

Investigation of the protective effects of sodium hydrosulfide and sodium nitroprusside on the toxicity of silver nanoparticles in soybeans

S. Moayeri¹, M. Baradaran Firouzabadi^{1*}, M. Parsaeian¹, A. Gholami¹, H. Makarian¹

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

Introduction: Nanotechnology is actually one of the new technologies that has recently entered the agricultural field. Nanoparticles are atomic or molecular assemblies with minimum dimensions between 1-100 nanometers. One of the first effects of reducing the size of particles to below 100 nanometers and converting them into nanoparticles is an increase in surface area to volume, which causes more atoms to be placed on the surface compared to the volume, and subsequently changes the physical and chemical properties of the particles. In the meantime Nanosilver is known as a stress factor in plants due to its unique properties such as small size and high specific surface area, which can cause plant damage by inducing oxidative stress. increasing the resistance to abiotic stresses in some plants is done through external application of various organic compounds. In this study, the role of sodium hydrosulfide (NaHS) and sodium nitroprusside (SNP) in reducing the negative effects of nanosilver on the physiology, growth and yield of soybean cultivar Williams was investigated.

Materials and Methods: this experiment was conducted at the research field of faculty of agriculture, Shahrood university of technology. the studied traits were shoot dry matter, yield, chlorophyll a and b relative water content, stability of plasma membrane, flavonoid, anthocyanin and leaf soluble sugar. The experiment was carried out as a factorial experiment in a randomized complete block design with three replications with three levels of nanosilver (0, 1.5 and 3 g/L), three levels of NaHS (0, 0.5 and 1 mM) and two levels of SNP (0 and 120 μ M) in 1402. after testing, the obtained data was analyzed by SAS statistical software (version 9.1). the comparison of means was done based on minimum mean difference test (lsd) at 5 % probability level .the shape of the mold was studied using excel software .

Results and Discussion: The results showed that nanosilver reduced yield, relative leaf water content, and pigment concentration, while the combined use of NaHS and SNP reduced stress-induced damage by increasing the levels of protectants such as flavonoid, anthocyanin, and soluble sugars. In the treatment containing 3 g/L of silver nanoparticles, 0.5 mM sodium hydrosulfide, and no sodium nitroprusside, the chlorophyll a content of 0.78 mg/g fresh leaf weight showed the lowest value among all treatments. The highest soluble sugar content was recorded in plants treated with 1.5 g.L⁻¹ silver nanoparticles. The amount of flavonoid in plants sprayed with 1.5 g.L⁻¹ nanosilver was significantly increased as the amount of this trait in the application of 0.5 mM and non - consuming sodium hydrosulfide increased 0.0771 and 0.0769 g/g fresh weight of leaves and increased 48 percent. The highest amount of anthocyanin was observed in 0 and 1.5 g.L⁻¹ of nanosilver without using sodium hydrosulfide. Other treatment compounds decreased this trait significantly compared to the control. Nanosilver caused a decrease in plasma membrane stability. the stability of plasma membrane in the leaves of the control plants was 71.55 percent which was reduced by 1.5 g.L⁻¹ of nanosilver , which was not statistically significant .the doubling of nanosilver infection with 3 g.L⁻¹ had a significant negative effect and mean value was 61.6 percent. The shoot dry matter content in the control plants was 109.6 g.m⁻². in the effect of spraying of plants with 1.5 g.L⁻¹ nanosilver and non - consumption of sodium nitroprusside and sodium hydrosulfide to 99.5 g/m² and by infecting plants with 3 g/L nanosilver

with a significant drop of 51.7 g.m^{-2} . The highest grain yield (420.3 g.m^{-2}) was obtained in the treatment without nanosilver and with the use of 1 mM NaHS , which showed a 36% increase compared to the control (270 g.m^{-2}). Overall, the application of NaHS and SNP under nanosilver stress conditions left effective protective effects and can be suggested as an efficient approach for managing stresses caused by heavy metals in plants.

Keyword: Antioxidant, oxidative stress, pigments and heavy metals

بررسی اثرات حفاظتی هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر سمیت نانو ذرات نقره، در سویا

سعید معیری^۱، مهدی برادران فیروزآبادی^{۱*}، مهدیه پارسائیان^۱، احمد غلامی^۱، حسن مکاریان^۱

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

چکیده

غلظت‌های زیاد نانو ذرات نقره به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد مانند اندازه کوچک و سطح ویژه بالا، به عنوان یک عامل تنش‌زا در گیاهان شناخته می‌شوند که می‌توانند از طریق القای تنش اکسیداتیو، موجب آسیب به گیاه شوند. در این پژوهش، نقش بهبوددهنده هیدروسولفید سدیم (NaHS) و سدیم نیتروپروساید (SNP) کاهش اثرات منفی نانو ذرات نقره بر فیزیولوژی، رشد و عملکرد سویا رقم ویلیامز بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار با سه سطح محلول‌پاشی نانو ذرات نقره (0 ، $1/5$ و 3 گرم در لیتر)، سه سطح محلول‌پاشی NaHS (0 ، $0/5$ و 1 میلی‌مولار) و دو سطح محلول‌پاشی SNP (0 و 120 میکرومولار) در سال 1402 اجرا گردید. نتایج نشان داد نانو ذرات نقره موجب کاهش عملکرد، محتوای نسبی آب برگ و غلظت رنگدانه‌ها شد، در حالی که استفاده ترکیبی از NaHS و SNP با افزایش سطح محافظت‌کننده‌هایی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانین و قندهای محلول، آسیب‌های ناشی از تنش را کاهش داد. در تیمار حاوی 3 گرم در لیتر نانو ذرات نقره، $0/5$ میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم و عدم مصرف سدیم نیتروپروساید، میزان کلروفیل a با مقدار $0/78$ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ کمترین مقدار را در بین تمامی تیمارها نشان داد. بیشترین عملکرد دانه ($420/3$ گرم در متر مربع) در تیمار بدون نانو ذرات نقره و با مصرف 1 میلی‌مولار NaHS به دست آمد که نسبت به شاهد (270 گرم در متر مربع) افزایش 36 درصدی نشان داد. در مجموع، کاربرد NaHS و SNP در شرایط تنش نانو ذرات نقره، اثرات حفاظتی مؤثری بر جای گذاشت و می‌تواند به عنوان رویکردی کارآمد برای مدیریت تنش‌های ناشی از فلزات سنگین در گیاهان پیشنهاد شود.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، تنش اکسیداتیو، رنگدانه‌ها و فلزسنگین

مقدمه

نانوتکنولوژی یا کاربرد فناوری در مقیاس اتم و ملکول یکی از تکنولوژی های نوظهور در قرن حاضر می باشد که آینده اقتصادی جهان را به شدت متأثر خواهد کرد. گستردگی دامنه تأثیر این فناوری بسیار زیاد است و می تواند بیشتر جنبه های زندگی بشر را تحت تأثیر قرار دهد. هم اکنون با پیشرفت نانو فناوری استفاده از آن ها در صنایع مختلف از ساخت خودرو، لاستیک، رنگ، صنایع هوافضا، ساختمان سازی، شیشه سازی، الکترونیک، صنایع دریایی گرفته تا ساخت وسایل زندگی و انواع مواد و پودرهای شوینده مورد استفاده در منازل و استفاده در لوازم و تجهیزات پزشکی و کودهای کشاورزی شدت یافته است. قابل توجه ترین ویژگی ذرات در ابعاد نانو توانایی عبور از سدهایی است که برای ذرات مشابه با ابعاد بزرگتر غیرممکن است. این ویژگی واکنش پذیری نانوذرات به ویژه نانوذرات فلزی را به شدت افزایش می دهد (Baker et al, 2013). بنابراین رهاسازی هر نوع نانوذره ای در محیط زیست ممکن است دارای آثار مضر بالقوه ای باشد که همین امر مطالعه آن ها را در سطوح مختلف زیستی دارای اهمیت می نماید. به عنوان مثال در گزارشات مختلف آمده است که نانوذرات نقره دارای خواص بیولوژیکی مختلف از جمله خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی (Venkatesan et al, 2016)، بهبودی (Yugal et al, 2017) و ضد سرطانی (Ahmed et al, 2016) هستند. این نانو ذره که امروزه به وفور در صنایع به ویژه پوشاک استفاده می شود به راحتی با شستشو وارد آب های زیرزمینی می شود و در صورت مصرف برای گیاهان آثار متعددی برجای خواهد گذاشت. نانو ذرات نقره با غلظت پنج گرم در لیتر می تواند سبب کاهش فتوسنتز، تولید کلروفیل و عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در گیاهان شود (Miao et al, 2009). گزارش شده است که نانو ذرات نقره باعث کاهش معنی دار کلروفیل در برگ های گیاه آفتابگردان می شود. این کاهش، در مقایسه با تیمار شاهد، با افزایش غلظت نانوذرات شدت بیشتری یافته و نشان دهنده اثر منفی نقره بر ظرفیت فتوسنتزی گیاه است (رای و همکاران، ۲۰۲۰). در آزمایشی نشان داده شد که نانوذرات نقره به طور معنی داری سبب کاهش عملکرد فتوسنتزی، رنگدانه ها و آنتی اکسیدان هایی نظیر گلوتاتیون ریداکتاز، آسکوربات کل و محتوای گلوتاتیون در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار شده است (Tripathi et al, 2017). سونگ و همکاران (Song et al, 2013) بیان کردند که نانو ذرات نقره می تواند سبب کاهش محتوای کلروفیل و افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه گوجه فرنگی شود. در پاسخ به تنش نانونقره میزان بالایی از بیان ژن های مرتبط با آسمیلاسیون گوگرد، بیوسنتز گلوتاتیون ریداکتاز و گلوتاتیون اس ترانسفراز دیده شده است (Nair & Chang, 2014). اگرچه امروزه مصرف خاکی کودهای گوگردی در راستای تأمین نیاز این عنصر در گیاهان زراعی مرسوم است، ولی مواد و ترکیبات متعددی وجود دارند که می توانند به عنوان منبع گوگرد برای گیاه در نظر گرفته شوند و علاوه بر آن از سایر مزایای آنها نیز بهره مند شوند، به عنوان مثال گیاهان قادر به جذب برگی سولفید هیدروژن (H_2S) به عنوان منبعی از گوگرد برای رشد هستند به خصوص تحت شرایطی که دسترسی به گوگرد در محیط ریشه محدود شده باشد (Koralewska et al, 2008). سولفید هیدروژن در گیاهان نقش مهمی به عنوان تنظیم کننده فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه از جمله جوانه زنی بذر، فتوسنتز، حرکت روزنه ای، القای ریشه های نابجا و پیری گل ها با حفاظت گیاه از خسارت اکسیداتیو سرعت می دهد (Zhang et al, 2008). مطالعه ای بر روی برنج نشان داد که استفاده از NaHS تحت تنش گرمایی منجر به افزایش وزن خشک ساقه تا ۲۱/۸ درصد در رقم Taipei-309 و ۲۰ درصد در رقم Rasi شد. این افزایش می تواند به دلیل بهبود تعادل اکسیداسیون-احیا، حفظ ساختار فتوسنتزی و کاهش آسیب اکسیداتیو بود (Gautam et al., 2022). سولفید هیدروژن در گیاهچه های گندم تحت تنش

