

تأثیر نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم بر میزان انباشت عناصر روی و سریم، برخی پارامترهای رشد و بیوشیمیایی در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)



هاجر صالحی^۱، عبدالکریم چهرگانی راد^{۱*}، احمد مجد^۲ و منصور غلامی^۴

^۱ ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی

^۳ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی

^۴ ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۲

چکیده

آلودگی خاک‌ها با نانوذرات اکسید فلزی توسط فعالیت‌های مختلف بشر یک مسئله مهم محیط زیست در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم (در چهار غلظت ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر برخی پارامترهای رشد و بیوشیمیایی گیاه لوبیا در شرایط گلخانه‌ای و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید روی تقریباً در همه غلظت‌ها ارتفاع بخش هوایی را افزایش دادند، در حالی که نانوذرات دی اکسید سریم در بالاترین غلظت باعث کاهش ارتفاع بخش هوایی گیاه شدند. هر دو نانوذره باعث کاهش محتوای کلروفیل کل و آنتوسیانین در مقایسه با گروه شاهد شدند. تفاوت معنی‌داری در مقدار پروتئین کل در تیمارهای نانوذرات دی اکسید سریم و نانوذرات اکسید روی در مقایسه با کنترل مشاهده نشد. با این وجود، به نظر می‌رسد که یک نوار پروتئینی با وزن مولکولی ۲۸ کیلوالتون در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی در مقایسه با کنترل پدید آمده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز در تیمارهای نانوذرات دی اکسید سریم بیشتر از فعالیت آنها در تیمارهای اکسید روی بود. به طور کلی، نتایج نشان داد که پاسخ‌های گیاه به نانوذرات دی اکسید سریم با توجه به غلظت، دامنه تغییرات بیشتری دارد.

واژه های کلیدی: نانوذرات اکسید فلزی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین، فعالیت آنزیمی، *Phaseolus vulgaris*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۲۷۱۵۴۱، پست الکترونیکی: chehregani@basu.ac.ir

مقدمه

تنوع ساختار کریستالی و ماهیت پیوند فلز-اکسیژن (پیوندهای مختلف یونی تا کووالانت یا فلزی) به خوبی شناخته شده‌اند. نانوذرات اکسید فلزی همچنین ویژگی‌های الکترونیکی و مغناطیسی منحصر به فردی دارند و به طور گسترده در زمینه‌های مختلف مانند محصولات تجاری، کاربردهای زیست محیطی، شیمی پایدار و کاتالیزها و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴ و ۲۹).

رشد سریع و افزایش فناوری نانو، تولید و استفاده از نانومواد ساخته دست بشر (مهندسی شده) را در سراسر جهان گسترش داده است. نانوذرات مهندسی شده به عنوان ذرات دارای ابعاد ویژه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شوند که دارای خواص منحصر به فردی هستند که این ویژگی‌ها در ذرات با همان ترکیب شیمیایی در مقیاس غیرنانو مشاهده نمی‌شود (۲۴). نانوذرات اکسید فلزی به علت

مطالعه، بازده تولید دانه‌های لوبیا قرمز در گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید سریم (۲۵۰-۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش یافت. با این وجود، همین پژوهشگران، کاهش متابولیت‌های فائولین و لکتین‌ها (به ترتیب به عنوان پروتئین‌های مرتبط با ذخایر غذایی و متابولیسم کربوهیدرات‌ها) را در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کردند (۶ و ۲۵). از طرف دیگر گزارشات مبنی بر اثر متفاوت نانوذرات دی‌اکسید سریم و همتای غیرنانو آن (CeO_2) در گیاه *Brassica rapa* وجود دارد. به طوری که غلظت‌های ۱۰۰-۰ میلی‌گرم بر لیتر دی‌اکسید سریم باعث افزایش ۲۸-۳۵ درصدی در زیست توده گیاه شدند، در حالی غلظت مشابه نانوذرات دی‌اکسید سریم تأثیری بر مقدار زیست توده نشان ندادند (۲۲).

روند افزایش تولید نانوذرات و افزایش احتمال ورود آنها به اکوسیستم نیاز به ارزیابی اثرات احتمالی آنها بر محیط زیست، موجودات زنده و در نتیجه سلامتی انسان دارد. همچنین اینکه اثرات ناشی از نانوذرات آیا به علت خود ماهیت نانوذرات است و یا یون‌های آزاد شده، به طور کامل ناشناخته باقی مانده است (۵). در چند سال گذشته، گزارشات مبنی بر اثرات نامطلوب نانوذرات مهندسی شده در گیاهان منتشر شده است (۳۱ و ۳۷). گزارشات حاکی از انباشته شدن مقادیر بالایی از فلزات در بخش‌های مختلف گیاهان قرار گرفته در معرض نانوذرات است که نه تنها بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی-شیمیایی گیاه تأثیر می‌گذارند بلکه همچنین می‌توانند مسیر احتمالی تغییر و آلودگی زنجیره غذایی باشند (۱۱).

گونه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) از مهمترین لگوم‌ها برای مصرف مستقیم انسان در سراسر جهان است و غنی از منابع ارزشمند پروتئینی و ریزمغذی‌های مورد نیاز است. همچنین گیاهان این تیره در بهبود پایداری محیط به علت نقش عمده آنها در تثبیت نیتروژن با همکاری باکتری‌های

نانوذرات اکسید روی بعد از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و دی‌اکسید سلیسیوم از پرکاربردترین نانوذرات اکسید فلزی با قابلیت‌های فوتوکاتالیزی در صنایع مختلف به شمار می‌روند. تولید سالانه نانوذرات دی‌اکسید روی بین ۳۰۰۰-۲۵۵۰ تن برآورد شده است (۱۱). گزارشات نشان داده‌اند که نانوذرات اکسید روی هماهنگ با افزایش غلظت، به شدت بر رشد گیاهان مانند ذرت، خیار، کدو، سویا و گندم تأثیر می‌گذارند (۵ و ۳۷). به عنوان مثال نانوذرات اکسید روی رشد گیاه گندم را با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن کاهش دادند (۲۱). همچنین گزارشات مبنی بر اختلال ناشی از نانوذرات در وضعیت هموستازی مواد آلی و معدنی و در دسترس بودن آب وجود دارد (۲۱). پژوهشگران اخیراً نشان دادند که نانوذرات اکسید روی در مقایسه با اکسید روی اثرات مخرب بیشتری بر روی گیاه نخود فرنگی به علت تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن اعمال می‌کنند (۱۳).

نانوذرات دی‌اکسید سریم عمدتاً به عنوان کاتالیست در کاربردهای متداولی مانند سوخت دیزل و در خروجی آگروز خودرو یافت می‌شود. تولید سالانه جهانی نانوذرات دی‌اکسید سریم تا سال ۲۰۲۰ حدوداً ۱۲۵۵ تن در سال برای استفاده در سوخت‌های دیزلی برآورد شده است (۳۲)، که پیشنهادکننده‌ی این است که مقدار قابل توجهی از این نانوذرات با پتانسیل اثر بر گیاهان وارد محیط می‌شوند. گزارشات ارائه شده توسط محققین نشان‌دهنده‌ی اثرات مثبت، منفی و خنثی نانوذرات دی‌اکسید سریم است که تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی مانند نوع گونه گیاهی، اندازه و شکل نانوذرات، غلظت مورد استفاده، روش و مدت زمان اعمال نانوذرات است. جالب توجه است که تعداد محدودی از گزارشات نشان داده‌اند که قرار گرفتن در معرض غلظت‌های پایین نانوذرات دی‌اکسید سریم باعث افزایش زیست توده (Biomass) گیاه می‌شوند، این حاکی از آن است که این نانوذره در غلظت‌های ویژه می‌تواند به عنوان کود نانو مورد استفاده قرار بگیرد. در یک

نحوه تیمار و رشد گیاه مورد مطالعه: به منظور ارزیابی تاثیرات نانوذرات اکسیدروی و دی اکسید سریم بر روی گیاه مدل لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) نانوذرات در قالب سوسپانسیون به محیط خاک مورد استفاده برای رشد گیاهان استفاده شدند. بذرهاى استریل شده گیاه لوبیا (واريته لوبیا چیتی، با نام تجاری F-16) از شرکت بهینه-سازان سبز مهرگان (biotek seed، تهران، ایران) تهیه شد. بذرها از نظر ظاهری و آسیب دیدگی بررسی شدند و بذرهاى یکنواخت انتخاب شد. به منظور استریل کردن، بذرها با الکل ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه شسته شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیق در هیپوکلریت سدیم ۵٪ + ۲ قطره تویین ۲۰ غوطه‌ور شدند و در نهایت ۳ بار با آب دوبار تقطیر شسته شدند و سپس به مدت ۶ ساعت در آب دوبار تقطیر نگه‌داری شدند (۲۲).

