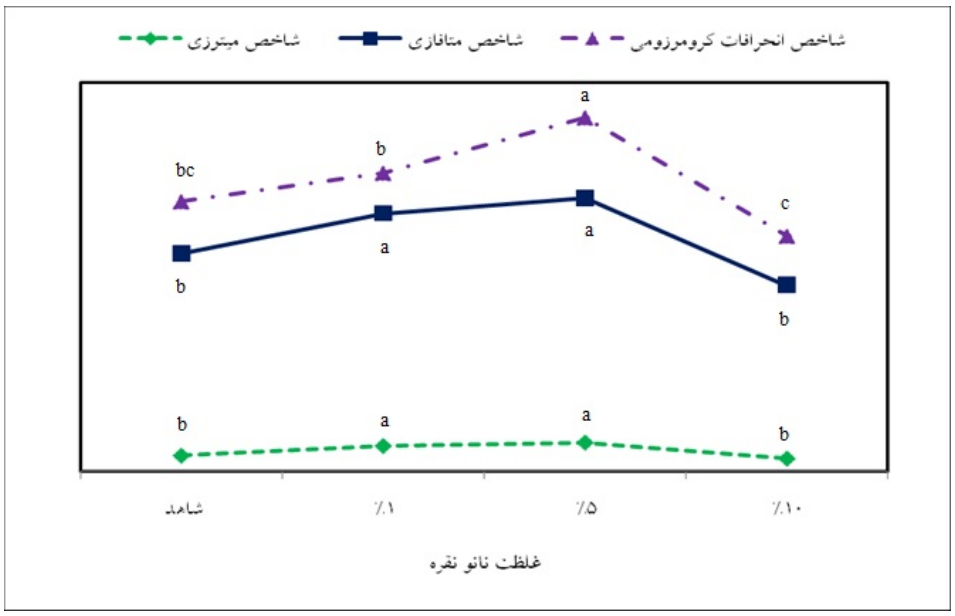
جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی به روش دانکن در سطح ۵ درصد برای ارقام مورد مطالعه

رقم	شاخص میتوزی		شاخص متافازی		شاخص انحرافات کروموزومی	
نیمروز	0.731	ab	0.932	a	0.972	a
نصرت	0.730	ab	0.931	a	0.964	a
صحرا	0.727	b	0.927	a	0.967	a
ایذه	0.734	a	0.930	a	0.978	a
ده سراسری 10	0.726	b	0.913	a	0.967	a
ماهور	0.733	a	0.922	a	0.974	a