شوری میزان فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز را به ترتیب ۱۴/۲، ۱۲/۳ و ۸/۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد (Ding et al., 2019). همچنین بیان شده است که هیدروسولفید هیدروژن به عنوان دهنده هیدروژن به صورت خارجی سبب کاهش تنش ناشی از فلزات سنگین مانند آلومینیوم در گیاه جو (Chen et al, 2013)، سرب در کلزا (Ali et al, 2014) و کادمیوم در یونجه (Li et al, 2012) شده است. مطالعات انجام شده روی تأثیر پرایمینگ بذرهاى آفتابگردان با هیدروسولفید سدیم (NaHS) در شرایط تنش خشکی نشان داد که تیمار بذرها با NaHS شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها را در شرایط تنش خشکی اعمال شده توسط پلی اتیلن گلیکول بهبود داده است (Ocvirk et al, 2021). در گیاهان برنج پیش‌تیمار با سولفید هیدروژن با حفاظت از کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها و پروتئین سبب کاهش معنی‌دار نشانه‌های سمیت کادمیوم شد (Mostofa et al, 2015). همچنین هیدروسولفید سدیم (NaHS) می‌تواند با تأمین گوگرد احیاءپذیر، موجب افزایش مخزن گلوکاتایون در گیاهان شود. گلوکاتایون، به عنوان یک ترکیب کلیدی در سامانه دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه، حاوی گوگرد است و سنتز آن وابسته به حضور اسیدآمین‌های سیستمی می‌باشد. تأمین گوگرد از طریق هیدروسولفید سدیم با فراهم کردن پیش‌سازهای ضروری برای مسیرهای بیوسنتزی، نقش مؤثری در افزایش سطح گلوکاتایون ایفا می‌کند. طبق گزارش کوشواها و همکاران (Kushwaha et al, 2020)، تیمار گیاهان با NaHS باعث افزایش معنی‌دار غلظت گلوکاتایون و کاهش اثرات مخرب تنش کروم شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که کاربرد ترکیبات گوگردی مانند NaHS با تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه از طریق افزایش تولید گلوکاتایون، می‌تواند رویکردی مؤثر برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو باشد. سدیم نیتروپروساید (SNP) یک ترکیب رهاکننده اکسیدنیتریک (NO) است که بررسی نقش آن در گیاهان موضوع پژوهش‌های متعدد بوده است (Li et al, 2008). اسدی و همکاران (Asadi et al, 2015) بیان کردند که اکسیدنیتریک، یکی از گونه فعال نیتروژن است که می‌تواند به عنوان یک مولکول پیام‌رسان در پاسخ‌های سازشی گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان نقش ایفا کند و به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان، گونه‌های فعال اکسیژن را جاروب کند. در مطالعه‌ای در اثر محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید مقدار کلروفیل، درصد اسانس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرزه افزایش پیدا کرد (Gorgini Shabankareh & Khorasani Nejhad, 2018). همچنین در مطالعه‌ای بر روی *Lagenaria siceraria* (کدو حلوايي) تیمار با ۰/۲۵ میلی‌مولار SNP منجر به افزایش ۲۱/۸۴ درصد در وزن خشک شد. این افزایش به دلیل بهبود فتوسنتز، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش آسیب اکسیداتیو بود (Zhang et al., 2024). در پژوهشی دیگر تأثیر محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید روی گیاه رز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با کاربرد این تیمار، اثرات منفی قلیائیت خاک بر گیاه کاهش می‌یابد و شاخص‌های رشدی گیاه از جمله تعداد و ضخامت برگ، وزن تر و خشک برگ و ساقه و ریشه، همچنین شاخص‌های گلدهی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندهای محلول و میزان پروتئین کل افزایش می‌یابند و غلظت دو میلی‌مولار سدیم نیتروپروساید مؤثرتر از بقیه غلظت‌ها عمل کرد (Moazam Babasheikhali et al., 2021). استفاده از سدیم نیتروپروساید به عنوان دهنده اکسیدنیتریک سبب توسعه رشد گیاه نخود در شرایط تنش کادمیوم و کاهش غلظت کادمیوم موجود در قسمت‌های مختلف این گیاه شده است (Kumari et al, 2010). گیاه سویا (*Glycine max* L.) در سال ۲۰۲۴ تولید جهانی آن به حدود ۴۲۹ میلیون تن رسید که نسبت به سال قبل ۸/۷ درصد افزایش داشت، به‌ویژه در کشورهای پیشرو مانند برزیل، ایالات متحده و آرژانتین که به

ترتیب ۱۶۹، ۱۱۸،۸۴ و ۵۱ میلیون تن تولید داشتند (USDA, 2024). این افزایش تولید عمدتاً ناشی از شرایط مساعد آب‌وهوایی و بهبود مدیریت کشاورزی بوده است. در ایران، سطح کشت سویا نسبت به سال‌های گذشته روند افزایشی داشته و عمدتاً در استان‌های شمال غربی و غرب کشور کشت می‌شود، هرچند میزان تولید داخلی هنوز با کشورهای پیشرو جهانی فاصله دارد و بخش عمده نیاز کشور به سویا از طریق واردات تأمین می‌شود (FAO, 2023). از آنجا که سویا گیاهی نسبتاً حساس به شرایط تنش‌زا به‌ویژه فلزات سنگین و نانوذرات فلزی محسوب می‌شود، بررسی دقیق پاسخ‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیکی آن از اهمیت بالایی برخوردار است. این گیاه به‌ویژه در مراحل اولیه رشد نسبت به تغییرات در ترکیب خاک، سمیت فلزی، و تنش‌های اکسیداتیو بسیار واکنش‌پذیر است. بنابراین، درک بهتر از مکانیسم‌های دفاعی و تنظیمی گیاه سویا در برابر چنین تنش‌هایی می‌تواند نقش مهمی در توسعه راهکارهای بهبود رشد و عملکرد آن تحت شرایط تنش‌زا ایفا کند. به همین منظور این آزمایش با اهداف مقایسه اثر غلظت‌های مختلف نانوقره بر رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک گیاه سویا و بررسی پاسخ‌های زراعی و فیزیولوژیک این گیاه به محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید و هیدروسولفید سدیم انجام گرفت.

مواد و روش

این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود اجرا شد. حداقل و حداکثر دمای منطقه به‌ترتیب ۱۰- و ۴۰ درجه سانتی‌گراد و میانگین بارندگی سالانه در این منطقه حدود ۱۵۴ میلی‌متر است که این بارندگی‌ها عمدتاً در فصل پاییز و بهار رخ می‌دهد. مزرعه در عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۹ دقیقه شمالی و ۵۵ دقیقه طول شرقی واقع شده و میانگین ارتفاع آن از سطح دریا ۱۳۶۶ متر می‌باشد. نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه در عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- خصوصیات خاک محل آزمایش

Table 1- Soil characteristics of the test site

کلاس خاک	شن	رس	سیلت	کربن آلی	نیتروژن کل	پتاسیم قابل جذب	فسفر قابل جذب
(Soil class)	(Sand)	(Clay)	(Silt)	Organic) (carbon	Total) (nitrogen	Absorbable) (potassium	Absorbable) (phosphorus
				(%)		(ppm)	
لومی رسی	20.1	30.7	35	0.4	0.1	280	10

تیمارها شامل محلول‌پاشی نانو ذرات نقره در سه سطح (صفر، غلظت ۱/۵ و غلظت ۳ گرم بر لیتر)، محلول نانو ذرات نقره با خلوص ۹۹/۹۹ درصد از شرکت پیشگامان نانومواد به صورت کلوتیدی در آب مقطر تهیه شد. ذرات نقره دارای سایز ۵-۸ نانومتر، شکل کروی و سطح ویژه ۲۵-۴۲ متر مربع بر گرم بودند. چگالی واقعی ذرات نقره ۱۰/۹ گرم بر سانتی‌متر مکعب بود. pH محلول حدود ۱۱ ± ۰/۵ و رنگ آن قهوه‌ای پررنگ بود. محلول‌پاشی

هیدروسولفید سدیم در سه سطح (صفر، ۵/۰ و ۱ میلی مولار)، با فرمول شیمیایی NaHS، پودری با رنگ زرد روشن، محلول در آب، رهاکننده یون H_2S ، قلیایی و با pH حدود ۱۲ که از شرکت مرک تهیه شده بود. محلول پاشی سدیم نیتروپروساید در دو سطح (صفر و ۱۲۰ میکرومولار) با فرمول شیمیایی $Na[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ ، کریستال مانند با رنگ قهوه‌ای، محلول در آب، رهاکننده اکسید نیتریک (NO)، pH محلول تقریباً ۷-۷/۵ که از شرکت مرک تهیه شده بود. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار قرار گرفتند. به منظور آماده‌سازی زمین پس از انجام عملیات شخم و دیسک، پشته‌هایی به فواصل ۵۰ سانتی‌متر به وسیله فاروئر ایجاد و سپس شیلنگ‌های قطره‌ای پهن گردیدند. بذر سویا مورد استفاده رقم ویلیامز بود و عملیات کاشت با دست در ۲۷ خرداد ماه، به صورت هیرم کاری و در عمق سه سانتی‌متر انجام شد. در هر کرت آزمایشی چهار خط کاشت به طول چهار متر با فاصله روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. دو خط کناری به عنوان حاشیه در نظر گرفته شد و صفات مورد نظر روی دو خط وسط اندازه‌گیری گردید. آبیاری به صورت قطره‌ای و هر ۴ الی ۵ روز یک بار انجام شد و مقدار آب مصرفی برای همه تیمارها یکسان بود. ۲۰ و ۴۰ روز بعد از کاشت به ترتیب اولین و دومین وجین به صورت دستی انجام گرفت. محلول پاشی با نانو ذرات نقره طی یک مرحله و قبل از گلدهی (۴۶ روز پس از کاشت) به وسیله سمپاش دستی هنگام غروب و در هوایی کاملاً آرام انجام شد. پس از گذشت یک هفته محلول پاشی با هیدروسولفید سدیم و دو روز بعد با سدیم نیتروپروساید صورت گرفت. به منظور بررسی ماده خشک بخش‌های مختلف گیاه، از هر کرت آزمایشی، تعداد پنج بوته به طور تصادفی برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به بخش‌های برگ، ساقه و غلاف تفکیک شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند. سپس ماده خشک بر حسب گرم در مترمربع محاسبه گردید. در ۲۵ مهر ماه و پس از رسیدن گیاهان به مرحله رسیدگی فیزیولوژیک، از هر کرت پنج بوته برای اندازه‌گیری عملکرد برداشت شد.

رنگی‌های فتوسنتزی

به منظور اندازه‌گیری رنگی‌های فتوسنتزی برگ، ۰/۰۱ گرم از بافت تازه برگ در مرحله پیش از گلدهی توزین و به قطعات کوچکی خرد شد. به نمونه‌ها ۶ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۴ ساعت درون حمام آب گرم (بن ماری) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس در دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Jenway ۶۳۰۵ ساخت کشور آلمان)، میزان جذب نمونه‌های حاوی کلروفیل در طول موج‌های ۶۴۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. (Hiscox & Israelstam, 1978).

$$Chl\ a\ (\mu g/ml) = (12.25\ A\ 663) - (2.55\ A\ 645) \quad (۱)$$

$$Chl\ b\ (\mu g/ml) = (20.31\ A\ 645) - (4.91\ A\ 663) \quad (۲)$$

$$Car\ (\mu g/ml) = (1000\ A\ 470 - 1.90\ chl\ a - 63.14\ chl\ b) / 214 \quad (۳)$$

اعداد به دست آمده در $1000 \times v/w$ ضرب گردید تا اعداد بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر به دست آیند. v حجم محلول کلروفیلی بر حسب میلی‌لیتر و w وزن نمونه تر برگ بر حسب گرم می‌باشد.

