

بررسی اثر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO₂) بر رنگیزه های فتوستتزی و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی اکسیدانی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

آتنا غلامی¹، حسین عباسپور²، مهیار گرامی³، حمید هاشمی مقدم^{4*}

- 1- دانش آموخته دکتری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
 - 2- دانشیار زیست گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
 - 3- استادیار زیست گیاهی، عضو هیات علمی موسسه آموزش عالی سنا ساری
 - 4- دانشیار شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
- (تاریخ دریافت: 97/09/08 تاریخ پذیرش: 99/04/09)

چکیده

استفاده از فناوری نانو، می‌تواند کاربردهای مهم و جدیدی را در زمینه های مختلف علوم کشاورزی ایجاد نماید به گونه ای که بر بهبود عملکرد گیاهان، افزایش رشد و فتوستتزی تاثیرگذار باشد. با استفاده از این فناوری می‌توان شیوه های مدیریت محصول را بهبود بخشید. میزان جذب نانو ذرات در گیاهان متفاوت بوده و بستگی به نوع گیاه، ترکیب شیمیایی و اندازه این ذرات دارد. نانو ذره دی اکسید تیتانیوم (TiO₂) به طور وسیعی در صنایع کشاورزی به جهت افزایش خصوصیات رشدی گیاهان به کار می‌رود. بدین منظور این پژوهش به مطالعه اثر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید بر رنگیزه های فتوستتزی و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و آنزیم های آنتی اکسیدانی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) پرداخته است. این تحقیق بصورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال 97-1396 در گلخانه دانشگاه آزاد دامغان صورت پذیرفت. غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم در هفت سطح (0، 20، 40، 80، 100، 200 و 400 پی پی ام) طی سه مرحله با بازه زمانی یک‌هفته بر گیاه رزماری محلول پاشی شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره تیتانیوم مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید روند افزایشی را نشان داد به گونه‌ای که بیشترین مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئید مربوط به غلظت 200 پی پی ام نانوذره تیتانیوم بود. همچنین اثر نانوذره تیتانیوم بر مقدار قند محلول حاکی از آن بود که با افزایش غلظت‌های نانوذره تیتانیوم روند افزایشی در این صفت مشاهده گردید که بیشترین مقدار مربوط به غلظت‌های 100، 200 و 400 پی پی ام نانوذره بود. نتایج محلول پاشی نانوذره تیتانیوم بر مقادیر آنزیم های آنتی اکسیدانی بیانگر آن بود که در سطوح بالای غلظتی نانوذره تیتانیوم (100، 200 و 400 پی پی ام) مقدار این آنزیم های آنتی اکسیدانی افزایش معنی داری را نسبت به نمونه شاهد داشت. بطور کلی به کارگیری غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم بر برخی از خصوصیات آنتی اکسیدانی و بیوشیمیایی گیاه رزماری تاثیر گذار بود به گونه‌ای که در غلظتهای بالای این نانوذره، بیشترین روند افزایشی را نسبت به نمونه شاهد نشان دادند.

کلید واژگان: فناوری نانو، نانوذره تیتانیوم، رنگیزه های فتوستتزی، گیاه رزماری

*مسئول مکاتبات: hashemimoghaddam@yahoo.com

1- مقدمه

سطح و واکنش پذیری بستگی دارد. همچنین، به غلظت نانوذرات بستگی دارد و از یک گیاه به گیاه دیگر متفاوت است. نانو ذرات در این مقیاس دارای خواص جدیدی هستند که اگر به درستی سنتز شوند می‌توانند در زمینه‌های علوم پزشکی، صنایع الکترونیک، انرژی، بیوتکنولوژی و زیست محیطی بکار گرفته شوند استفاده از نانوذرات فلزی یکی از رویکردهای اخیر در جامعه علمی بوده که بیشتر مورد توجه قرار گرفته شده است [6]. یکی از ویژگی‌های مهم نانوذرات تیتانیوم که آنها را بسیار مهم و موثر می‌سازد خواص فوتوکاتالیتی آنهاست. فوتوکاتالیست TiO_2 بیشتر برای تجزیه فوتون ترکیبات آلی استفاده می‌شود. این ترکیب‌تبه عنوان یک فوتوکاتالیست در ضدعفونی (استریلیزاسیون) آلودگی‌های مختلف محیطی مانند مواد آلی، ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود [7]. همچنین این ترکیبات باعث تحریک تقسیم سلولی و افزایش ابعاد آن می‌گردد و القاء کالوس‌دهی را در شرایط تاریکی در محیط‌های این ویترو تحریک می‌نماید که این اثر با افزایش جذب نور و سرعت بخشیدن در انتقال انرژی نوری و جلوگیری از فروپاشی کلروپلاست‌ها و بالا بردن ظرفیت فتوسنتزی انجام می‌گیرد [8]. با توجه به اهمیت نانوذره تیتانیوم و خاصیت فوتوکاتالیستی آن، این پژوهش به مطالعه اثر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2) بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) پرداخته است.