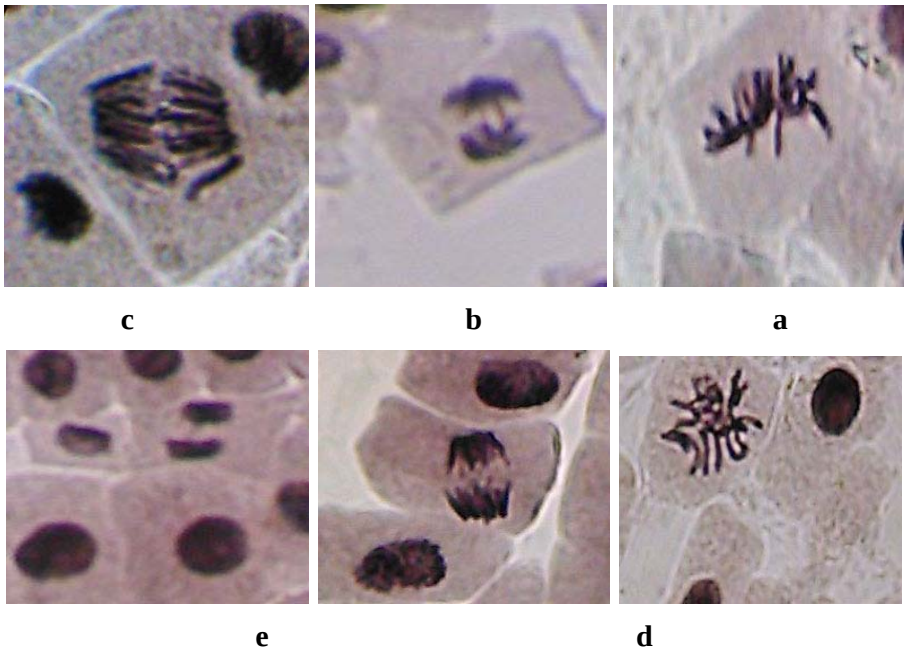
نتایج مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با روش دانکن در سطح پنج درصد برای سطوح متفاوت نانونقره اعمال شده در جدول ۵ ارائه شده است. همچنان که ملاحظه می‌گردد برای صفات شاخص میتورزی و شاخص متافازی روند یکسانی وجود دارد. به طوری که با افزایش غلظت نانونقره تا غلظت پنج درصد، میزان این دو شاخص به صورت معنی داری افزایش می یابد ولی در غلظت ۱۰ درصد این دو شاخص کاهش می یابند. کمترین میزان برای این دو شاخص مربوط به سطح ۱۰ درصد بود که با سطح شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. بیشترین میزان مربوط به سطح پنج درصد بود که با سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نداشت. اما برای شاخص انحرافات کروموزومی روند متفاوتی مشاهده شد، به این شرح که بیشترین میزان شاخص انحرافات کروموزومی در سطح پنج درصد مشاهده شد و برای غلظت ۱۰ درصد میزان انحرافات کروموزومی به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد. به طوری که کمترین میزان انحرافات کروموزومی در سطح ۱۰ درصد مشاهده شد. در شکل ۱ نمودار روند صفات مورد بررسی در سطوح نانونقره ارائه شده است همین طور که ملاحظه می‌گردد با اعمال نانونقره (تا سطح پنج درصد) روند افزایشی در تمام صفات مشاهده شد که با افزایش غلظت نانوذره در سطح ۱۰ درصد برای تمام صفات این روند روبه کاهش گذاشته است. در شکل ۲ نمونه‌ای از یک میدان دید تهیه شده با لنز ۱۰۰ ارائه شده است که سلولهای در حال تقسیم و سلولهای اینترفازی مشخص قابل مشاهده می باشند و همچنین سلول در حال تقسیم برای حالات پل آنافازی، متافاز چسبیده و آنافاز چسبیده، پل تلوفازی، متافاز به هم خورده، آنافاز مشخص شده است.

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی به روش دانکن در سطح ۵ درصد برای سطوح نانونقره

سطح نانو نقره(٪)	شاخص میتوزی	شاخص متافازی	شاخص انحرافات کروموزومی
0	0.725 b	0.914 b	0.957 bc
1	0.735 a	0.946 a	0.978 b
5	0.738 a	0.958 a	1.022 a
10	0.722 b	0.884 b	0.925 c



شکل ۱- نمودار روند صفات مورد بررسی در سطوح متفاوت نانونقره



شکل ۲- سلولهای درحال تقسیم و سلولهای اینترفازی برای یک میدان دید میکروسکوپی با لنز ۱۰۰. a- متافاز چسبیده، b- پل آنافازی و c- آنافاز چسبیده d- متافاز به هم ریخته e-آنافاز f-پل تلوفازی

بحث

نانومواد و نانوذرات اخیراً با توجه به خواص منحصر به فرد خود و کاربردهای متنوع در بیوتکنولوژی و علوم زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. با وجود پیشرفتهای سریع و پذیرش اولیه نانوتکنولوژی، پتانسیل عوارض مضر در انسان، دیگر موجودات زنده و اکوسیستمها هنوز به طور کامل مشخص نشده است. با این حال انتظار می‌رود اثرات زیست‌محیطی استفاده از نانومواد در آینده به طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه قرار گیرد (۲).