آنتوسیانین برگ

در مرحله پیش از گلدهی مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت برگ تازه گیاهی با چهار میلی لیتر محلول اسیدکلریدریک یک درصد نرمال و متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر خوانده شد. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه ۴ و ۵ اندازه گیری گردید (Mita et al, 1997).

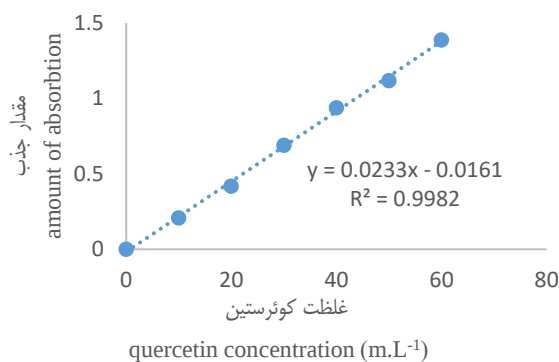
$$A=A_{530} - (0.25 A_{654}) \quad (4)$$

$$C(\text{mg}/100\text{g}) = A/eL \times MV \times DF \times V/G \times 100 \quad (5)$$

در این رابطه e مقدار جذب مولی آنتوسیانین و برابر ۲۶۰۰۰، L طول مسیر طی شده در سل و برابر یک سانتی متر، MV وزن مولی آنتوسیانین و برابر ۲/۴۹، DF ضریب رقیق سازی، V حجم نمونه و G وزن نمونه به میلی گرم است.

فلاونوئید برگ

برای سنجش میزان فلاونوئید در مرحله پیش از گلدهی ۰/۱ گرم وزن تر برگ در ۱۰ میلی لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵ درصد و اسیداستیک گلاسیال به نسبت حجمی ۱:۹۹) به خوبی ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد گرما داده شد و سپس در طول موج ۳۰۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان فلاونوئید از منحنی استاندارد کوئرستین (شکل ۱) استفاده شد (Krizek, 1998).



شکل ۱- منحنی استاندارد فلاونوئید برگ سویا در طول موج ۳۰۰ نانومتر

پایداری غشاء پلاسمایی

برای اندازه‌گیری پایداری غشاء پلاسمایی برگ در مرحله پیش از گلدهی، از هر کرت ۲ تا ۳ برگ هم‌سن انتخاب و سپس پانچ ۰/۰۱ گرم دیسک برگی تهیه گردید. نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفتند. از هر ترکیب تیماری دو نمونه تهیه شد. یک نمونه در بن‌ماری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه (a) و نمونه‌ی دیگر در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (b) قرار گرفتند. بعد از خنک شدن نمونه‌ها و هم‌دمای محیط شدن با استفاده از دستگاه EC متر، EC نمونه‌ها خوانده شد و پایداری غشاء پلاسمایی آن‌ها از رابطه ۶ محاسبه شد (Sairam & Srivastava, 2001).

$$(۶) \quad ۱۰۰ \times (1 - (a/b)) = \text{پایداری غشاء}$$

محتوای نسبی آب برگ

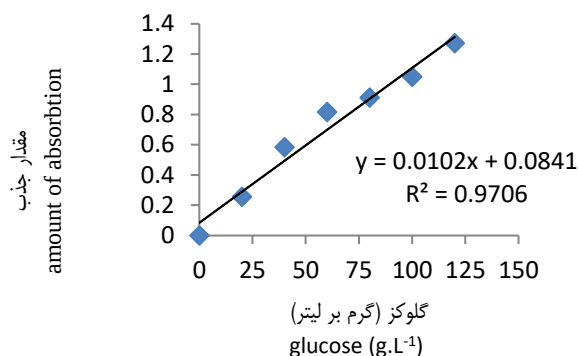
از هر کرت دو بوته به‌طور تصادفی انتخاب شد و از هر بوته یک برگ جوان و کاملاً رشد یافته در مرحله پیش از گلدهی قطع گردید. نمونه‌ها پس از توزین با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم (وزن تر)، به مدت ۲۴ ساعت درون آب مقطر و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس برگ‌ها از آب مقطر خارج و آب روی آن‌ها را با دستمال گرفته و خشک گردیدند و دوباره توزین شدند (وزن اشباع)، در نهایت نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری گردید (وزن خشک). محتوای نسبی آب برگ با استفاده از رابطه ۷ محاسبه شد (kramer, 1983).

$$(۷) \quad ۱۰۰ \times \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن اشباع})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})} = \text{مقدار نسبی آب برگ}$$

قند محلول برگ

به منظور اندازه‌گیری میزان قند محلول برگ ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر نمونه برگ‌های خشک شده در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد، هشت میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به آن افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به روشناور جمع شده به ترتیب ۳/۵ میلی‌لیتر سولفات روی ($ZnSO_4$) ۵ درصد و ۳/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید باریم ($Ba(OH)_2$) ۰/۳ نرمال اضافه گردید و دوباره ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. روشناور به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. براساس این روش دو میلی‌لیتر محلول برداشته شده، ابتدا یک میلی‌لیتر فنل پنج درصد و سپس پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ با فشار اضافه گردید. سپس میزان جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. محلول شاهد نیز با افزودن یک میلی‌لیتر فنل پنج درصد و پنج میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به دو میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. منحنی استاندارد با استفاده از محلول‌هایی با غلظت صفر تا ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر گلوکز خالص و تکرار کلیه مراحل روش فنل اسید سولفوریک روی دو میلی‌لیتر از آن‌ها به‌منظور تبدیل مقادیر ثبت شده توسط اسپکتروفتومتر به غلظت قند موجود در محلول در همان

روز رسم گردید. معادله حاکم بر منحنی استاندارد $ABS = aC + b$ می‌باشد که در آن ABS مقدار جذب، C غلظت قند موجود در محلول، a و b اعداد ثابت هستند (Hellubust & Caraigie, 1978)



شکل ۲- منحنی استاندارد قند محلول برگ سویا در طول موج ۴۸۵ نانومتر

داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. رسم شکل‌ها نیز با استفاده از نرم افزار EXCEL انجام گردید.

نتایج و بحث

ماده خشک اندام هوایی

مطابق جدول ۲ اثر دوگانه هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال پنج درصد و بقیه منابع تغییر به‌جز تکرار در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. میزان ماده خشک اندام هوایی در گیاهان شاهد $109/6$ گرم در متر مربع بود. که در اثر محلول‌پاشی گیاهان با میزان $1/5$ گرم در لیتر نانو ذرات نقره و شرایط عدم مصرف هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید به $99/5$ گرم در مترمربع و با آلوده کردن گیاهان با 3 گرم در لیتر نانو ذرات نقره با افت چشمگیر به $51/7$ گرم در متر مربع رسید. در شرایط عدم مصرف نانونقره، محلول‌پاشی هیدروسولفید سدیم با و بدون مصرف سدیم نیتروپروساید مقدار ماده خشک را به ترتیب $41/3$ و $107/6$ درصد نسبت به شاهد افزایش داد و به $154/83$ و $227/53$ گرم در متر مربع رسانید که بیشترین مقادیر این صفت در بین کلیه ترکیبات تیماری بود. در شرایط اعمال $1/5$ گرم در لیتر نانو ذرات نقره در هر سه سطح هیدروسولفید سدیم (عدم، $0/5$ و 1 میلی‌مولار)، محلول‌پاشی گیاهان با سدیم نیتروپروساید سبب افزایش معنی‌دار این صفت نسبت به شرایط عدم مصرف سدیم نیتروپروساید و همین‌طور شاهد شد. در زمان آلوده‌سازی گیاهان با بیشترین میزان نانو ذرات نقره همه ترکیبات تیماری حاصل از هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید سبب بهبود معنی‌دار ماده خشک شدند ولی فقط تیمار 1 میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم و مصرف سدیم نیتروپروساید سبب افزایش این صفت نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۳). نانو ذرات نقره با القای گونه‌های فعال اکسیژن منجر به تخریب ساختارهای سلولی، پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به پروتئین‌ها و اختلال در فتوسنتز

می‌شود. در چنین شرایطی، اگر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه قادر به مهار ROS نباشد، روند مرگ سلولی و اختلال در تقسیم و تمایز سلول‌های افزایش می‌یابد و در نتیجه وزن خشک به‌شدت کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که کاربرد نانو ذرات نقره در گیاه آبی *Spirodela polyrhiza* باعث افزایش تجمع ROS، تخریب کلروپلاست و تغییر در عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی شد، که این تغییرات مستقیماً با کاهش رشد گیاه مرتبط بودند (Zhang et al, 2014). هیدروسولفید سدیم می‌تواند با افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی مانند کلروفیل، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها، کارایی فتوسنتز را بهبود بخشد. این افزایش در فتوسنتز منجر به تولید بیشتر مواد آلی و در نتیجه افزایش وزن خشک غلاف می‌شود. همچنین نتایج نشان داده است که تیمار گیاهان با NaHS باعث افزایش محتوای H_2S درون‌زا، بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و بهبود صفات زراعی مانند ارتفاع گیاه، قطر ساقه و مساحت برگ‌ها در گیاه تنباکو شد که این تغییرات منجر به افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه گردید (Dai et al, 2024). افزایش فتوسنتز و کارایی آن به‌واسطه افزایش نیتریک اکسید (NO) که توسط سدیم نیتروپروساید آزاد می‌شود، منجر به افزایش سطح انرژی گیاه و بهبود فرآیندهای متابولیکی می‌شود. این امر در نهایت موجب تولید بیشتر مواد فتوسنتزی و افزایش وزن خشک غلاف‌ها می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط امید و سپهری (Omidi and Sepehri, 2015) انجام شد نتایج نشان داد که تیمار با سدیم نیتروپروساید موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام‌های هوایی در گیاه لوبیا قرمز می‌شود.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نانو ذرات نقره، هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر کلروفیل a و b، کاروتنوئید، عملکرد دانه و ماده خشک بخش هوایی گیاه سویا

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	ماده خشک بخش هوایی Shoot dry matter	عملکرد دانه Grain yield	کلروفیل آ Chlorophyll a	کلروفیل ب Chlorophyll b	کاروتنوئید Carotenoid
تکرار Repetition	2	39.966	1815.505	0.000364	0.00624	0.00038
نانونقره Nanosilver (a)	2	9774.511**	124884.94**	0.0460**	0.1880**	0.15477**
هیدروسولفید سدیم NaHS (b)	2	9383.143**	9167.706**	0.0261**	0.00487*	0.00012
سدیم نیتروپروساید SNP (c)	1	999.320**	71.38	0.00633*	0.000261	0.00148*
نانونقره*هیدروسولفید سدیم a*b	4	6089.0171**	11364.65**	0.03364**	0.007736**	0.00323**
نانونقره*سدیم نیتروپروساید a*c	2	5998.717**	12477.3**	0.00620*	0.002953	0.000815
هیدروسولفید سدیم*سدیم نیتروپروساید b*c	2	112.655*	1636.4	0.003344	0.001538	0.00033
نانونقره*هیدروسولفید سدیم*سدیم نیتروپروساید a*b*c	4	2570.826**	3541.28**	0.004863**	0.00555**	0.000197
خطا Error	34	30.263	730.831	0.001281	0.000998	0.000270

CV ضریب تغییرات (%)	5.024	13.13	3.71	5.33	2.48
---------------------	-------	-------	------	------	------

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح یک و پنج درصد می باشد.