بذرهاى استریل شده به منظور جوانه‌زنی و رشد به داخل گلدان (در ابعاد ۱۵×۲۰ سانتی‌متر) هر کدام محتوی ۱/۵ کیلوگرم خاک باغبانی (۲۰٪ رس، ۱۰/۶٪ سیلیت و ۶۹/۴٪ شن + کود حیوانی) انتقال داده شدند. گلدان‌ها در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا در شرایط ۱۴ ساعت دوره روشنایی، متوسط دمای شب/روز (۲۲±۳۰/۱۶±۲ سانتی‌گراد) و ۷۰٪ رطوبت نگه‌داری شدند. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یکبار انجام شد.

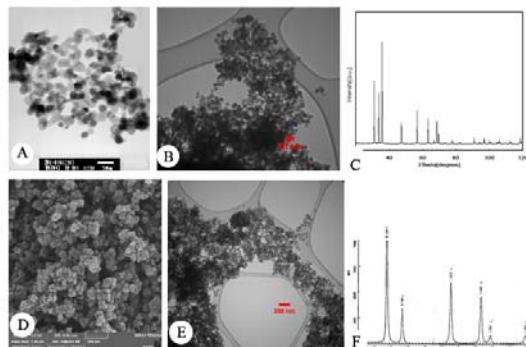
انتخاب غلظت‌های نانوذرات براساس مطالعات مرجع-شناختی ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد. مقادیر انتخاب شده از نانوذرات پودری به آب مقطر اضافه شده و سپس به غلظت‌های مورد نظر رسانده شدند. pH محلول سوسپانسیون‌ها در ۷-۶/۵ تنظیم شد. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از اولتراسونیک (Bandelin Sonorex، برلین، آلمان) هموژن شدند. سپس گلدان‌ها به منظور انجام تیمارهای مورد نظر به چندین گروه تقسیم شدند. هر تیمار در ۱۰ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

ریزویوم حائز اهمیت هستند. بنابراین این گونه جزو یکی از گیاهان مهم برای بررسی فاکتورهایی از قبیل بازده، کیفیت محصول و همچنین مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی در برابر چالش‌های جدید است (۷).

از منظر اکولوژیکی، درک چگونگی تعامل نانوذرات با محیط بویژه گیاهان به عنوان جزء اصلی اکوسیستم بسیار حائز اهمیت است. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم بر میزان انباشته شدن عنصر روی و سریم، پارامترهای رشد، و همچنین تغییرات در محتوای رنگیزه‌ها، پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه لوبیا رشد یافته در محیط خاک آمیخته شده با نانوذرات است.

مواد و روشها

مشخصات نانو ذرات: نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم از شرکت نانوسانی (مشهد، ایران) تهیه شدند. کریستال‌های نانوذرات اکسید روی، کروی شکل، شیری رنگ، دارای اندازه ۳۰-۱۰ نانومتر با خلوص ۹۹٪ و سطح مقطع ۶۰-۲۰ مترمکعب هستند. به طور مشابه، نانوذرات دی اکسید سریم کروی شکل، رنگ زرد روشن با اندازه اولیه ۳۰-۱۰ نانومتر، سطح مقطع ۵۰-۳۰ مترمکعب و با خلوص ۹۹/۹۷٪ هستند. ویژگی‌های نانوذرات شامل تصاویر TEM، XRD و SEM در شکل ۱ ارائه شده‌اند.



شکل ۱- مشخصات نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم؛ A، B و C به ترتیب تصاویر مربوط به SEM، XRD و TEM نانوذرات اکسید روی و D، E و F مربوط به نانوذرات دی اکسید سریم هستند.

میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن و ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروفلوریک اسید ۴۸٪ با استفاده از میکروبیو (ETHOS One; Milestone Inc., Sorisole, Bergamo, Italy) هضم شد. بعد از سرد شدن عصاره، نمونه‌ها با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسیدند و با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون رقیق شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. با استفاده از ICP-MS (Agilent 7900, USA) مقدار عنصر سریم قرائت شد (۱۵).

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد و نشت الکترولیت: در گیاهان تیمار شده، ۱۵ روز بعد از اتمام تیمار، شاخص‌هایی مانند ارتفاع گیاه، طول ریشه، سطح برگ، محتوای نسبی آب، نشت الکترولیت اندازه‌گیری شدند. محتوای نسبی آب از معادله $100 \times [(FW-DW)/(TW-DW)]$ محاسبه گردید که در این معادله FW = وزن تر، DW = وزن خشک و TW = وزن نمونه بعد از تورژسانس است (۳). اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از روش Pandey و Singh (۲۴) انجام شد. به منظور اطلاعات بیشتر در مورد پایداری غشا، نشت الکترولیت با استفاده از برگ‌های جوان انجام شد. بدین منظور برگ‌های سالم کاملاً با آب مقطر شسته شدند و سپس داخل ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. هدایت الکتریکی محلول (L_1) توسط هدایت سنج اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و دوباره هدایت الکتریکی (L_2) آن اندازه‌گیری شد. نشت الکترولیت با استفاده از معادله $100 \times (L_1/L_2)$ محاسبه شد (۳۰).

سنجش رنگیزه‌های کلروفیل و آنتوسیانین: استخراج کلروفیل از برگ‌های گیاهان با استون ۸۰ درصد انجام شد. بدین منظور ۲ گرم از بافت گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی ساییده شد و اینکار تا زمانی که همه کلروفیل استخراج شود و ته مانده بی‌رنگ شود ادامه یافت،

گیاهان در مرحله فنولوژیکی ۳-۵ برگ حقیقی برای تیماردهی انتخاب شدند. حجم کل ۲۰۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم به مدت ۲ هفته هر دو روز یکبار و بعد از هر آبیاری به خاک حاوی گیاهان اضافه شد. همچنین برای گروه شاهد از آب مقطر استفاده شد.

جمع‌آوری نمونه‌های برگ برای این بخش دو هفته بعد از اتمام اعمال تیمار آغاز شد و برگ‌های بالایی گیاه (برگ-های شماره دو از بالا) برای انجام آنالیزهای فیزیولوژیکی-بیوشیمیایی برداشت شدند، سپس در ازت مایع منجمد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تعیین محتوای عناصر

محتوای عنصر روی (Zn): به منظور تعیین محتوای عنصر روی برگ‌های گیاهان چندین بار با آب مقطر جهت حذف ذرات ناخواسته شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. به منظور هضم نمونه‌ها ۱ گرم از پودر خشک شده با اسید نیتریک ۸۵٪ و پراکسید هیدروژن (۵:۱) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا هضم کامل پودر گیاهی حرارت داده شدند. بعد از سرد شدن، محلول هضم شده را با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف کرده و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رقیق شد. محتوای عناصر توسط دستگاه جذب اتمی (Varian Inc, Applied Science Company, USA) با استفاده از لامپ‌های ویژه هر عنصر قرائت گردید (۵).