مطالعات استون و همکاران (۲۰۰۹) و لندسیدل و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که براساس دانش موجود هر نانوذره‌ای احتمالاً اثر ژنوتوکسیسیتی محدودی را القاء کرده و منجر به شکستهای دو رشته‌ای در مولکول DNA و در نتیجه آسیب به ماده ژنتیکی می‌شود (۱۳ و ۲۴).

نتایج نشان داد که نانوذره در فعالیتهای تقسیم سلولی تأثیر دارد و به خوبی مشخص شد که با افزایش غلظت نانونقره شدت تقسیم سلولی نیز افزایش می یابد، البته این افزایش تا سطح پنج درصد مشاهده شد و بعد از آن در غلظت ۱۰ درصد شاخصهای تقسیم سلولی (شاخص متافازی و شاخص میتوزی) کاهش یافتند، همچنین برای انحرافات کروموزومی تنها با افزایش از غلظت صفر درصد به غلظت پنج درصد میزان این شاخص افزایش نشان داد و در غلظت ۱۰ درصد میزان شاخص روند نزولی داشت. هرچند ممکن است در تصور اولیه تأثیر منفی نانونقره بر تقسیمات سلولی باعث کاهش آن و در نتیجه کاهش رشد گردد. اما ظاهراً نتایج خلاف این موضوع را ثابت کردند و تأثیر نانونقره بیشتر باعث افزایش سرعت تقسیم سلولی گردید و این افزایش سرعت تقسیم سلولی منجر به افزایش انحرافات کروموزومی می شود. البته این مسئله برای غلظتهای پایین صادق بود و وقتی غلظت نانوذره به ۱۰ درصد رسید، تأثیر نانوذره بیشتر از طریق کاهش تقسیم سلولی بود و انحرافات کروموزومی نیز باتوجه به کاهش تقسیم سلولی کاهش داشت. به عبارتی در غلظتهای پایین تأثیر منفی نانونقره در این جهت است که سلولها را در جهت تقسیم سریع‌تر تحریک کرده و در نتیجه باعث ایجاد

تقسیمات غیر نرمال و ناهنجار شده که ادامه این فرآیند منجر به کاهش رشد گیاه می‌گردد و در غلظتهای بالا با کاهش تقسیم سلولی باعث تأثیر منفی و کاهش رشد گیاه می‌گردد. تحقیقات نشان دادند که اگر شاخص میتوزی به طور قابل توجهی بالاتر از سطح شاهد باشد می‌تواند از طریق ایجاد اختلال در تقسیمات سلولی و حتی تشکیل بافت توموری مضر باشد (۱۲).

در تحقیقات بیان شده است که فراوانی زیاد اختلالات میتوزی مانند متافاز به هم ریخته، آنافاز به هم ریخته ناشی از نانونقره در درجه اول نشان دهنده اثرات آن بر دوک میتوزی، تغییر جهت‌گیری کروموزومها در مراحل مختلف چرخه سلولی است. اختلال در عملکرد دوک میتوزی احتمالاً با توجه به اثر متقابل نانونقره با گروه SH توبولین است (۱۰). همچنین مشاهده چسبیدگی کروموزومی یک نوع دیگری از اختلالات ناشی از نانونقره است که این چسبندگی احتمالاً به دلیل اختلاط رشته های کروماتین است که منجر به اتصال ساب کروماتید بین کروموزومها می‌شود (۹ و ۱۵).