* and ** are significant at the 1 and 5 percent levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر برهم کنش نانو ذرات نقره، هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر برخی صفات فیزیولوژیک و زراعی گیاه سویا

Table 3- Comparison of the average effect of the interaction of Silver nanoparticles, sodium hydrosulfide and sodium nitroprusside on some physiological and agronomic traits of soybean plant

نانونقره (گرم در لیتر) Nanosilver (g.L ⁻¹)	هیدروسولفید سدیم (میلی مولار) NaHS (mM)	سدیم نیتروپروساید (میکرومولار) SNP (μM)	ماده خشک بخش هوایی Shoot dry matter	عملکرد دانه Grain yield	کلروفیل آ Chlorophyll a	کلروفیل ب Chlorophyll b
			g.m ⁻²	g.g Fw ⁻¹		
0	0	0	109.600 ^e	270.03 ^{bc}	0.988 ^{bcd}	0.651 ^{bc}
		120	70.100 ^{ij}	193.45 ^{def}	1.011 ^{ab}	0.623 ^{cd}
	0.5	0	97.667 ^f	288.32 ^b	0.927 ^{ef}	0.701 ^{ab}
		120	115.467 ^e	292.02 ^b	0.902 ^{fg}	0.718 ^a
	1	0	227.533 ^a	420.26 ^a	1.008 ^{ab}	0.708 ^a
		120	154.833 ^b	310.16 ^b	1.012 ^{ab}	0.706 ^a
1.5	0	0	99.500 ^f	208.41 ^d	0.983 ^{bcde}	0.595 ^d
		120	139.933 ^c	209.02 ^d	1.013 ^{ab}	0.609 ^{cd}
	0.5	0	100.100 ^f	150.97 ^{fg}	1.028 ^{ab}	0.577 ^{de}
		120	139.600 ^c	225.94 ^{cd}	1.055 ^a	0.579 ^{de}
	1	0	87.000 ^g	151.74 ^{fg}	1.005 ^{abc}	0.702 ^{ab}
		120	127.033 ^d	198.50 ^{de}	0.948 ^{cdef}	0.596 ^d
3	0	0	51.700 ^k	93.43 ^h	0.840 ^{hi}	0.473 ^{gh}
		120	61.900 ^j	116.08 ^{gh}	0.843 ^{gh}	0.536 ^{ef}
	0.5	0	98.867 ^f	160.64 ^{efg}	0.783 ⁱ	0.489 ^{fgh}
		120	82.700 ^{gh}	138.99 ^g	0.933 ^{def}	0.442 ^h
	1	0	74.833 ^{hi}	119.51 ^{gh}	1.017 ^{ab}	0.453 ^{gh}
		120	132.667 ^{cd}	158.48 ^{efg}	1.057 ^a	0.501 ^{fg}
LSD 5%			9.128	44.858	0.0594	0.0525

وجود حرف مشترک در هر ستون نشانه عدم اختلاف معنی دار است

The presence of a common letter in each column indicates no significant difference.

عملکرد دانه

عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر کلیه منابع تغییر به جز تکرار، سدیم نیتروپروساید و اثر دوگانه هیدروسولفید و سدیم نیتروپروساید

قرار گرفت (جدول ۴). نتایج حاصل از برهم کنش سه گانه تیمارهای آزمایش مزرعه‌ای بر میزان عملکرد نشان داد که جذب برگی نانو ذرات نقره سبب

کاهش عملکرد دانه می‌شود. میزان عملکرد در گیاهان شاهد ۲۷۰ گرم در متر مربع بود که افت چشمگیر در زمان استفاده از ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره و عدم مصرف هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید (به ترتیب به میزان ۲۰۸/۴ و ۹۳/۴ گرم در متر مربع) دیده شد. بیشترین میزان عملکرد در سطح صفر نانونقره، یک میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم و عدم مصرف سدیم نیتروپروساید (۴۲۰/۳ گرم در متر مربع) بود اما همین ترکیبات تیماری در دو سطح ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره (به ترتیب با مقادیر ۱۵۱/۷ و ۱۱۹/۵ گرم در مترمربع) کاهش قابل توجه داشتند و استفاده از تیمارهای آزمایشی توانست تا حد زیادی کاهش عملکرد ناشی از سطح بالای نانونقره را جبران نماید. به عنوان مثال محلول پاشی با ۰/۵ میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم سبب افزایش ۷۲ درصدی عملکرد نسبت به سطح صفر تیمارها در شرایط سمیت بالای نانونقره گردید. افزایش حاصل از کاربرد ۱ میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم به همراه ۱۲۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید نیز در این شرایط حدود ۷۰ درصد بود (جدول ۳). نانو ذرات ممکن است سبب اختلال در جذب عناصر غذایی ضروری مانند نیتروژن، فسفر و آهن شوند. از سوی دیگر، نانو ذرات نقره می‌تواند با آسیب به ساختار کلروپلاست و کاهش کلروفیل، فرآیند فتوسنتز را مختل کند. در نهایت، این نانو ذرات ممکن است از طریق برهم زدن تعادل هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، رشد و نمو طبیعی گیاه را کاهش دهند (Yan & Chen, 2019). هیدروسولفید سدیم با آزادسازی H_2S ، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود که از گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند. این ترکیب همچنین باعث افزایش محتوای کلروفیل و بهبود فتوسنتز می‌شود و در نتیجه رشد گیاه را تقویت می‌کند. از طرفی، H_2S با تنظیم تعادل یونی و جذب بهتر عناصر غذایی، تغذیه گیاه را بهبود می‌دهد. در نهایت، با تنظیم بیان ژن‌ها و مسیرهای هورمونی، فرآیندهای رشد و توسعه گیاه را فعال تر می‌کند و به این ترتیب عملکرد گیاه افزایش می‌یابد (Dai et al, 2024). گزارش شده که مصرف نانونقره سبب کاهش عملکرد در لوبیاسبز می‌شود (Rafaati Alashti et al, 2021).

کلروفیل a

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که اثر اصلی نانو ذرات نقره، هیدروسولفید سدیم و اثر دوگانه نانونقره و هیدروسولفید و اثر سه‌گانه نانو ذرات نقره، هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال یک درصد و اثر اصلی سدیم نیتروپروساید و اثر دوگانه نانو ذرات نقره و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شدند. در بین ترکیبات تیماری حاصل از برهم‌کنش سه‌گانه تیمارها، در مجموع تعداد کمی از ترکیبات تیماری توانستند اختلاف معنی‌داری نسبت با شاهد داشته باشند. آلودگی با سطح سوم نانو ذرات نقره (۳ گرم بر لیتر) کاهش معنی‌دار قابل توجهی در مقدار کلروفیل a برگ ایجاد نمود که با مصرف هیدروسولفید سدیم با غلظت ۱ میلی‌مولار دوباره به سطح گیاهان شاهد برگشت و با اضافه شدن سدیم نیتروپروساید حتی بهتر از گیاهان شاهد شد. از این رو در بین تیمارهای مورد مطالعه بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به ترکیبات تیماری ۳ گرم در لیتر نانونقره، ۱ میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم و مصرف سدیم نیتروپروساید، با میزان ۱/۰۶ گرم بر گرم وزن تر برگ بود که البته تفاوت معنی‌داری با هشت ترکیب تیماری دیگر نداشت. کمترین میزان این صفت نیز مربوط به تیمار ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره، ۰/۵ میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم و عدم مصرف سدیم نیتروپروساید (۰/۷۸ گرم بر گرم وزن تر برگ) بود که البته با تیمار ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره و عدم مصرف هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی‌دار

نداشت اما نسبت به شاهد ($0/99$ گرم بر گرم وزن تر برگ) کاهش 21 درصدی داشت (جدول ۳). در تحقیقاتی که طباطبایی پژوه و همکاران (Tabatabaei Pazouh et al, 2013) روی کلزا انجام دادند بیان شد که نانوقره باعث کاهش میزان کلروفیل در گیاهان می شود که این اثر به دلیل تنش اکسیداتیو ناشی از نانو ذرات نقره بوده است.

همچنین گزارش شده است که سولفید هیدروژن مولکولی مشارکت کننده در سیگنالینگ است که فرآیند فتوسنتز را با افزایش بیوژنز کلروپلاست و تثبیت دی اکسید کربن بهبود می بخشد که این تغییرات متابولیکی می تواند به حفظ و افزایش محتوای کلروفیل a کمک کند (Mostofa et al, 2015). علی و همکاران (Ali et al, 2014) گزارش کردند هیدروسولفید سدیم سبب افزایش کلروفیل در گیاه کلزا می شود. همچنین سدیم نیتروپروساید به عنوان دهنده نیتریک اکسید می تواند نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای متابولیکی در گیاهان داشته باشد. یکی از این فرآیندها، سنتز کلروفیل a است. نیتریک اکسید از طریق تأثیر بر فعالیت های آنزیمی و مسیرهای سیگنال دهی، می تواند باعث افزایش سنتز کلروفیل a و بهبود فرآیند فتوسنتز در گیاهان شود. بنابراین، NO به طور غیرمستقیم بر تولید کلروفیل a تأثیر می گذارد و به این ترتیب در بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان کمک کند (Chamizo et al, 2017). همچنین در تحقیقات یزدی و میرزایی (Yazdi & Mirzaei, 2021) گزارش شد که مصرف سدیم نیتروپروساید سبب افزایش کلروفیل روی گیاه همیشه بهار می شود.