محتوای عنصر سریم (Ce)

به منظور حذف نانوذرات سریم اضافی در سطح برگ‌های گیاه، نمونه‌ها در کلرید کلسیم ۰/۰۱ مولار به مدت ۲۰ دقیقه غوطه ور شدند، چندین بار با آب مقطر آبکشی شدند و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌های مورد نظر در یک مخزن تفلون با ۶ میلی‌لیتر اسیدنیتریک ۶۵٪، ۲

فاصله هر ۱۵ ثانیه در طول موج ۲۴۰ ثبت گردید. فعالیت آنزیم براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۱).

به منظور سنجش فعالیت پراکسیداز، ۳ میلی‌لیتر پیروگال در بافر فسفات، ۰/۱ میلی‌لیتر بافر استخراج و ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن به ۱ میلی‌لیتر عصاره اضافه شدند و تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر در ۳ دقیقه به فواصل ۲۰ ثانیه ثبت گردید. فعالیت آنزیم براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (۱۸).

مطالعه الگوی پروتئینی: پروتئین کل در عصاره آنزیمی براساس روش برادفورد تعیین گردید (۷). به منظور بررسی الگوی پروتئینی برگ‌های گیاهان در معرض نانوذرات از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. بدین منظور عصاره پروتئینی برگ‌ها با استفاده از بافر فسفات سدیم (pH=7) در دمای ۴ درجه سانتیگراد استخراج گردید. ژل پایه الکتروفورز ۱۲ درصد پلی‌آکریل آمید-SDS تهیه شد. عصاره پروتئینی در بافر نمونه (بافر ۰/۱۲۵ مولار تریس-اسیدکلردریک، SDS ۴ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد، بتامرکاپتواتانول ۱۰ درصد و رنگ برموفنل ۰/۱ درصد) تهیه شد. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از رنگ آبی کوماسی انجام گرفت. استانداردهای مارکر پروتئینی (سینا ژن، ایران) نیز همزمان با نمونه‌ها استفاده شد (۹).

آنالیزهای آماری: هر غلظت استفاده شده نانوذرات و شاهد در ۱۰ تکرار در طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین ۳ تکرار (میانگین \pm انحراف معیار) گزارش شدند. تجزیه واریانس آنوای یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS (PASW, 22.0) برای همه پارمترهای اندازه‌گیری شده اجرا شد.

نتایج

جذب، انباشته شدن و انتقال عناصر روی و سریم: نتایج حاصل از میزان جذب عناصر روی و سریم در برگ‌های

سپس عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ (SIGMA، آلمان) گردید. میزان جذب عصاره در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۴ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر UV (Biowave، انگلیس) اندازه‌گیری شد. محتوای کلروفیل‌های a، b و کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) از معادلات زیر محاسبه شد (۴).

$$\text{Chl a} = 12.25 \times A_{664} - 2.55 \times A_{645}$$

$$\text{Chl b} = 20.31 \times A_{645} - 6.91 \times A_{664}$$

$$\text{Chl total} = 17.76 \times A_{645} + 7.37 \times A_{664}$$

به منظور اندازه‌گیری مقدار کل آنتوسیانین‌ها از روش وانگر استفاده شد (۳۰). مطابق با این روش، ۱ گرم بافت گیاهی را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص + هیدروکلریک اسید به نسبت حجمی ۹۹ به ۱) به طور کامل ساییده شد و عصاره حاصل در لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و جذب محلول رویی در طول ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت، ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ سانتیمتر بر میلی‌گرم در نظر گرفته شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A = \epsilon bc$ محاسبه گردید. در این فرمول $A =$ جذب، $b =$ عرض کووت (۱ سانتی‌متر) و $c =$ غلظت آنتوسیانین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ می‌باشد.

سنجش آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز: به منظور سنجش آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، یک گرم از بافت برگ تازه در ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی-مولار و pH=۴/۷) در نیتروژن مایع ساییده شد. و عصاره به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای سنجش آنزیم‌ها استفاده شد.

برای سنجش آنزیم کاتالاز مخلوط واکنش شامل ۹۸۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان تغییرات آنزیم در یک دقیقه در

به سایر غلظت‌ها و گروه شاهد کاهش یافت. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۱ مشخص است که تغییرات سطح برگ گیاهان در هر دو تیمار نانوذرات (اکسید روی و دی اکسید سریم) معنی‌دار نیست. افزایش محتوای نسبی آب در برگ‌های گیاهان در معرض نانوذرات دی اکسید سریم در تمامی غلظت‌ها مشاهده شد. در حالی که تفاوت معنی‌داری در تیمارهای نانوذرات اکسید روی وجود نداشت. تفاوت در نشت الکترولیت برگ‌های در معرض نانوذرات اکسید روی معنی‌دار نبود. در حالی که روند تغییرات نشت الکترولیت در تیمارهای نانوذرات دی اکسید سریم از غلظت پیروی نمی‌کند. به طوری که میزان نشت الکترولیت در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش و در دیگر غلظت‌ها افزایش یافت.

محتوای رنگیزه‌های کلروفیل و آنتوسیانین: محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل در همه غلظت‌های هر دو تیمار نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم (به استثنای کلروفیل b که در تیمار نانوذرات دی اکسید سریم معنی‌دار نبود) نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. به طوریکه کاهش ۵۸ درصدی در محتوای کلروفیل کل در غلظت ۲۵۰ میلی-گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی در مقایسه با شاهد مشاهده شد. با این وجود، مقدار کلروفیل کل بین غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت‌ها معنی‌دار نبود، این درحالی است که نسبت به شاهد کاهش نشان دادند. همچنین بیشترین کاهش در مقدار کلروفیل کل در تیمارهای دی اکسید سریم در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۵۳٪ کاهش نسبت به گروه شاهد) مشاهده شد. همچنان که از نمودارهای شکل ۳ مشخص است، تغییرات در مقادیر کلروفیل وابسته به غلظت نیست و روند منظمی از تغییرات مشاهده نمی‌شود، بنابراین افزایش غلظت نانوذرات باعث افزایش و یا کاهش خطی کلروفیل نشد. همچنین تغییرات محتوای آنتوسیانین کل در غلظت‌های هر دو تیمار نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم در مقایسه با شاهد روند کاهشی داشت. به طوری که کاهش

گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات دی اکسید سریم (a) و اکسید روی (b) در شکل ۲ ارائه شده است. چنانچه از نمودارها مشخص است تفاوت میزان عنصر سریم در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نیست. در حالی که در غلظت‌های بالاتر یعنی در ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مقدار آن به طور معنی‌داری افزایش یافت، به طوریکه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، مقدار عنصر سریم نسبت به گروه شاهد افزایش ۳۱۹ درصدی داشت. البته مقدار عنصر سریم در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۲/۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) نسبت به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۲/۸۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) کاهش یافت. مقدار عنصر روی در گیاهان در معرض نانوذرات اکسید روی روند متفاوتی با انباشته شدن عنصر سریم داشت. به طوری که در شکل ۲ نشان داده شده است مقدار عنصر روی در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش ۲۱ و ۵/۳ درصدی نسبت به گروه شاهد نشان داد. در حالی که در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مقدار عنصر روی در بخش‌های هوایی گیاه کاهش یافت.

شاخص‌های رشد، محتوای نسبی آب و نشت الکترولیت:

نتایج مربوط به برخی پارامترهای رشد مانند ارتفاع بخش هوایی گیاه، طول ریشه و سطح برگ و همچنین محتوای نسبی آب و نشت الکترولیت در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشخص است، روند افزایشی در پارامترهای رشد از جمله طول ریشه، ارتفاع گیاه و سطح برگ در همه غلظت‌های نانوذرات اکسید روی مشاهده می‌شود. به طوری‌که به نظر می‌رسد غلظت‌های ۱۰۰۰-۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هر دو تیمار نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم، غلظت بهینه برای رشد گیاه هستند، زیرا در این غلظت‌ها، گیاهان بیشترین افزایش در ارتفاع گیاه و طول ریشه گیاه داشتند. اما در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید سریم ارتفاع بخش هوایی گیاه نسبت

پراکسیداز در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی مشاهده شد. در حالی که روند منظم‌تری در تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای دی اکسید سریم مشاهده شد. به طوریکه با افزایش غلظت نانوذرات، فعالیت پراکسیداز تا ۴۱ درصد در بالاترین غلظت یعنی ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رسید. به طور مشابه، در مورد فعالیت آنزیم کاتالاز، تغییرات این آنزیم در گیاهان در معرض نانوذرات دی اکسید سریم در مقایسه با نانوذرات اکسید روی مشهودتر بود. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود میزان فعالیت آنزیم در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ندارد، اما فعالیت آنزیم در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، در مقایسه با گروه شاهد ۲۹ درصد افزایش یافت. در حالی که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های گیاهان در معرض بالاترین غلظت نانوذرات دی اکسید سریم در مقایسه با گروه شاهد ۵۸ درصد افزایش یافت.