باتوجه به نتایج مشخص گردید که در غلظت پنج درصد انحرافات کروموزومی بیشتر از غلظت ۱۰ درصد بود و این نتیجه در این تحقیق با نتایج پسنیا (۲۰۱۳) مطابقت نشان نداد (۲۰). از طرفی مقایسه تیمارهای نانوذره Tio2 با تیمار شاهد نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذره، شاخصهای میتوزی، متافازی و انحرافات کروموزومی در تیمارهای نانوذره Tio2 نسبت به شاهد افزایش یافتند. همچنین در اثر افزایش غلظت نانوذره Tio2، تغییرات در نمودارهای شاخص میتوزی ومتافازی ناچیز بوده به طوری که اثر تیمار بر صفتهای شاخص میتوزی و متافازی در تجزیه واریانس معنی دار نشد، در حالی که این تغییرات در نمودار شاخص انحرافات کروموزومی مشهود بود، ولی با افزایش غلظت نانوذره تغییرات ناچیز مشاهده گردید (۲۵). علت تعدیل روند تغییرات با افزایش غلظت نانوذرات را می‌توان به خواص نانومواد ارتباط داد بدین معنی که با افزایش غلظت، نانومواد رسوب کرده و خواص توده‌ای را نشان می‌دهند. به طوری که اثر نانوذره Tio2 در القای انحرافات کروموزومی وابسته به غلظت بوده (۴) که با نتیجه این تحقیق مطابقت داشت. نتیجه به دست آمده از این تحقیق برای جو زراعی از طرف دیگر نشان داد که در بین ارقام نیز اختلاف معنی‌دار وجود ندارد بنابراین نانوذره بر فرآیندهای سلولی در بین ارقام ژنتیکی مختلف تأثیری نداشته است.

مونیکا روفینی (۲۰۱۱) در تحقیقی بر روی ماشک مشاهده کردند که در سطح ۰/۲ و یک درصد Tio2 نسبت به شاهد میزان شاخص میتوزی و انحرافات کروموزومی افزایش یافت. در حالی که در غلظتهای بالاتر (دو و چهار درصد) نانوذره شاخص میتوزی و انحرافات کروموزومی کاهش یافته است. که با نتیجه این تحقیق مطابقت داشت.

مامتا کوماری و موخری (۲۰۰۹) در تحقیقی به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک و ژئوتوکسیک نانونقره بر روی گیاه *Allium* در غلظتهای (ppm ۲۰، ۲۵، ۷۵ و ۱۰۰) مشاهده کردند که در سطح شاهد هیچ اختلالی دیده نشد و شاخص میتوزی ۶۰ درصد بود (۱۴). با افزایش غلظت نانوذره شاخص میتوزی کاهش یافته و کمترین میزان آن در ppm ۱۰۰ مشاهده شد و میزان انحرافات کروموزومی با افزایش غلظت نانوذره افزایش یافته است، که با نتیجه این تحقیق مطابقت نداشت.

علاوه بر تحقیق حاضر و تحقیقات انجام گرفته دیگر در مورد جنبه‌های مضر نانوذرات بر علوم گیاهی، در خصوص تأثیر مخرب نانومواد بر سلامت انسان، محققین با انجام پژوهشهایی دریافتند که نانو تکنولوژی دارای خطراتی برای سلامتی انسان نیز می‌باشد. در تحقیقی به منظور ارزیابی ارتباط حضور کریستالهای آهن مغناطیسی مغز و بیماری آلزایمر از طریق مکانیسمهای دخیل در تجمعات فیبریلی پروتئین تاو، آزمایشی در بررسی میانکنش نانوذرات آهن