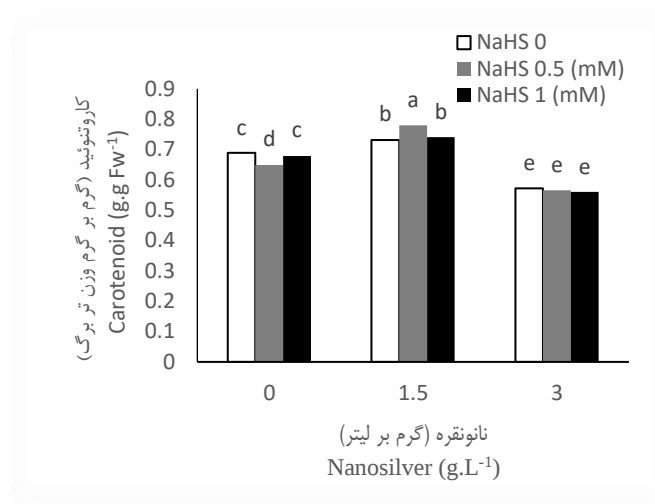
کلروفیل b

اثر اصلی نانوذرات نقره، اثر دوگانه نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم و اثر سه گانه نانو ذرات نقره، هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال یک درصد و اثر اصلی هیدروسولفید سدیم در سطح احتمال پنج درصد بر میزان کلروفیل b معنی دار شد (جدول ۲). مطابق جدول ۳ استفاده از غلظت 3 گرم در لیتر نانو ذرات نقره سبب کاهش میزان این صفت در کلیه ترکیبات تیماری نسبت به شاهد شد. البته مقدار کاهش در گیاهانی که فقط با سدیم نیتروپروساید محلول پاشی شدند، کمتر بود. در گیاهان آلوده به $1/5$ گرم در لیتر نانوقره تیمارهای 1 میلی مولار هیدروسولفید و عدم مصرف سدیم نیتروپروساید ($0/7$ گرم بر گرم وزن تر برگ) و عدم مصرف هیدروسولفید سدیم و مصرف سدیم نیتروپروساید ($0/61$ گرم بر گرم وزن تر برگ) با شاهد ($0/65$ گرم بر گرم وزن تر برگ) اختلاف معنی دار نداشت. سایر ترکیبات تیماری سبب کاهش میزان کلروفیل b شدند. در سطح صفر نانو ذرات نقره بیشترین افزایش کلروفیل b با مصرف غلظت 1 میلی مولار هیدروسولفید سدیم و عدم مصرف و مصرف سدیم نیتروپروساید (به ترتیب $0/708$ و $0/706$ گرم بر گرم وزن تر برگ) و مصرف $0/5$ میلی مولار هیدروسولفید سدیم و مصرف سدیم نیتروپروساید ($0/718$ گرم بر گرم وزن تر برگ) دیده شد (جدول ۳). گزارش شده است که هیدروسولفید سدیم سبب افزایش مقدار کلروفیل در گیاه ذرت می شود (Zangeneh et al, 2018). مطالعات متعددی نشان داده اند که نانو ذرات نقره با تولید گونه های فعال اکسیژن سبب بروز تنش اکسیداتیو در سلول های گیاهی می شود و در نتیجه، فعالیت آنزیم های درگیر در سنتز کلروفیل مانند آمینولولینیک اسید سنتاز و کلروفیل سنتاز را مختل می کند. همچنین، نقره ممکن است با جانشینی یون های فلزی ضروری نظیر منیزیم در ساختار کلروفیل، موجب بی ثباتی آن شود (Yin et al, 2012).

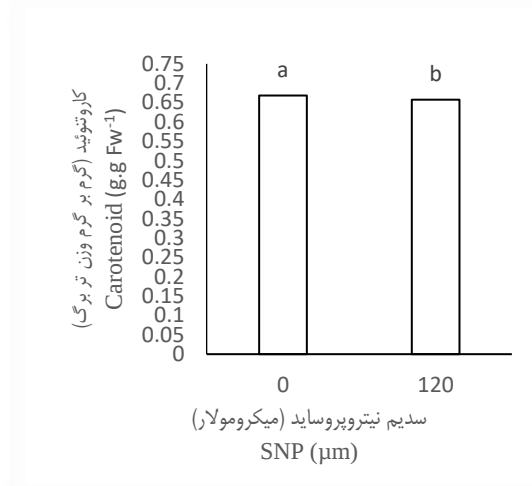
کاروتنوئید

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، مقدار کاروتنوئید برگ تحت تأثیر اثر اصلی نانو ذرات نقره و اثر دوگانه نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم در سطح احتمال یک درصد و اثر اصلی سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال پنج درصد قرار گرفت. مطابق شکل ۳ میزان کاروتنوئید در برگ گیاهان شاهد در سطح صفر نانو ذرات نقره ۰/۶۹ گرم بر گرم وزن تر برگ بود. محلول پاشی با هیدروسولفید سدیم در این سطح از نانو ذرات نقره اثر مثبتی نداشت. در سطح ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره، افزایش معنی‌داری در مقدار این صفت ثبت گردید. طوری که هم حضور نانو ذرات نقره و هم غلظت‌های هیدروسولفید سدیم مقادیر بالایی از کاروتنوئید نشان دادند. در این میان مصرف ۰/۵ میلی‌مولار هیدروسولفید سدیم با ۰/۷۸ گرم بر گرم وزن تر برگ کاروتنوئید از نظر آماری برتر بود. کمترین مقادیر این صفت در اثر آلودگی با ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره دیده شد. در این سطح از نانونقره نیز محلول پاشی با هیدروسولفید سدیم مفید نبود. براساس نتایج به‌دست آمده، کاروتنوئید در برگ گیاهان دریافت کننده سدیم نیتروپروساید ۰/۶۵۷ گرم بر گرم وزن تر برگ بود که نسبت به شرایط عدم مصرف آن (۰/۶۶۸ گرم بر گرم وزن تر برگ) کاهش ۱/۶ درصدی داشت (شکل ۴). در غلظت‌های بالای نانوذرات، از جمله نانو ذرات نقره شواهد متعددی نشان داده‌اند که این مواد می‌توانند به‌جای تحریک سیستم دفاعی گیاه، منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو شدید، تخریب کلروپلاست‌ها و در نتیجه کاهش سنتز کاروتنوئیدها شوند. کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگدانه‌های فتوسنتزی و آنتی‌اکسیدان‌های مهم، در پاسخ به تنش‌های محیطی تنظیم می‌شوند. با این حال، تحت تنش شدید ناشی از نانونقره، مسیرهای بیوسنتزی آن‌ها ممکن است مختل گردد یا فعالیت آنزیم‌های دخیل در تولید آن‌ها مهار شود. مطالعاتی همچون رالیا و همکاران (Raliya et al, 2015) نیز نشان داده‌اند که اگرچه نانوذرات در غلظت‌های پایین باعث افزایش کاروتنوئیدها می‌شوند، اما در غلظت‌های بالا ممکن است اثر معکوس داشته باشند. بر همین اساس، کاهش مشاهده‌شده در محتوای کاروتنوئید در برخی تیمارهای حاوی نانو ذرات نقره، می‌تواند ناشی از آثار تخریبی این نانوذره در غلظت‌های بالا تلقی شود. افزایش میزان کاروتنوئید در تیمار حاوی هیدروسولفید سدیم (NaHS) احتمالاً ناشی از نقش سیگنال‌دهی گاز سولفید هیدروژن (H_2S) در تنظیم پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتزی گیاه است. گزارش شده است که H_2S با فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند SOD، CAT و APX از ساختار و عملکرد کلروپلاست محافظت می‌کند و در نتیجه، پایداری مسیرهای بیوسنتزی کاروتنوئید نظیر مسیر موالونوئیک اسید را تقویت می‌کند. همچنین شواهد نشان می‌دهد که H_2S ممکن است باعث افزایش بیان ژن‌های کلیدی مانند PSY و DXS شود که نقش اصلی در مراحل آغازین بیوسنتز کاروتنوئید دارند (Li et al, 2012). سدیم نیتروپروساید به‌عنوان دهنده‌ی NO در گیاهان شناخته می‌شود و در بسیاری از پاسخ‌های تنظیمی از جمله القای دفاع آنتی‌اکسیدانی، تنظیم رشد، و تعامل با گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارد (Delledonne, 1998). با این حال، در شرایطی خاص، آزادسازی بیش از حد NO ممکن است منجر به شکل‌گیری گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) مانند پُرکسی‌نیتريت ($ONOO^-$) شود، که ترکیبات زیستی حساس از جمله رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی را هدف قرار می‌دهد (Arasimowicz & Floryszak, 2014). کاروتنوئیدها به دلیل داشتن پیوندهای دوگانه گسترده، به‌شدت نسبت به تنش اکسیداتیو و نیتروژاتیو حساس‌اند و می‌توانند در حضور گونه‌های فعال

نیتروژن دچار تخریب ساختاری شوند (Havaux, 2014). علاوه بر آن، مطالعات نشان داده‌اند که NO می‌تواند از طریق نیتروزیلایسیون آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز کاروتنوئید، مانند phytoene synthase یا lycopene cyclase فعالیت آن‌ها را کاهش دهد (Zhang et al, 2014).



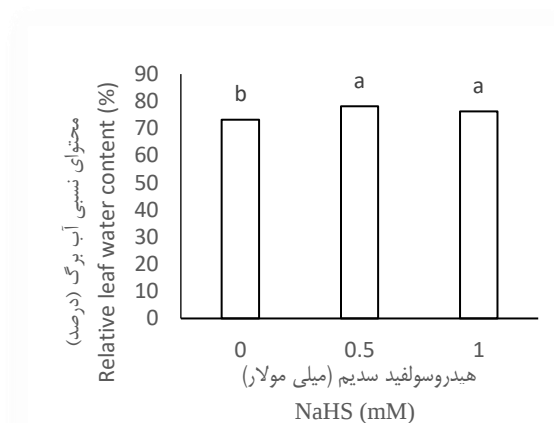
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم بر کاروتنوئید برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.
Figure 1- Comparison of the average effect of the interaction of Silver nanoparticles and sodium hydrosulfide on **soybean** leaf carotenoids. The presence of a common letter indicates no significant difference.



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر سطوح سدیم نیتروپروساید بر میزان کاروتنوئید برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.
Figure 2 - Comparison of the mean effect of sodium nitroprusside levels on **soybean** leaf carotenoid. The presence of a common letter indicates no significant difference.

محتوای نسبی آب برگ

همان‌طور که در نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۴ مشاهده می‌شود، تنها اثر اصلی هیدروسولفید سدیم بر این صفت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. مطابق شکل ۵ کمترین میزان محتوای نسبی آب برگ در تیمار شاهد معادل ۷۳/۱۴ درصد به‌دست آمد که با محلول‌پاشی غلظت‌های هیدروسولفید سدیم (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) به‌ترتیب به ۷۸/۷ و ۷۶/۳ درصد رسید که اگرچه با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند، ولی نسبت به سطح صفر، این صفت را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشیدند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که H_2S از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، حفظ سلامت غشای سلولی و کاهش نفوذپذیری غشاء سلولی در برابر تنش‌های محیطی می‌تواند به بهبود وضعیت آبی گیاه کمک کند. به علاوه، سولفید هیدروژن با افزایش فشار تورژسانسی و بهبود ساختار و عملکرد غشاهای سلولی، باعث افزایش جذب و نگهداری آب در گیاه می‌شود (Zhao et al, 2021).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر سطوح هیدروسولفید سدیم بر محتوای نسبی آب برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

Figure 3 - Comparison of the average effect of sodium hydrosulfide levels on the relative **soybean** leaf water content. The presence of a common letter indicates no significant difference.