نتایج الگوی الکتروفورز پروتئین‌ها: از نظر الگوی پروتئینی و تعداد نوارهای پروتئینی تشکیل شده، تیمارهای دی اکسید سریم دارای الگوی مشابهی بودند به طوریکه که در شکل ۵ مشخص است تعداد نوارهای پروتئینی یکسان است. به طور مشابه، الگوی پروتئینی گیاهان در معرض نانوذرات اکسید روی مشابه با گروه شاهد است. با این تفاوت که در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یک نوار پروتئینی جدید با وزن مولکولی تقریباً ۲۸ کیلو دالتون (شکل ۵، مشخص شده با پیکان) ایجاد شده است که در گروه شاهد و سایر غلظت‌ها مشاهده نمی‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

بحث: در این پژوهش، اثرات نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم را در غلظت‌های مختلف به صورت اضافه کردن سوسپانسیون آنها در خاک بر رشد گیاه لوبیا و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی قرار گرفت.

۲۷ و ۳۹ درصدی به ترتیب در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم مشاهده شد.

اثرات نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم بر پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌ها: تغییرات در مقدار پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم در شکل ۴ نشان داده شده است. همچنین بررسی الگوی پروتئینی برگ‌های تیمار شده توسط الکتروفورز با استفاده از ژل آکریل آمید در شکل ۵ ارائه شده است. همان‌طور که در شکل مشخص شده است مقدار پروتئین کل در تیمارهای نانوذرات اکسید روی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نداشتند. با این وجود در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر یک افزایش جزئی ۸ درصدی در مقدار پروتئین کل نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، که این افزایش اندک در میزان پروتئین با مقایسه الگوی پروتئینی در شکل ۵ در مقایسه با غلظت‌ها و گروه شاهد قابل تشخیص است. در حالی که کاهش در محتوی پروتئین تیمارهای دی اکسید سریم تا ۲۵ درصد در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. البته تفاوت‌ها از نظر آماری در بین غلظت‌ها معنی‌دار نبود. با این وجود تغییر در غلظت پروتئین کل را همچنین می‌توان در الگوی الکتروفورزی مشاهده کرد (شکل ۵).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدان پراکسیداز و کاتالاز در شکل ۴ (b و c) ارائه شده است. تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدان در تیمارهای نانوذرات دی اکسید سریم در مقایسه با نانوذرات اکسید روی معنی‌دارتر بود. نانوذرات اکسید روی مستقل از غلظت باعث کاهش و افزایش جزئی در فعالیت آنزیم پراکسیداز شدند. به طوریکه که در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش ۱۵ درصدی فعالیت پراکسیداز نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. اما در ادامه افزایش ۱۲ درصدی فعالیت آنزیم

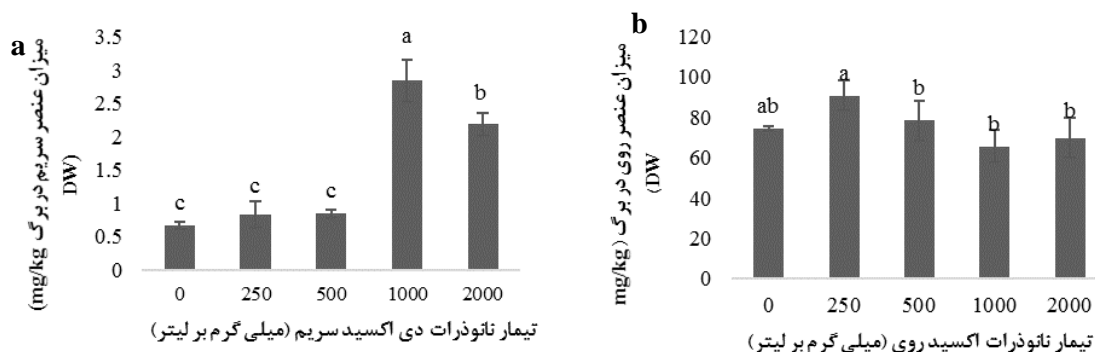
افزایش بیشتر غلظت در معرض، میزان انباشته شدن این عنصر در برگ‌ها کاهش پیدا کرد. این کاهش محتوای روی در بخش‌های هوایی گیاه در غلظت‌های بالا می‌تواند به دلیل اتصال نانوذرات اکسید روی به یکدیگر و افزایش اندازه ذرات و همچنین تمایل نانوذرات به اتصال با سایر ذرات موجود در خاک باشد که در نهایت باعث کاهش در دسترس بودن نانوذرات توسط گیاه باشد (۱۳).

علی‌رغم وجود برخی گزارشات در مورد سمیت نانوذرات در گیاهان، مطالعات بسیار اندکی در مورد اثرات بهبود دهنده احتمالی نانوذرات بر رشد و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان انجام شده است (۲۰).

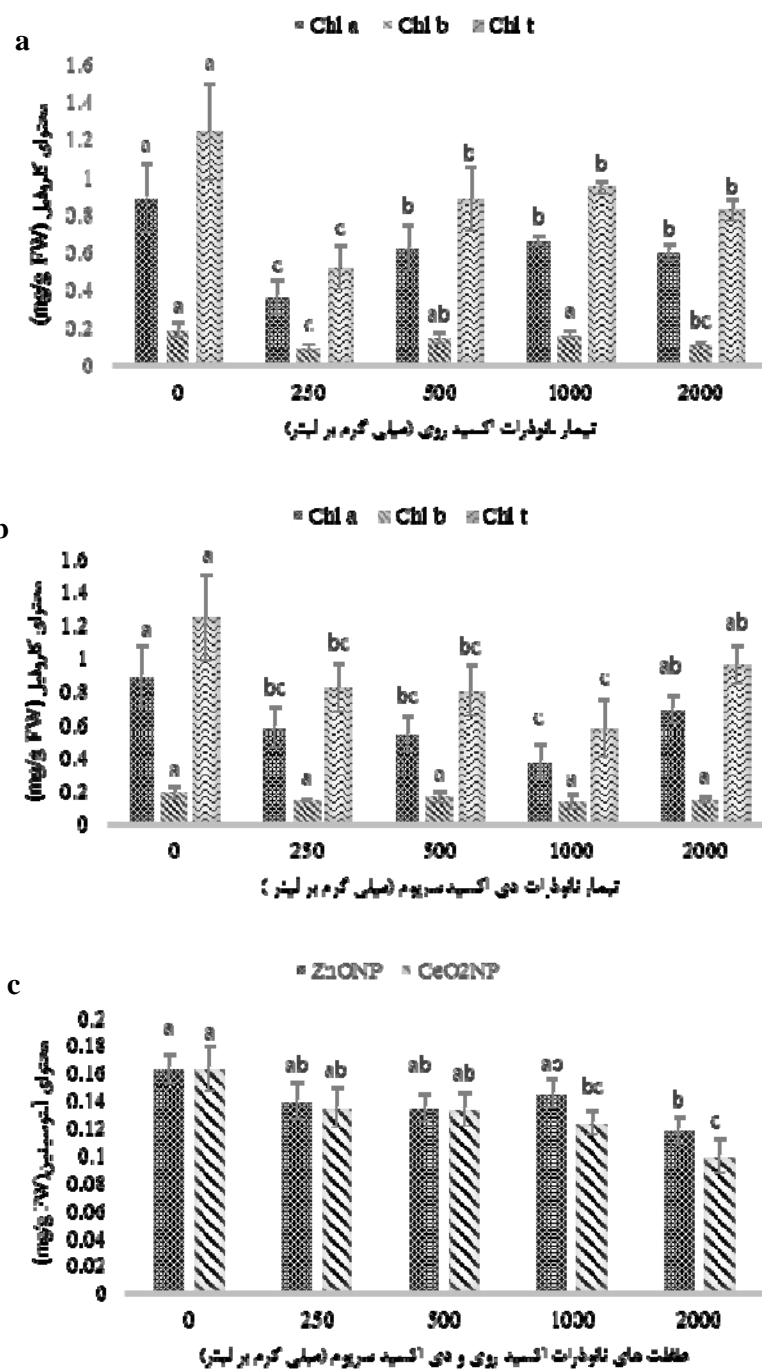
نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در غلظت Zn موجود در برگ‌ها در تیمارهای نانوذرات اکسید روی به جز غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد. به طوری که با