مغناطیسی و پروتئین تاو انسانی در شرایط In Vitro با استفاده از روشهای اسپکتروسکوپی فلورسانس و میکروسکوپ الکترونی انجام گردید که نشان داد نانوذرات آهن مغناطیسی قادر به القای تغییرات ساختاری در پروتئین تاو از پیچه نامنظم به ساختار بتا و در نتیجه ایجاد تجمعات فیبریلی پروتئین تاو می‌باشد (۱۷). از طرفی در پژوهشی در خصوص اهمیت آنزیم پپسین به عنوان یک آنزیم صنعتی در صنایع غذایی و کاربردهای نانوذرات در صنعت، تحقیقی به منظور مطالعه پایداری ساختاری آنزیم پپسین در حضور نانوذرات اکسیدروی و اکسیدآهن انجام گرفت که مشاهده گردید قدرت برهمکنش الکترواستاتیک و هیدروژنی بین آنزیم پپسین و نانوذرات اکسیدروی و اکسیدآهن در دگرگون شدن پپسین کم بوده است و در واقع نانوذرات مورد بررسی تأثیری بر ناپایدار کردن آنزیم پپسین نداشته است (۲۲).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از مطالعه مریستم ریشه ارقام جو نشان داد که نانونقره دارای خواص افزایش اختلالات کروموزومی، شاخص میتوزی و متافازی در سطح پنج صدم و کاهش آنها در سطح ده صدم نسبت به پنج صدم مولار می‌باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که نانونقره مانند برخی نانومواد دیگر پتانسیل ایجاد خسارت به مواد ژنتیکی یوکاریوتی را داشته و در استفاده از آن توجه به جنبه‌های ایمنی زیست محیطی آن اهمیت خاصی دارد. لذا با گسترش استفاده از ذرات نانو در زمینه‌های مختلف توجه به تأثیرات سوء این مواد مخصوصاً در زمینه‌های ژنتیکی بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

منابع

1- Alvarez, P.J.J., Colvin, V., Lead, J., and Stone, V. 2009. Research priorities to advance ecoresponsible nanotechnology. American Chemical Society Nano. 3: 1616—1619.

2- Anita, K. P., Ashley, B., La Bethani, M., and Paul, B T. 2012. Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Vicia faba: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. International Journal of Environmental Research and Public Health. 1660-4601.

3- Asha Rani, P.V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., and Valiyaveettil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano. 3: 279-290.

4- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M., and Mukherjee, A. 2010. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. Chemosphere. 81: 1253–1262.

5- Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzonqo, J. C., and Barber, D. S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicological Chemistry. 27: 1972-1978.

6- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R., and Kleinsasser, N. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. Toxicol. Lett. 201: 27-33.

7- IFST: Institute of Food Science & Technology. 2013. Availableat: Http://www.ifst.org.

8- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandez, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., Mc Laughlin, M. J., and Lead, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment: Behaviou, fate, bioavailability, and effects. Environment Toxicol and Chemestry. 27: 1825-1851.

9- Klasterska, I., Natarajan, A. T., and Ramel, C. 1976. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. Hereditas. 83: 153-162.

10- Kuriyama, R., and Sakai, H. 1974. Role of tubulin-SH group in polymerization to microtubules. J. Biochem. 76: 651-654.

11- Lam, C. W., James, J. T., Mc Cluskey, R., and Hunter, R. L. 2004. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. Toxicol. Sci. 77: 126-134.

12- Leme, D. M., and Marine-Morels, M. A. 2009. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its applications. Mutat. Res. 682(1): 71–81.

13- Landsiedel, R., Kapp, M. D., Schulz, M., Wiench, K., and Oesch, F. 2008. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods,preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations–Many questions, some answers. Mutation Research. 681: 241-258.

14- Mamta Kumari, A., and Mukherjee, N. Ch. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in Allium cepa. Science of the Total Environment. 407: 5243-5246.

15- McGill, M., Sen, P., and Hsu, T. C. 1974. Effect of ethidium bromide on mitosis and chromosomes. A possible material basis for chromosome stickiness. Chromosoma. 47: 157-167.

16- Nikkhah, H. R., Saberi, M. H., and Mahlooji, M. 1390. Evaluation of factors affecting grain yield of barley (Hordeum vulgare L.) two-row and six-row terminal drought stress. CROP Journal. 12 (1): 170-184.

17- Nasiri Khalili, M. A., Riazi, Gh. H., Ahmadian, Sh, Khodarahmi, R, Khodadadi, S, Mokhtari, F, and Dadkhah, R. 1393. The role of magnetic iron nanoparticles in recombinant human Tau protein fibrillization. Journal of Cellular and Molecular Biolog. 27: 590-597.