جدول ۴- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نانو ذرات نقره، هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشاء پلاسمایی، فلاونوئید، آنتوسیانین و قند محلول برگ گیاه سویا

Table 4- Analysis of variance (mean square) of the effect of Silver nanoparticles, sodium hydrosulfide and sodium nitroprusside on relative leaf water content, plasma membrane stability, flavonoid, anthocyanin and leaf soluble sugar soybean plant

منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای نسبی آب برگ	پایداری غشاء پلاسمایی	فلاونوئید	آنتوسیانین	قند محلول برگ
S.O.V	Df	Relative leaf water content	Plasma membrane stability	Flavonoid	Anthocyanin	Leaf soluble sugar
تکرار	2	32.47	10.084	0.000095	0.000218	0.000225
Repetition						
نانونقره	2	30.25	481.91**	0.01245**	0.1508**	0.01057**
(a) Nanosilver						
هیدروسولفید سدیم	2	116.0522**	28.65	0.00036	0.0041	0.000058
(b) NaHS						
سدیم نیتروپروساید	1	16.604	30.066	0.00049**	0.0024	0.000012
(c) SNP						
نانونقره*هیدروسولفید سدیم	4	8.804	11.019	0.000274**	0.0252**	0.000093
a*b						
نانونقره*سدیم نیتروپروساید	2	1.185	3.191	0.00003	0.0185**	0.00023
a*c						
هیدروسولفید سدیم*سدیم نیتروپروساید	2	3.116	2.465	0.00075**	0.0168*	0.0000617
b*c						
نانونقره*هیدروسولفید سدیم*سدیم نیتروپروساید	4	6.251	6.616	0.000857	0.00676	0.000102
a*b*c						
خطا	34	12.077	15.455	0.000057	0.00318	0.000159
Error						
CV. ضریب تغییرات (%)		4.58	5.83	17.26	7.37	21.23

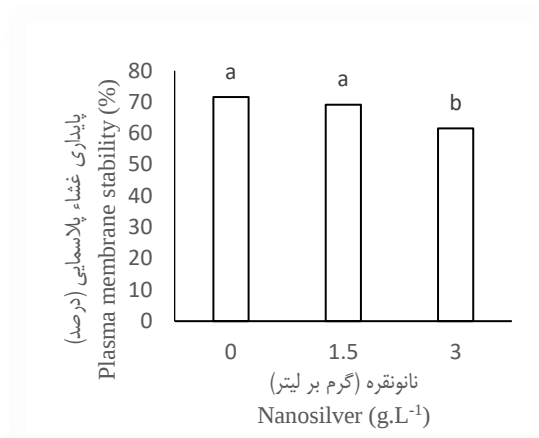
* و ** به ترتیب معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد می باشد.

*and ** are significant at the 1 and 5 percent levels, respectively.

پایداری غشاء پلاسمایی

اثر اصلی نانو ذرات نقره در سطح احتمال یک درصد بر این صفت معنی دار بود (جدول ۴). نانو ذرات نقره سبب کاهش پایداری غشاء پلاسمایی شد. میزان پایداری غشاء پلاسمایی در برگ گیاهان شاهد ۷۱/۵۵ درصد بود که با غلظت ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره به ۶۹/۱ درصد کاهش پیدا کرد که البته از نظر آماری معنی دار نبود. دو برابر شدن آلودگی نانو ذرات نقره ۳ گرم در لیتر اثر منفی بیشتر و معنی دار از لحاظ آماری داشت و مقدار این صفت را به ۶۱/۶ درصد رساند (شکل ۶). مطالعات متعدد نشان داده اند که نانونقره می تواند غشاهای سلولی را تحت تأثیر قرار دهد و باعث آسیب و پاره گی غشاها شود. این اثرات می تواند به کاهش کارایی غشا در حفظ یکپارچگی سلولی به ویژه در غلظت های بالا منجر شود (Kumari et al, 2009). غلظت بالای نانو ذرات نقره به دلیل خواص نانو ذره ای و واکنش پذیری بالای آن، می تواند موجب تنش اکسیداتیو شدید در سلول های گیاهی شود. این حالت با افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن همراه است که در غلظت های پایین نقش سیگنال دهنده دارند، اما در غلظت های بالا سبب آسیب به ساختارهای سلولی می شوند.

یکی از اهداف اصلی ROS، لیپیدهای غشای پلاسمایی هستند که تحت فرآیند پراکسیداسیون لیپید قرار می‌گیرند. پراکسیداسیون لیپیدها باعث کاهش پایداری غشا و افزایش نفوذپذیری آن و در نهایت موجب نشت یون‌ها و مولکول‌های حیاتی از سلول می‌گردد (Mukhopadhyay, 2014)

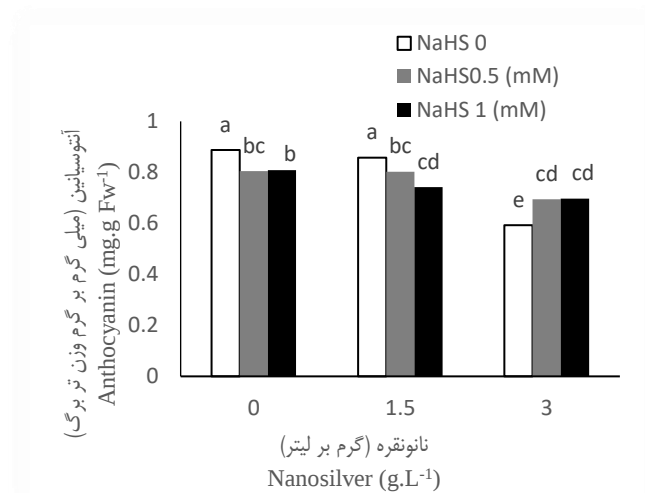


شکل ۶- مقایسه میانگین اثر سطوح نانو ذرات نقره بر پایداری غشاء پلاسمایی برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد
Figure 4- Comparison of the average effect of Silver nanoparticles surfaces on the stability of the Soybean leaf plasma membrane. The presence of a common letter indicates no significant difference.

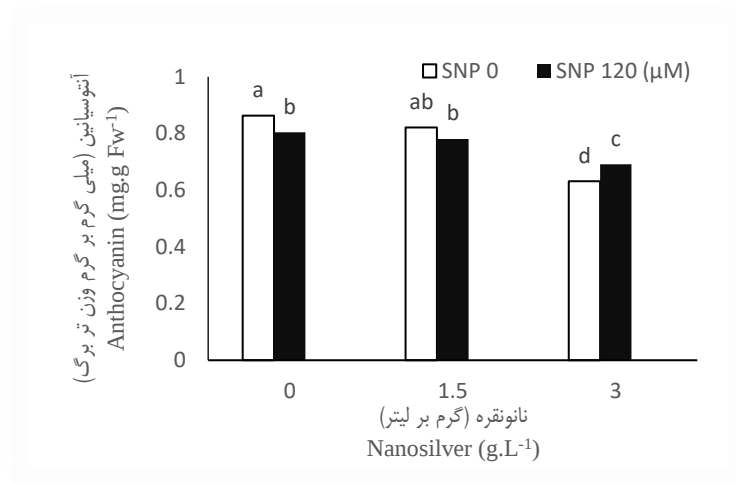
آنتوسیانین

آنتوسیانین برگ از نانو ذرات نقره و برهم‌کنش آن با هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال یک درصد و برهم‌کنش هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال پنج درصد تأثیر پذیرفت (جدول ۴). بررسی ۹ ترکیب تیماری حاصل از نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم نشان داد که بیشترین میزان آنتوسیانین در دو غلظت صفر و ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره بدون استفاده از هیدروسولفید سدیم ثبت شد سایر ترکیبات تیماری این صفت را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش دادند. کمترین میزان ثبت شده زمان استفاده از ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره و عدم مصرف هیدروسولفید سدیم (۰/۵۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) بود که نسبت به شاهد کاهش ۳۳ درصدی داشت. محلول‌پاشی با دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار هیدروسولفید تنها در سطح آلودگی شدید نانو نقره (۳ گرم بر لیتر) مفید بود و تا حد زیادی اثر منفی این فلز سنگین را کاهش داد ولی باز هم نتوانست شرایط را به حالت عادی در گیاهان شاهد باز گرداند (شکل ۷). در بررسی برهم‌کنش نانو ذرات نقره و سدیم نیتروپروساید نیز تقریباً نتایج مشابهی به‌دست آمد به‌طوری که میزان آنتوسیانین در گیاهان شاهد ۰/۸۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ بود که اگرچه با محلول‌پاشی ۱/۵ گرم بر لیتر نانو ذرات نقره کاهش جزئی یافت ولی معنی‌داری نبود. کمترین میزان آنتوسیانین زمان استفاده از ۳ گرم در لیتر نانو ذرات نقره و عدم مصرف سدیم نیتروپروساید (۰/۶۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) ثبت شد که نسبت به شاهد ۲۷ درصد کمتر بود. محلول‌پاشی با سدیم نیتروپروساید در دو سطح صفر و ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره سبب کاهش این صفت شد ولی در سطح ۳ گرم در لیتر این صفت را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید (شکل ۸). از طرفی در بررسی ۶ ترکیب تیماری حاصل از

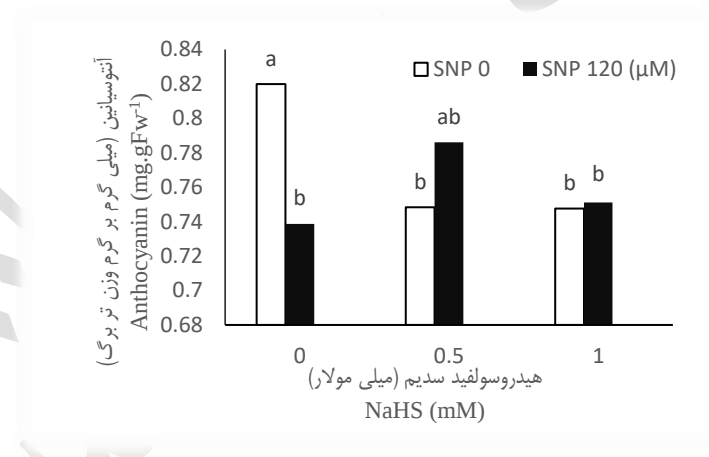
هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید، بیشترین میزان آنتوسیانین در برگ گیاهان شاهد (۰/۸۲ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) ثبت شد که البته با ترکیب تیماری ۰/۵ میلی مولار هیدروسولفید سدیم و ۱۲۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی دار نداشت. سایر ترکیبات تیماری بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر، نسبت به شاهد به طور قابل توجهی کمتر بودند. بنابراین در این شرایط اثر مثبت و معنی داری از هیچکدام از تیمارهای هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید مشاهده نشد (شکل ۹). گونه های فعال اکسیژن، در غلظت های کم، به عنوان سیگنال های سلولی عمل کرده و پاسخ های دفاعی گیاه، مانند سنتز فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها را تحریک می کنند. اما در غلظت های بالاتر ذرات نقره، تجمع بیش از حد ROS منجر به آسیب اکسیداتیو شدید به ساختارهای سلولی و آنزیم های دخیل در مسیرهای بیوسنتزی این ترکیبات می شود. به طور خاص، آنتوسیانین ها که نقش آنتی اکسیدانی و حفاظتی در گیاه دارند، تحت تنش شدید ذرات نقره کاهش می یابند، چرا که فعالیت آنزیم های کلیدی مانند فنیل آلانین آمونیاک لیاز (PAL) و سایر آنزیم های مسیر بیوسنتز آن ها مهار می شود (Mukhopadhyay, 2014). با کاربرد NaHS به عنوان دهنده سولفید هیدروژن (H_2S) و SNP به عنوان دهنده نیتریک اکسید (NO)، گیاه قادر است از طریق تنظیم مسیرهای آنتی اکسیدانی مانند فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، و آسکوربات پراکسیداز، سطح ROS را کنترل کرده و در نتیجه نیازی به سنتز بیشتر آنتوسیانین احساس نمی کند. این پدیده کاهش تقاضای گیاه برای مکانیسم های دفاعی غیرآنزیمی مانند آنتوسیانین را توضیح می دهد (Li et al., 2012; Li et al., 2021).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر برهم کنش نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم بر آنتوسیانین برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار می باشد.
Figure 5- Comparison of the average effect of Silver nanoparticles and sodium hydrosulfide on Soybean leaf anthocyanin. The presence of a common letter indicates no significant difference.