جدول ۱- اثرات نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم بر شاخص‌های رشد ارتفاع بخش هوایی، طول ریشه، سطح برگ، محتوای نسبی آب، نشت الکترولیت، داده‌ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار (SE) هستند. آنالیزها براساس آنوای یک طرفه همراه با آزمون دانکن انجام شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ($P \leq 0.05$).

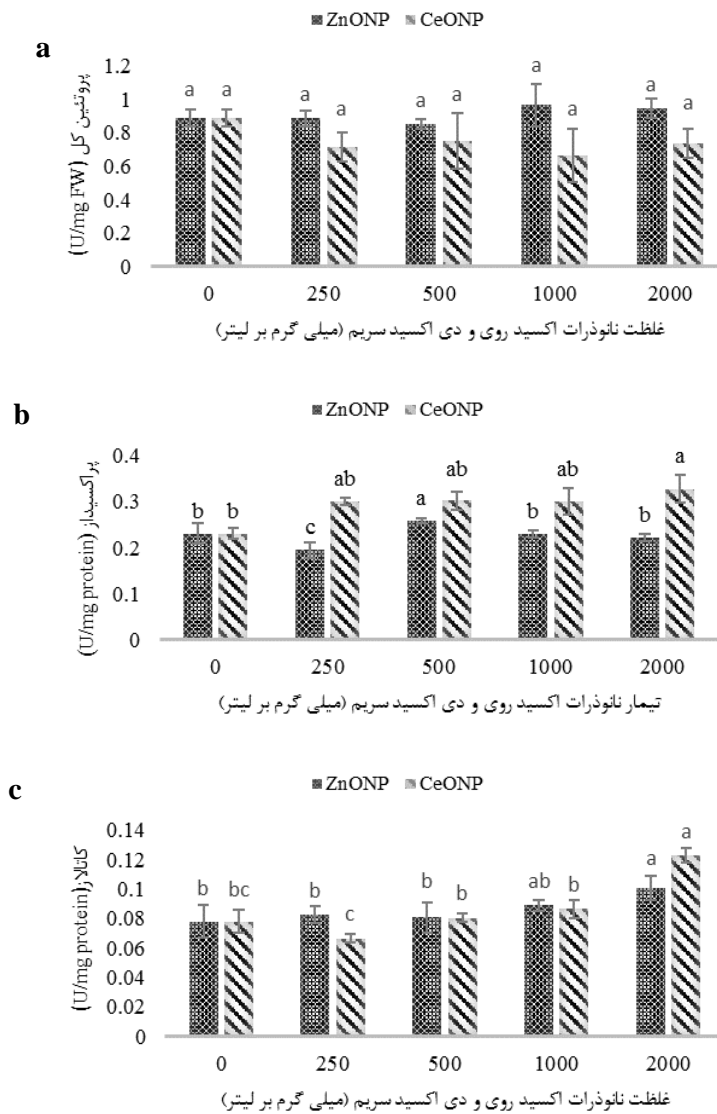
تیمار	پارامتر	ارتفاع بخش هوایی (سانتیمتر)	طول ریشه (سانتیمتر)	سطح برگ (cm ²)	محتوای نسبی آب (%)	نشت الکترولیت (%)
تیمار نانوذرات اکسید روی						
۰		۴۶٫۷±۳٫۷۹ b	۲۴٫۰±۱٫۰۰ b	۵۶٫۹±۸٫۳۵ b	۶۹٫۳±۰٫۶۹ b	۲۴٫۷±۳٫۲۴ a
۲۵۰		۴۹٫۷±۴٫۵۱ ab	۲۶٫۰±۲٫۰۰ b	۶۸٫۲±۷٫۶۵ a	۷۶٫۲±۷٫۶۸ b	۲۶٫۴±۳٫۶۷ a
۵۰۰		۵۱٫۳±۸٫۷۴ ab	۳۴٫۰±۴٫۰۰ a	۵۹٫۴±۴٫۹۸ ab	۷۱٫۹±۳٫۴۱ b	۲۸٫۸±۴٫۵۳ a
۱۰۰۰		۵۶٫۳±۱٫۵۳ a	۳۶٫۶±۳٫۰۰ a	۶۴٫۴±۷٫۱۲ ab	۷۰٫۶±۱٫۱۱ b	۳۰٫۴±۲٫۰۶ a
۲۰۰۰		۵۰٫۷±۱٫۵۳ ab	۲۵٫۰±۲٫۰۰ b	۵۲٫۹±۷٫۱۷ b	۷۱٫۱±۲٫۰۶ b	۲۹٫۰±۲٫۸۸ a
تیمار نانوذرات دی‌اکسید سریم						
۰		۴۶٫۷±۳٫۷۹ b	۲۴٫۰±۱٫۰۰ c	۵۶٫۹±۸٫۳۵ a	۶۹٫۳±۰٫۶۹ b	۲۴٫۷±۳٫۲۴ ab
۲۵۰		۴۷٫۰±۱٫۰۰ b	۲۹٫۰±۱٫۰۰ ab	۶۲٫۲±۱۰٫۰۶ a	۷۲٫۵±۳٫۸۹ ab	۱۷٫۰±۶٫۸۲ b
۵۰۰		۵۳٫۳±۴٫۵۱ ab	۲۹٫۳±۱٫۵۳ a	۵۳٫۹±۵٫۹۵ a	۷۵٫۰±۷٫۱۹ ab	۲۵٫۸±۴٫۹۳ a
۱۰۰۰		۵۶٫۰±۳٫۴۶ a	۲۹٫۰±۱٫۰۰ ab	۵۸٫۴±۷٫۰۷ a	۷۹٫۵±۵٫۰۱ a	۳۲٫۹±۳٫۲۰ a
۲۰۰۰		۳۹٫۷±۴٫۵۱ c	۲۷٫۰±۱٫۰۰ b	۵۲٫۷±۳٫۳۹ a	۷۴٫۳±۲٫۰۰ ab	۲۹٫۶±۰٫۳۰ a



شکل ۲- میزان جذب و انباشته شدن عناصر سریم (a) و روی (b) در برگ‌های گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم. آنالیز براساس آنوای یک طرفه همراه با آزمون دانکن انجام شده است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌ها است ($p \leq 0.05$).



شکل ۳- اثرات نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سربوم بر محتوای کلروفیل a, b و c (a, b) و همچنین محتوای آنتوسیانین کل (c) برگ. داده‌ها میانگین ۳ تکرار \pm انحراف معیار. آنالیزها براساس آنوای یک طرفه همراه با آزمون دانکن انجام شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است. ($P \leq 0.05$).