18- Nasirzadeh, A., Mirzaii Nadoshan, H. 1384. Morphological and cytological study of the diversity of species of barley (Hordeum) in Fars province. Journal of producers in agriculture Vbaghbany, 67: 94-87.

19- Oberdorster, G. 1996. Effects of Ultrafine Particles in the Lung and Potential Relevance to Environmental Particles. In *Aerosol Inhalation*; Marijnissen, J. M. C., Gradon, L., Eds.; Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherland, 165p.

20- Pesnya, D. S. 2013. Cytogenetic effects of chitosan-capped silver nanoparticles in the Allium cepa test. Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. 66 (3): 275 281.

21- Ruffini Castiglione, M., Giorgetti, L., Geri, C., and Cremonini, R. 2011. The effects of nano TiO2 on seed germination,development and mitosis of root tip cells of Vicia narbonensis L and Zea mays L. Journal of Nanoparticle Research. 13: 2443-2449.

22- Shahdadnezhad, K, Shareghi, B, and Mohammadi, H. 1394. Structural study on pepsin stability in the presence of ZnO and Fe3O4 nanoparticles. Journal of Cellular and Molecular Biolog. 27.

23- Sighn, N., Mans Hian, B., Jenkins, G., Griffiths, S., Williams, P., Maffies, T., Wright, C., Doak, S. 2009. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials Review. 30: 3891-914.

24- Stone, V., Johnston, H., and Schins, R. 2009. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerationsin vitro methods for nanotoxicology. Critical Reviews in Toxicology. 39: 613–626.

25- Takallo, S., Davoodi, D., Omidi, M., Ebrahimi, M. A., Rouzbeh, F., and Rasoulniia, A. 1392. The effect of Tio_2 nanoparticles on cytogenetic index and germination characteristics barley. Agricultural Biotechnology Journal, 5 (1): Unknown pages.

26- Zhang, F. Q., She, W. J., and Fu, Y. F. 2005. Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a prefatort siren. Geneva. 40: 504-509

The effect of silver nanoparticles on cytogenetic index in 6 cultivares of barley crop

Ghasemi sarab badiyeh F.[1], Fazeli A.[1], Arminian A.[1] Sahraee R.[2] and Safari H.[3]

[1] Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, I.R. of Iran

[2] Faculty of Science, Ilam University, Ilam, I.R. of Iran

[3] Agriculture and Natural Resources Research Center, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

Nanomaterials are a part from an industrial revolution to develop lightweight but strong materials for a variety of purposes. The toxic effects of nanoparticles have been evaluated in a variety of studies; however the potential health and environmental impacts on plants have yet to be thoroughly examined. This research were performed to evaluation the nano silver effect on cytogenetical indices of deviation cells in 6 barely cultivars. Seeds germination in various concentrations of nano silver (0, 1 percent, 5 percent and 10 percent Molar) was performed in factorial design based on completely randomized design. The traits of mitotic index, metaphase index and chromosome deviation index were measured. The results of variance analysis were showed a significant difference between various concentrations of nano particle for studied characters at 1 percent level. Significant difference was observed between cultivars only for mitotic index at 5 percent level. The compare means by Duncan's methods revealed that the traits of mitotic index and metaphase index were significantly increased by increasing concentrations of nanoparticles up to 5 percent and at 10 percent concentration, a significant decrease were observed for both indices. For the chromosome deviation index the highest level were observed for 1 percent concentration and the chromosome deviation index were significantly decreased at the 5 percent and 10 percent concentrations. In addition, in barley cultivars, the lowest concentrations of nanoparticles (1 percent and 5 percent) increased the mitotic index, metaphase index and chromosome deviation index and 10 percent concentration were decrease the amount of studied indices, compared to check treatment. It seems that nano silver has potential of creating damage to genetic material and attention to security aspects and environmental has specific importance.

Key words: barely- Nano silver- Metaphase index- mitotic index- deviation index of chromosome.