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر برهم کنش سطوح نانو ذرات نقره و سدیم نیتروپروساید بر آنتوسیانین برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار می باشد
Figure 6 - Comparison of the average effect of Silver nanoparticles and sodium nitroprusside levels on Soybean leaf anthocyanin levels. The presence of a common letter indicates no significant difference.

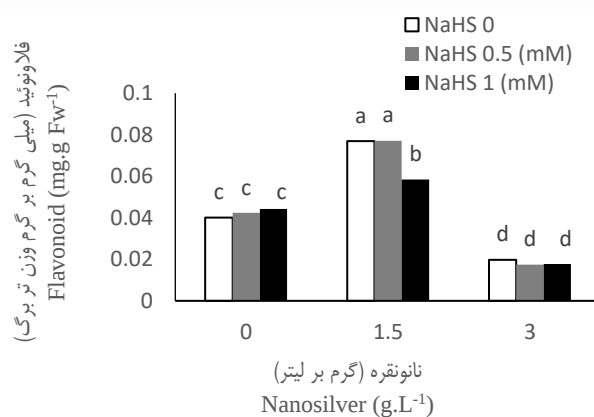


شکل ۹- مقایسه میانگین اثر سطوح هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر میزان آنتوسیانین برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار
Figure 7 - Comparison of the average effect of sodium hydrosulfide and sodium nitroprusside levels on Soybean leaf anthocyanin. The presence of a common letter indicates no significant difference.

فلاونوئید

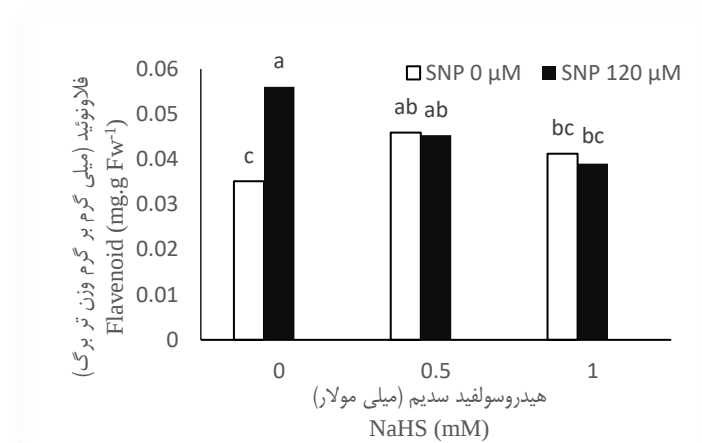
اثر نانونقره، سدیم نیتروپروساید، برهم کنش نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم و برهم کنش هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر این صفت در سطح احتمال یک درصد معنی دار گردید (جدول ۴). میزان فلاونوئید در برگ گیاهانی که با ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره محلول پاشی شده بودند افزایش چشمگیر داشت به طوری که مقدار این صفت در شرایط مصرف ۰/۵ میلی مولار و عدم مصرف هیدروسولفید سدیم به ترتیب ۰/۰۷۷۱ و ۰/۰۷۶۹ گرم بر گرم

وزن تر برگ به حداکثر خود رسید و نسبت به شاهد افزایش ۴۸ درصدی داشت. دز بالای هیدروسولفید سدیم در این سطح از نانو ذرات نقره موجب کاهش معنی دار فلاونوئید گردید. مقدار فلاونوئید برگ در غلظت بالای نانو ذرات نقره (۳ گرم بر لیتر) به طور قابل توجهی پایین بود. این مقدار در سطح صفر NaHS نسبت به متناظر خود در سطح صفر و ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره به ترتیب ۵۰ و ۷۴ درصد کمتر بود (شکل ۱۰). اثر برهم کنش هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر مقدار فلاونوئید برگ نیز نشان داد که مصرف و عدم مصرف سدیم نیتروپروساید در غلظت های ۰/۵ و ۱ میلی مولار هیدروسولفید سدیم اگرچه از لحاظ عددی با یکدیگر تفاوت داشتند اما از لحاظ آماری هیچ تفاوت معنی داری بین این چهار ترکیب تیماری دیده نشد. میزان فلاونوئید در شاهد ۰/۳۵۱ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ بود و زمانی که گیاهان فقط با سدیم نیتروپروساید محلول پاشی شدند به حداکثر خود (۰/۵۶ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) رسید (شکل ۱۱). در غلظت بالای نانو ذرات نقره (۳ گرم بر لیتر)، کاهش شدید فلاونوئیدها نسبت به شاهد مشاهده شد. این افت شدید می تواند ناشی از افزایش بیش از حد ROS، اختلال در تعادل آنتی اکسیدانی سلول و آسیب به ساختارهای سلولی از جمله آنزیم های دخیل در بیوسنتز فلاونوئیدها باشد. در واقع، در غلظت های بالا، نانو ذرات نقره به جای تحریک، موجب تنش اکسیداتیو شدید و سرکوب مکانیسم های دفاعی گیاه می شود (Vannini et al, 2014). نیتریک اکسید به عنوان یک مولکول پیام رسان ثانویه، مسیرهای سیگنال دهی متعددی را در سلول های گیاهی فعال می کند که از جمله آن ها فعال سازی آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز (PAL) است (Neill et al., 2008). افزایش فعالیت PAL در حضور NO باعث تحریک مسیر فنیل پروپانویید می شود و تولید ترکیبات فنلی، به ویژه فلاونوئیدها، افزایش می یابد. این ترکیبات نه تنها به عنوان آنتی اکسیدان های قوی، در حذف رادیکال های آزاد نقش دارند، بلکه به پایداری غشا، تنظیم رشد سلولی و حفاظت نوری نیز کمک می کنند (Del Río, 2015). بنابراین، افزایش فلاونوئید در پاسخ به SNP می تواند نتیجه یک پاسخ دفاعی تنظیم شده توسط نیتریک اکسید باشد که به کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش تحمل گیاه کمک می کند.



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر برهم کنش نانو ذرات نقره و هیدروسولفید سدیم بر فلاونوئید برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار می باشد.

Figure 8 - Comparison of the average effect of Silver nanoparticles and sodium hydrosulfide levels on Soybean leaf flavonoid. The presence of a common letter indicates no significant difference.

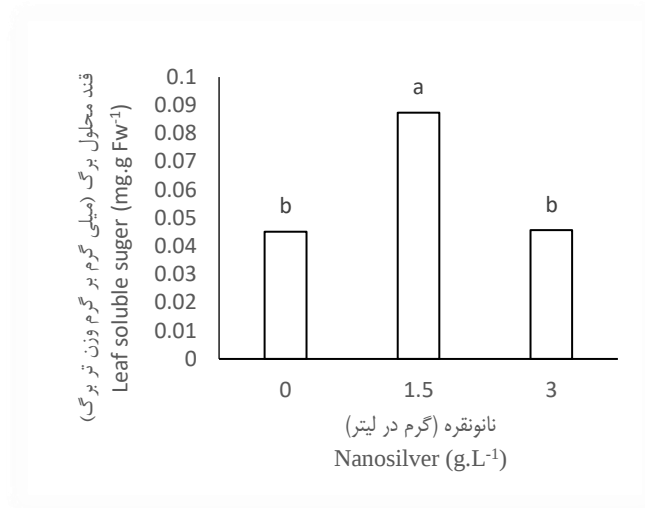


شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثر برهم کنش هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید بر فلاونوئید برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار می باشد.

Figure 9 - Comparison of the average effect of sodium hydrosulfide and sodium nitroprusside on Soybean leaf flavonoid. The presence of a common letter indicates no significant difference.

قند محلول برگ

از بین منابع تغییر تنها اثر نانو ذرات نقره در سطح احتمال یک درصد بر صفت قند محلول برگ معنی دار شد (جدول ۴). بیشترین میزان قند محلول برگ در گیاهان محلول پاشی شده با ۱/۵ گرم در لیتر نانو ذرات نقره (۰/۰۸۷ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ) ثبت شد و تفاوت معنی داری بین تیمار شاهد و ۳ میلی گرم در لیتر نانو ذرات نقره دیده نشد (شکل ۱۲). نانو ذرات نقره در غلظت های پایین ممکن است به عنوان یک عامل محرک ملایم عمل کنند و باعث فعال سازی مسیرهای دفاعی و متابولیسم ثانویه از جمله افزایش ستر قندهای محلول شوند. قندهای محلول در این شرایط نقش کلیدی در تنظیم اسمزی، حفاظت از پروتئین ها، تثبیت ساختار غشاهای و خنثی سازی رادیکال های آزاد دارند (Rico et al., 2011). در مقابل، در غلظت های بالاتر نانو ذرات نقره، سطح تنش اکسیداتیو به حدی افزایش می یابد که گیاه قادر به جبران آسیب ها نبوده و مکانیسم های فتوسنتزی و مسیرهای متابولیکی مربوط به ستر قند دچار اختلال می گردند. همچنین احتمال آسیب به کلروپلاست ها، آنزیم های کلیدی و مسیرهای مرتبط با فتوسنتز نیز مطرح می باشد که در نهایت منجر به کاهش تولید قند و یا مصرف آن برای حفظ انرژی و ترمیم آسیب های سلولی می شود (Yan & Chen, 2019).



شکل ۱۲- مقایسه میانگین اثر سطوح نانو ذرات نقره بر فلاونوئید برگ سویا. وجود حرف مشترک نشانه عدم اختلاف معنی دار می باشد.

Figure 10 - Comparison of the average effect of Silver nanoparticles levels on Soybean leaf flavonoid. The presence of a common letter indicates no significant difference.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از بررسی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سویا تحت تیمار نانو ذرات نقره به عنوان عامل تنش زا و دو ترکیب هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید به عنوان مواد بهبود دهنده نشان داد که نانونقره به تنهایی موجب کاهش معنی دار در میزان کلروفیل a و b، پایداری غشاء پلاسمایی، محتوای نسبی آب برگ و ماده خشک اندام هوایی شد، که این امر می تواند ناشی از افزایش تنش اکسیداتیو و آسیب به ساختارهای سلولی باشد. در مقابل، کاربرد هیدروسولفید سدیم و سدیم نیتروپروساید (به ویژه در تیمارهای ترکیبی) سبب بهبود معنی دار در این صفات شد، به طوری که افزایش سطح کلروفیل ها، RWC و پایداری غشاء در مقایسه با تیمار نانونقره به تنهایی مشاهده گردید. همچنین عملکرد نهایی گیاه در حضور این مواد افزایش یافت و به سطح تیمار شاهد نزدیک شد یا حتی در برخی موارد از آن فراتر رفت. از نظر ترکیبات بیوشیمیایی، کاربرد نانونقره موجب افزایش معنی دار در فلاونوئید، آنتوسیانین و قند محلول برگ شد که بیانگر فعال سازی مسیرهای دفاعی و تنظیم کننده تنش در گیاه است. اما تیمارهای ترکیبی با مواد بهبود دهنده موجب تعادل در تولید این متابولیت شدند که نشان دهنده کاهش تنش اکسیداتیو و برگشت نسبی به شرایط فیزیولوژیکی پایدار است.