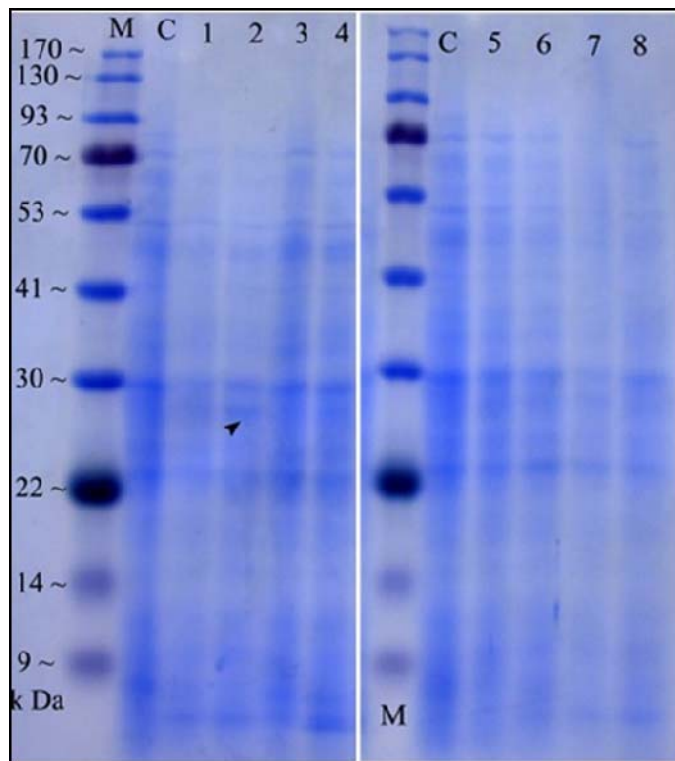
شکل ۴- میزان پروتئین کل (a)، آنزیم پراکسیداز (b) و کاتالاز (c) در برگ‌های گیاهان در معرض نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم. اعداد میانگین \pm تکرار \pm انحراف معیار. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ($P \leq 0.05$).

همچنین افزایش غلظت نانوذرات و چسبیدن آنها به سطح ریشه، ممکن است باعث مسدود شدن منافذ و کانال‌ها برای ورود نانوذرات و یونها شده باشد (۵). از طرف دیگر، میزان عنصر سریم در برگ‌های گیاهان در معرض غلظت‌های ۲۵۰-۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید سریم در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود. در حالی که مقدار آن در غلظت‌های بالا (۲۰۰۰-۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به طور معنی‌داری نسبت به شاهد و غلظت‌های پایین

وقتی نانوذرات با بسترهای محیطی بویژه، خاک میانکش می‌دهند، رفتار فیزیکوشیمیایی آنها تغییر می‌کند، که می‌تواند بر حلالیت نانوذرات و در نتیجه در دسترس بودن آنها برای گیاه تأثیر بگذارد (۳۶). گزارشاتی از کاهش عنصر روی قابل دسترسی برای گیاهان و نگهداری بیشتر این عنصر در محیط‌های خاک وجود دارد (۲۶)، که در نتیجه باعث کاهش مقدار جذب این عنصر توسط گیاهان می‌شود، مشابه آن چیزی که در این مطالعه مشاهده شد.

حلالیت بیشتر و پایتتر بودن درجه توده‌ای شدن نانوذرات دی اکسید سریم نسبت به اکسید روی باشد.

افزایش نشان داد. از طرف دیگر، میزان تغییرات محتوی عنصر سریم در غلظت‌های بالا در مقایسه با این تغییرات در عنصر روی قابل توجه بود، که این می‌تواند بدلیل



شکل ۵- الگوی SDS-PAGE عصاره پروتئینی برگ‌های گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی و دی اکسید سریم. C، گروه شاهد؛ ۱، ۲، ۳، ۴ به ترتیب غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی؛ ۵، ۶، ۷ و ۸ به ترتیب غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید سریم؛ M، مارکر پروتئینی

استراتژی گیاه برای استفاده حداکثری از منابع معدنی و آب موجود در خاک باشد. مکانیسم احتمالی برای افزایش طول ریشه می‌تواند افزایش تکثیر سلولی و یا طولی شدن سلول‌های ریشه باشد (۱۹).

محتوی کلروفیل یک شاخص معمول نشان‌دهنده‌ی کارآمدی فتوسنتزی گیاه است، که یکی از تعیین‌کننده‌های رشد گیاه محسوب می‌شود. عنصر روی یک ریزمغذی برای رشد گیاه و برای بیوسنتز کلروفیل مورد نیاز است، اما مقدار اضافی آن ممکن است با سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی تداخل ایجاد کند و در نتیجه بر روی فرایندهای فتوسنتزی اثر بگذارد (۲۰). چنانچه در بخش نتایج مشاهده شد هر دو

نتایج حاصل از مطالعه اثرات نانوذرات بر پارامترهای رشد مانند ارتفاع گیاه، طول ریشه و سطح برگ گیاه حاکی از آن است که هر دو نوع نانوذره مستقل از میزان انباشته شدن عناصر باعث افزایش و بهبود رشد طولی گیاه شده‌اند. با این تفاوت که نانوذرات دی اکسید سریم در بالاترین غلظت باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع بخش هوایی و بالعکس باعث افزایش طول ریشه گیاه شده است، که پیشنهاد می‌شود این نانوذرات در غلظت‌های بالا در خاک موجب کاهش در دسترس بودن و جذب آب، مواد معدنی و در نتیجه کاهش رشد گیاه می‌شوند. از طرفی دیگر افزایش اندک طول ریشه در گیاهان در معرض غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دی اکسید سریم می‌تواند نوعی

عناصر روی و سریم باعث تغییراتی در سطح پروتئین و افزایش فعالیت آنزیمی شد. محتوای پروتئین محلول یک شاخص مهم برای رشد گیاه است. مشخص شده است که عنصر روی بر میزان پروتئین در گیاهان تأثیر می‌گذارد، با این وجود در این مطالعه افزایش محتوای پروتئین گیاهان در معرض نانو ذرات معنی‌دار نبود. ایجاد نوار جدید در الگوی الکتروفورزی پروتئین در گیاهان احتمالاً ممکن است به علت تولید پروتئین‌های مرتبط با پاسخ‌های دفاعی، آنتی‌اکسیدانی و ذخیره‌ای باشد، که گیاه را از اثرات مضر تنش محافظت می‌کند. گزارشاتی از اثرات مثبت نانوذرات اکسید روی در کاهش سطح پراکسید هیدروژن در گوجه فرنگی وجود دارد که ممکن است به خاطر افزایش در جذب مغذی‌های کلیدی مانند نیتروژن باشد که نقش مهمی را در سنتز پروتئین، مسیرهای متابولسمی و هوموستاز یون‌ها دارد (۲). علاوه بر این، نانوذرات اکسید روی باعث القای ژن‌های *AtKC1* و *AtCHX17* در ریشه و بخش هوایی گیاه آرابیدوپسیس شد، که این ژن‌ها مسئول حفظ هوموستاز مواد معدنی و یون‌ها هستند (۲۷). این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان تنش‌غیرزیستی را با افزایش سنتز برخی پروتئین‌ها و تنظیم فرایندهای بیوشیمیایی کلیدی در متابولیسم خنثی می‌کنند.

از طرفی معنی‌دار نبودن سطح پروتئین برگ و همچنین مشابه بودن الگوی پروتئین گیاهان در معرض نانوذرات دی اکسید سریم نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اثرات سمی نانوذرات بر سلول در سطح پروتئین است. اثرات نانوذرات دی اکسید سریم بر رشد گیاه وابسته به شرایط در معرض و همچنین گونه گیاهی دارد. غلظت‌های پایین نانوذرات دی اکسید سریم (۱۰۰-۰ میلی‌گرم بر لیتر) در خاک اثرات نامطلوبی بر رشد گیاهان براسیکا (*Brassica rapa*) نداشته است (۲۲). با این حال، کاهش در رشد گیاهان تحت غلظت بالای نانوذرات دی اکسید سریم (۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) احتمالاً می‌تواند به دلیل تغییر در تقسیم و طویل شدن سلولی، فتوسنتز، تنفس، جذب یون و تغییر پروتئین

نوع نانوذره باعث کاهش در محتوای کلروفیل کل گیاهان شدند که این نتایج با مطالعات قبلی که اشاره به اثر منفی نانوذرات بر محتوای کلروفیل داشتند، همسو است (۳۰). کاهش در محتوای کلروفیل با افزایش میزان عناصر روی و سریم در برگ‌های گیاهان بیشتر مشهود بود. به طوریکه برگ‌های گیاهان در معرض غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دی اکسید سریم بیشترین کاهش در محتوای کلروفیل داشتند. افزایش در ارتفاع بخش هوایی گیاه و همچنین افزایش سطح برگ گیاهان در معرض نانوذرات می‌تواند به دلیل تلاش گیاه برای افزایش بهره‌وری هر چه بیشتر از نور برای انجام فتوسنتز مورد نیاز رشد باشد (۹، ۱۷). کاهش در رنگیزه‌های فتوسنتزی و همچنین آنتوسیانین می‌تواند به عنوان پاسخ ویژه به فلزات در نظر گرفته شود که منجر به مهار سنتز کلروفیل و سایر رنگیزه‌ها احتمالاً به دلیل کمبود در جذب آهن و منیزیم می‌شود. کاهش در محتوای کلروفیل با کاهش کمپلکس‌های هسته مرکزی، کمپلکس‌های جمع آوری نور در فتوسیستم I و II و همچنین کاهش در سنتز رویسکو مرتبط است (۳۳). احتمال دیگر برای کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، مهار آنزیم‌های مسئول بیوسنتز کلروفیل مانند δ -آمینولولونیک اسید دهیدراتاز (δ -aminolevulinic acid dehydratase) و پروتوکلروفیلید ردکاز (*protochlorophyllide reductase*)، افزایش تخریب تیلاکوئیدها و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی باشد (۲۹). به طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود نتایج الکتروولت گیاهان در معرض غلظت بالای نانوذرات دی اکسید سریم (۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش و در نتیجه پایداری غشا کاهش یافته است.

کاملاً شناخته شده است که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) داخل بافت گیاهی در پاسخ به تنش تولید می‌شوند (۵). شماری از مطالعات نشان داده‌اند که نانوذرات فلزی باعث القای تنش اکسیداتیو و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شوند (۱۲، ۳۵). در این مطالعه، اضافه کردن

علی‌رغم شباهت در برخی علائم ظاهری گیاه و پارامترهای رشد می‌تواند متفاوت باشد. همچنین به نظر می‌رسد که پاسخ‌های قابل مشاهده در رشد گیاه با نوع نانو ذرات و غلظت مورد استفاده متغیر است، به طوری‌که رشد گیاهان در معرض نانوذرات اکسید روی با افزایش غلظت افزایش یافت و اثرات بازدارنده مشاهده نگردید. در حالی که نانوذرات دی‌اکسید سریم در بالاترین غلظت، باعث مهار رشد بخش هوایی گردید. همچنین تغییر در شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر فعالیت آنزیم‌ها و میزان پروتئین بستگی به نوع نانوذرات داشت. علاوه بر این، بیان پروتئین ارتباط مستقیم با نوع نانوذره داشت، به طوری‌که نانوذرات اکسید روی باعث پدید آمدن یک نوار پروتئینی جدید شدند، در حالی که در تیمارهای دی‌اکسید سریم مشاهده نشد. از طرفی دیگر مقدار پروتئین کل در تیمارهای اکسید روی در مقایسه با گروه شاهد تغییرات معنی‌داری نداشت، با این حال علی‌رغم معنی‌دار نبودن، کاهش جزئی پروتئین در گیاهان در معرض نانوذرات دی‌اکسید سریم مشاهده شد. همچنین نتایج نشان دادند که نانوذرات در غلظت‌های ویژه‌ای می‌توانند نقش محرک در رشد گیاهان داشته باشند. در مجموع نتایج حاکی از آن است که گیاه لوبیا حساسیت بیشتری به نانوذرات دی‌اکسید سریم با توجه به غلظت مورد استفاده نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند تا مراتب قدرانی و سپاس خود را از کلیه مسئولین و همکاران محترم در دانشکده علوم پایه دانشگاه بوعلی سینا به جهت مساعدت برای انجام این پژوهش اعلام دارند.

باشد (۱۲)، که در نتایج حاضر، کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل کل، آنتوسیانین و افزایش نش‌الکتروولیت که ممکن است موجب آسیب به غشا شده باشد، مشاهده شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با توجه به نوع نانوذرات و غلظت آنها متغیر است. در مجموع، میزان تغییرات در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و همچنین سایر پارامترهای رشد در گیاهان در معرض نانوذرات دی‌اکسید سریم بالاتر از نانوذرات اکسید روی بود. این نتیجه می‌تواند به این دلیل باشد که روی در شکل نانو نقش مهمی در رشد و تکوین گیاهان دارد و همچنین برای فعالیت‌های آنزیمی ضروری است. معمولاً برگ‌ها به ۲۰-۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی برای رشد نیاز دارند که البته این مقدار با توجه به نوع گونه می‌تواند متغیر باشد. با این حال گزارش شده است که مقادیر ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عنصر روی برای برگ‌های گیاهانی مثل لوبیا و گوجه‌فرنگی سمی می‌باشد (۲۳). با این حال هیچ کدام از تیمارهای نانوذرات اکسید روی به این حد از سمیت نرسیده بودند. بنابراین، تغییرات اندک در پارامترهای گیاهان در معرض نانوذرات اکسید روی و در نتیجه کاهش اثرات مضر می‌تواند به دلیل مذکور باشد. گزارشات درباره اثرات نانوذرات اکسید روی و دی‌اکسید سریم بر فعالیت آنزیمی و سایر پارامترهای دیگر بسیار متغیر است. این تنوع و تغییرات پیشنهاد می‌کند که این معیارها بخصوص اندازه-گیری‌های مرتبط با آنزیم‌ها وابسته به نوع گونه گیاهی، شرایط فیزیوشیمیایی خاک، نحوه اعمال نانوذرات و از همه مهمتر زمان در معرض قرار دادن است.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پاسخ‌های در سطح سلولی گیاه با توجه به نوع نانوذرات

منابع

1-Aebi, H., 1974. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis* (Second Edition). Elsevier, 2: 673-684.

2-Alharby, H F, Metwali, E M R, Fuller, M P, Aldhebiani, A Y. 2016. The alteration of mRNA expression of SOD and GPX genes, and proteins