References

- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L. and Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7, 17–28. DOI: 10.1016/j.jare.2015.02.007.
- Ali, B., Mwamba, T.M., Gill, R.A., Yang, C., Ali, S., Daud, M.K., Wu, Y. and Zhou, W. 2014. Improvement of element uptake and antioxidative defense in *Brassica napus* under lead stress by application of hydrogen sulfide. *Plant Growth Regul*, 74, 261-273. <https://doi.org/10.22034/jchr.2020.1863574.1020>.

- Almutairi, Z., and Alharbi, A. 2015. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *Journal of Advances in Agriculture*, 4(1), 280–285. <http://dx.doi.org/10.24297/jaa.v4i1.4295>.
- Asadi Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H. and Hashempour, A. 2014. The effect of sodium nitroprusside (SNP) on some biochemical properties of barley seedlings in salinity. *Journal Plant Prod Research*, 21(3), 19-32. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.23222050.1393.21.3.9.3>.
- Baker, S., Rakshith, D., Kavitha, K.S., Santosh, P., Kavitha, H.U., Rao, Y. and Satish, S. 2013. Plants: emerging as nano factories towards Facimile route in synthesis of nanoparticles. *Bioimpacts*, 3: 111–117. <https://doi.org/10.5681/bi.2013.012>.
- Chamizo-Ampudia, Alejandro, Leticia P., Llamas, Francisco F., Moreno, José F., García-Mina, Javier M., Ramos, Juan A. G., Gutiérrez, Teresa R. and Enrique J. 2017. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science*, 22(2), 117-128.
- Chen, J., Wang, W., Wu, F., You, C., Liu, T., Dong, X., He, J. and Zheng, H. 2013. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil* 362, 301-318. DOI: 10.1007/s11104-012-1275-7.
- Dai, J., Wen, D., Li, H., Yang, J., Rao, X., Yang, Y., Yang, J., Yang, C. and Yu, J. 2024. Effect of hydrogen sulfide (H₂S) on the growth and development of tobacco seedlings in absence of stress. *BMC Plant Biology*. 24, 162.
- Del Río, L.A. 2015. ROS and RNS in plant physiology: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827–2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., and Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394,(6693), 585–588. <https://doi.org/10.1038/29087>.
- Ding, H., Ma, D., Huang, X., Hou, J., Wang, C., Xie, Y., Wang, Y., Qin, H. and Guo, T. 2019. Exogenous hydrogen sulfide alleviates salt stress by improving antioxidant defenses and the salt overly sensitive pathway in wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(7), 1–11.
- FAO. 2023. FAOSTAT Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Gautam, H., Fatma, M., Sehar, Z., Mir, I. R. and Khan, N. A. 2022. Hydrogen sulfide, ethylene, and nitric oxide regulate redox homeostasis and protect photosynthetic metabolism under high temperature stress in rice plants. *Antioxidants*, 11(8), 1478.
- Gorgini Shabankareh, H. and Khorasani Nejhad, S. 2018. Effects of sodium nitroprusside on physiological, biochemical and essence characteristics of savory (*Satureja khuzestanica*) under deficit water regimes. *Journal of Plant Production Research*. 24(3): 55-70. <https://doi.org/10.22069/jopp.2017.11747.2079>.
- Havaux, M. 2014. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 597–606. <https://doi.org/10.1111/tpj.12386>.
- Hellubust, J. A., and Caraigie, J. S. 1978. *Handbook of physiological methods: Physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press.

- Hiscox, J. D., and Israelstam, G. F. 1978. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1332–1334. <https://doi.org/10.1139/b79-163>.
- Jiang, H. S., Qiu, X. N., Li, G. B., Li, W. and Yin, L. Y. 2014. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1398–1405. <https://doi.org/10.1002/etc.2561>.
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R. and Pei, Y. 2011. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(3), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.061>.
- Koralewska, A., Stuiver, C. E., Posthumus, F. S., Kopriva, S., Hawkesford, M. J. and De Kok, L. J. 2008. Regulation of sulfate uptake, expression of the sulfate transporters SULTR 1;1 and SULTR 1;2 and APS reductase in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) as affected by atmospheric H₂S nutrition and sulfate deprivation. *Functional Plant Biology*, 35, 318–327. <https://doi.org/10.1071/FP08004>.
- Kramer, P. J. 1983. *Water relations of plants*. Academic Press.
- Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103, 1–7. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030101.x>
- Kumari, A., Sheokand, S. and Kumari, S. 2010. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in chickpea. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(4), 271–284. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000400004>.
- Kumari, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>.
- Kushwaha, B. K., Srivastava, S. and Singh, N. 2020. Glutathione and hydrogen sulfide are required for sulfur-mediated mitigation of Cr(VI) toxicity in tomato, pea and brinjal seedlings. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 301–319. <https://doi.org/10.1111/ppl.13013>.
- Li, L., Wang, Y. and Shen, W. 2012. Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals*, 25(3), 617–631. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9542-2>.
- Li, Q. Y., Niu, H. B., Yin, J., Wang, M. B., Shao, H. B., Deng, D. Z., Chen, X. X., Ren, J. P. and Li, Y. C. 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(2), 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.03.010>.
- Li, Z. G., Gong, M. and Liu, P. 2012. Hydrogen sulfide is a signal molecule in plant responses to heat stress. *Plant, Cell & Environment*, 35(4), 714–721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02447.x>.

- Liu, H., Liu, Y., Hou, S. and Wang, J. 2021. Hydrogen sulfide (H₂S) signaling in plant development and stress responses. *aBIOTECH*, 2(2), 141–151. <https://doi.org/10.1007/s42994-021-00044-4>.
- Miao, A.J., Schwehr, K.A., Xu, C., Zhang, S.J., Luo, Z., Quigg, A. and Santschi, P.H. 2009. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental Pollution*, 157(11), 3034–3041. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047>.
- Mita, S., Murano, N. and Nakamura, K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that is inducible by sugars. *The Plant Journal*, 11(4), 841–851. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11040841.x>.
- Moazam Babasheikhali, M., Jabbarzadeh, Z., Amiri, J., Barin, B. and Razavi, M. 2021. Foliar application of sodium nitroprusside and salicylic acid alleviates the adverse effects of alkaline soil on roses. *European Journal of Horticultural Science*, 86, 78–87.
- Mostofa, M. G., Rahman, A., Ansary, M. M. U., Watanabe, A., Fujita, M. and Tran, L. S. P. 2015. Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Scientific Reports*, 5, Article 14078. <https://doi.org/10.1038/srep14078>.
- Mukhopadhyay, S. S. 2014. Nanotechnology in agriculture: Prospects and constraints. *Nanotechnology, Science and Applications*, 7, 63–71. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39409>.
- Nair, P. G. and Chang, I. 2014. Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(15), 8858–8869. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2823-y>.
- Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J. 2008. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 179(4), 873–887. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02562.x>.
- Ocvirk, D., Špoljarević, M., Kristić, M., Hancock, J. T., Teklić, T. and Lisjak, M. 2021. The effects of seed priming with sodium hydrosulphide on drought tolerance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in germination and early growth. *Annals of Applied Biology*, 178(3), 400–413. <https://doi.org/10.1111/aab.12689>.
- Omidi, F. and Sepehri, A. 2015. Effects of sodium nitroprusside application on leaf area, growth, and water use efficiency of red bean cultivars under drought stress. *Journal of Agricultural Crop Improvement*, 16(4), 871–885. <https://doi.org/10.22069/JACI.2015.2920>.
- Rafaati Alashti, M., Baradaran Firoozabadi, M., Dehestani, A., Gholami, A. and Parsaeian, M. 2021. Morphological and physiological responses of green bean to foliar application of citric acid and hydrogen sulfide under silver nanoparticle stress. *Journal of Plant Processes and Functions*, 10(12), 283–300. (In Persian).
- Rai, R., Tripathi, S., Rai, S.K. and Srivastava, R. 2020. Biochemical changes in sunflower plant exposed to silver nanoparticles / silver ions. *Journal of Food Science & Technology*, 4(2), 629–644.

- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.-N. and Biswas, P. 2015. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics*, 7(12), 1584–1594. <https://doi.org/10.1039/c5mt00139c>.
- Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3485–3498. <https://doi.org/10.1021/jf104517j>.
- Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 186(1), 63–70. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2001.00415.x>.
- Simontacchi, M., Galatro, A., Ramos-Artuso, F. and Santa-María, G. E. 2015. Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 6, 977. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>.
- Song, V., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J. and Lee, E. J. 2013. Functional analysis of nanoparticle toxicity: A comparative study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.003>.
- Tabatabaei Pazouh, Z., Razavizadeh, R. and Rostami, F. 2013. The effect of silver nanoparticles on chlorophyll and carotenoid pigments in canola (*Brassica napus*) under in vitro culture conditions. *Proceedings of the 2nd National Conference on Nanotechnology: From Theory to Application*. (In Persian).
- Tripathi, D., Swati, S., Shweta, S., Prabhat, K., Vijay, P. and Samiksha, S. 2017. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNPs)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.002>.
- USDA. 2024. World Agricultural Production. United States Department of Agriculture.
- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M. and Bracale, M. 2014. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171(12), 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.012>.
- Venkatesan, J., Kim, S. K. and Shim, M. S. 2016. Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using marine algae *Ecklonia cava*. *Nanomaterials*, 6(11), 235. <https://doi.org/10.3390/nano6110235>.
- Yan, A. and Chen, Z. 2019. Impairment of photosynthesis by engineered nanoparticles. *Plant Physiology*, 181(3), 1220–1233. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00163>.
- Yazdi, Z. and Mirzaei, N. 2021. Effect of foliar application of sodium nitroprusside on some morphological, physiological, and biochemical traits of marigold (*Calendula officinalis*) under different irrigation regimes. *Plant Production Technology*, 21(1), 1–17. (In Persian).
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B. P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. and Bernhardt, E. S. 2012. More than the ions: The effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2360–2367. <https://doi.org/10.1021/es103947t>.

- Yugal, K., Mohanta, S., Sujogya, K. P., Rasu, J., Nanaocha, S., Akshaya, K. B. and Tapan, K. M. 2017. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by leaf extract of *Erythrina suberosa* (Roxb.). *Frontiers in Molecular Biosciences*, 32(3), 136–141.
- Zangeneh, R., Jamei, R., Hoseini Sarghin, S. and Kargozar Khorrami, S. 2018. Effect of seed pre-treatment with sodium hydrosulfide on some physiological and anatomical traits of maize (*Zea mays*) under lead stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, 10(36), 19–34. (In Persian).
- Zhang, A., Zhang, Y., Gong, M. and Wang, Y. 2009. Role of nitric oxide in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(11), 1023–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2009.00865.x>.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, D. Y., Wang, S. H. and Luo, J. P. 2008. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518–1529.
- Zhang, X., Qi, S., Liu, S., Mu, H. and Jiang, Y. 2024. Exogenous sodium nitroprusside alleviates drought stress in *Lagenaria siceraria*. *Plants*, 13(14), 1972.
- Zhao, R., Yin, K. and Chen, S. 2021. Hydrogen sulphide signalling in plant response to abiotic stress. *Plant Biology*, 24(4), 523–531. <https://doi.org/10.1111/plb.13224>.