- in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill) under stress of NaCl and/or ZnO nanoparticles. Saudi Journal of Biological Sciences, 23(6): 773–781.
- 3-Arndt, S K, Irawan, A, Sanders, G J. 2015. Apoplastic water fraction and rehydration techniques introduce significant errors in measurements of relative water content and osmotic potential in plant leaves. Physiologia Plantarum, 155 (4): 355-368.
 - 4-Arnon, D I, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant physiology, 24(1):-1-15.
 - 5-Bandyopadhyay, S, Plascencia-Villa, G, Mukherjee, A, Rico, C M, José-Yacamán, M, Peralta-Videa, J R, Gardea-Torresdey, J L. 2015. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. Science of the Total Environment, 515–516: 60–69.
 - 6-Barrios, A.C., Rico, C.M., Trujillo-Reyes, J., Medina-Velo, I.A., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2016. Effects of uncoated and citric acid coated cerium oxide nanoparticles, bulk cerium oxide, cerium acetate, and citric acid on tomato plants. Science of The Total Environment, 563:956-964.
 - 7-Bitocchi, E, Rau, D, Rodriguez, M, Murgia, M, 2016. Crop improvement of *Phaseolus* spp. through interspecific and intraspecific hybridization. CRC Press, 63(4): 218-180.
 - 8-Bradford, M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2):248-54.
 - 9-Chavarria, G, Pessoa dos Santos, H, Suita de Castro, L A, Marodin, G A B, Bergamaschi, H. 2012. Anatomy, chlorophyll content and photosynthetic potential in grapevine leaves under plastic cover. Revista Brasileira de Fruticultura, 34 (3): 661-668.
 - 10-Chehregani, A, Lari Yazdi, H, Hoseini, S, Majd, A. 2007. Toxic Effects of Diesel Exhaust Particles on the Ovules and Embryonic Sac Development in *Phaseolus vulgaris* L. Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology, 1(2): 54-56.
 - 11-Dimkpa, C O, McLean, J E, Britt, D W, Anderson, A J, 2012 (a). Bioactivity and biomodification of Ag, ZnO, and CuO nanoparticles with relevance to plant performance in agriculture. Industrial Biotechnology, 8 (6): 344–357.
 - 12-Dimkpa, C O, McLean, J E, Latta, D E, Manangon, E, Britt, D W, Johnson, W P, 2012 (b). CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. Journal of Nanoparticle Research, 14 (9): 1-15.
 - 13-Franklin, N M, Rogers, N J, Apte, S C, Batley, G E, Gadd, G E, Casey, P S, 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. Environmental Science & Technology, 41 (24): 8484–8490.
 - 14-Gawande, M B, Goswami, A, Felpin, F X, Asefa, T, Huang, X, Silva, R, 2016. Cu and Cu-based nanoparticles: synthesis and applications in catalysis. Chemical reviews, 116 (6):3722-3811.
 - 15-Hong, ., Peralta-Videa, J R., Rico, C, Sahi, S, Viveros, M N, Bartonjo, J, Zhao, L, Gardea-Torresdey, J L, 2014. Evidence of translocation and physiological impacts of foliar applied CeO₂ nanoparticles on cucumber (*Cucumis sativus*) plants. Environmental Science & Technology, 48: 4376–4385.
 - 16-Jain, R, Srivastava, S, Solomon, S, Shrivastava, A K, Chandra, A, 2010. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum spp.*). Acta Physiologiae Plantarum, 32: 979–986.
 - 17-Koch, K C, Chapman, K, Louis, J, Heng-Moss, T, Sarath, G. Plant Tolerance: A Unique Approach to Control Hemipteran Pests. Frontiers in Plant Science, 13 (7): 1-12.
 - 18-Krishnaraj, C, Jagan, E, Ramachandran, R, Abirami, S, Mohan, N, Kalaichelvan, P, 2012. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. Process biochemistry, 47(4):651-8.
 - 19-Li, X, Yang, Y, Zhang, J, Jia, L, Li, Q, Zhang, T, Qiao, K, Ma, S. 2012. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum aestivum* L. Ecotoxicology and Environmental Safety, 86: 196-203.
 - 20-Li, X, Yang, Y, Jia, L, Chen, H, Wei, X, 2013. Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. Ecotoxicology and Environmental Safety, 89: 150–157.

- 21-Lin, D, Xing, B, 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243–250.
- 22-Ma, X, Wang, Q, Rossi, L, Zhang, W. 2015. Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. *Environmental science & technology*, 50(13):6793-802.
- 23-Macnicol, R D., Beckett, P H T, 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil*, 85: 107–129.
- 24-Manzo, S, Rocco, A, Carotenuto, R, Picione, F D L., Miglietta, M L, Rametta, G, Francia, G D, 2011. Investigation of ZnO nanoparticles' ecotoxicological effects towards different soil organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 18 (5): 756–763.
- 25-Majumdar, S, Almeida, I C, Arigi, E A, Choi, H, VerBerkmoes, N C, Trujillo-Reyes, J, 2015. Environmental effects of nanoceria on seed production of common bean (*Phaseolus vulgaris*): a proteomic analysis. *Environmental science & technology*. 49(22):13283-93.
- 26-Milani, N, McLaughlin, M J, Stacey, S P, Kirby, J K, Hettiarachchi, G M, Beak, D G, 2012. Dissolution kinetics of macronutrient fertilizers coated with manufactured zinc oxide nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3991–3998.
- 27-Nair, P M G, Chung, I M, 2015. Changes in the growth, redox status and expression of oxidative stress related genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to copper oxide nanoparticle exposure. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2):350-61
- 28-Pandey, S, Singh, H, 2011. A simple, cost-effective method for leaf area estimation. *Journal of Botany*, 1-6.
- 29-Peng, G, Ellis, J E, Xu, G, Xu, X, Star, A, 2016. In Situ Grown TiO₂ Nanospindles Facilitate the Formation of Holey Reduced Graphene Oxide by Photodegradation. *ACS applied materials & interfaces*, 8(11):7403-10.
- 30-Rico, C M, Morales, M I, McCreary, R, Castillo-Michel, H, Barrios, A C, Hong, J, Tafoya, A, Lee, W Y, Varela-Ramirez, A, Peralta-Videa, J R, Gardea-Torresdey, J L, 2013. Cerium oxide nanoparticles modify the antioxidative stress enzyme activities and macromolecule composition in Rice seedlings. *Environmental science & technology*, 47: 14110–14118.
- 31-Rico, C M, Lee, S C, Rubenecia, R, Mukherjee, A, Hong, J, Peralta-Videa, J R, Gardea-Torresdey, J L, 2014. Cerium oxide nanoparticles impact yield and modify nutritional parameters in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (40): 9669–9675.
- 32-Rossi, L, Zhang, W, Ma, X, 2017. Cerium oxide nanoparticles alter the salt stress tolerance of *Brassica napus* L. by modifying the formation of root apoplastic barriers. *Environmental Pollution*, 229: 132-138.
- 33-Subba, P, Mukhopadhyay, M, Mahato, S K, Bhutia, K D, Mondal, T K, Ghosh, S K, 2014. Zinc stress induces physiological, ultra-structural and biochemical changes in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20: 461– 473.
- 34-Wagner, G J, 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*, 64(1):88-93.
- 35-Wang, F, Liu, X, Shi, Z, Tong, R, Adams, C A, Shi, X, 2016. Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plant: a soil microcosm experiment. *Chemosphere*, 147, 88–97.
- 36-Watson, J L, Fang, T, Dimkpa, C O, Britt, D W, McLean, J E, Jacobson, A, Anderson, A J. 2015. The phytotoxicity of ZnO nanoparticles on wheat varies with soil properties. *Biometals*, 28: 101–112.
- 37-Zhao, L, Hernandez-Viezcas, J A, Peralta-Videa, J R, Bandyopadhyay, S, Peng, B, Munoz, B, Keller, A.A, Gardea-Torresdey, J L, 2013. ZnO nanoparticle fate in soil and zinc bioaccumulation in corn plants (*Zea mays*) influenced by alginate. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15: 260–266.

Effect of ZnO and CeO₂ nanoparticles on the element accumulation, growth and biochemical parameters in *Phaseolus vulgaris* L.

Salehi H.¹, Chehregani Rad A.K.¹, Majd A.^{2,3} and Gholami M.⁴

¹ Laboratory of Plant Cell Biology, Dept. of Biology, Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

² Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, Tehran-North Branch, Tehran, I.R. of Iran

³ Plant Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

⁴ Dept. of Agricultural, Faculty of Horticulture, Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Contamination of soils with oxide metals nanoparticles, by various human activities, is an important environmental issue in both developing and developed countries. The aim of the present study was to investigate the effects of ZnO and CeO₂ NPs (250, 500, 1000 and 2000 mg L⁻¹) on some growth and biochemical parameters of bean plants growing under greenhouse conditions in a completely randomized experiment. The results indicated that ZnO NPs almost, at all concentrations, enhanced plant height, while CeO₂ NPs at high concentration did not. Both NPs at all concentrations decreased chlorophyll and anthocyanin content in the experimental plants compared to control ones. There was no significant differences in total protein content in both treatments compared to control. However, a protein band with molecular weight of 28 KDa seems to be appeared in the group treated by 500 mg L⁻¹ ZnO NPs. The activity of antioxidant enzymes in CeO₂ NPs-treated plant was higher than those in ZnO NPs treatments. Altogether, the results showed that plant responses to CeO₂ NPs were more subject to change upon to concentration than ZnO NPs.

Key words: metal oxide nanoparticles, photosynthetic pigment, protein, enzyme activity, *Phaseolus vulgaris*