2- مواد و روشها

2-1- مواد و تجهیزات مورد استفاده

آب اکسیژنه، اتانول، استن، اسید استیک، اسید اورتوفسفریک، اسید سولفوسالیسیلیک، کوماسی بریلیانت بلو، اسید کلریدریک، اتیلن دی آمین تری استیک اسید، نیترات کلسیم، سولفات روی، سولفات مس، سولفات منیزیم، نین هیدرین، نیترات پتاسیم، فسفات منو پتاسیک، کربنات سدیم، فنل، اسید تیوباریتوریک، هیدروکسید باریم، اسیدتری کلرواستیک، کلروآهن، تری کلرو استیک اسید، اسید سولفوریک، گایاکول، فسفات هیدروژن پتاسیم، گلوکز، تولوئن، نیترات آمونیوم، نیتروژن مایع، بافرتریس،

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) متعلق به خانواده نعناعیان، گیاهی است چند ساله به فرم بوته ای که در تمامی فصل‌های سال سبز با ارتفاع یک تا دو متر می باشد. این گیاه دارای شاخه های بلند و باریک خوشبو، گرم و تند است و جزء گیاهان ادویه ای به شمار می رود. برگ های این گیاه ضخیم و چرمی درخشان به صورت خطی با گل‌های کوچک و آبی کم رنگ است. رزماری یک ادویه خوب برای غذا به شمار میرود همچنین یک داروی گیاهی مناسب برای رفع ریزش مو و توقف آن است [1]. سالیان دراز است که مردم نواحی مختلف جهان از گیاه رزماری بصورت تازه و یا خشک کرده آن در غذاهای خود استفاده می کنند. بهره‌گیری از علوم و فناوری‌های جدید در جهت رفع نیازهای بشری همواره مورد توجه بشر بوده است. استفاده از فناوری‌های نوین می‌تواند باعث افزایش بهره‌وری کشاورزی گردد. امروزه فناوری نانو دارای پتانسیل بسیار بالایی در جهت ارتقاء محصولات کشاورزی و باغبانی می‌باشد. در همین راستا، روش‌های نوین فناوری نانو به عنوان یک فناوری بین رشته‌ای و پیشناز رفع مشکلات و کمبودها در بسیاری از عرصه‌های علمی، به خوبی جایگاه خود را در علوم کشاورزی و صنایع وابسته آن به اثبات رسانده است. فناوری نانو کاربردهای وسیعی در بخش کشاورزی از جمله افزایش تولیدات زراعی، کم کردن سموم و کودها در کنار حفظ محیط زیست و منابع کره زمین دارد [2]. پاسخ گیاهان به نانو ذرات برحسب نوع گونه، مرحله رویشی، سن و ماهیت نانو ذرات متفاوت است [3]. این فناوری می‌تواند راههایی برای بالا بردن ارزش محصولات کشاورزی و رفع مشکلات محیطی ارائه دهد [4]. در بین نانوذرات، نانو ذره دی اکسید تیتانیوم کاربرد بیشتری در صنعت دارد. برخی از ویژگی‌های این ماده که موجب برتری آن نسبت به سایر ذرات شده است شامل مقاومت شیمیایی بالا، غیر سمی بودن آن، طول عمر بالای این ماده، در دسترس بودن و هزینه کم آن است [5]. نانو ذرات عبارتند از ذراتی که حداقل یک بعد از آنها کمتر از 100 نانومتر باشد. اثر نانوذرات روی عملکرد هر سیستم بیولوژیکی، از جمله گیاهان در درجه اول به خواص فیزیکی نانوذرات، مانند اندازه، شکل، وزن، ترکیب شیمیایی، تغییرات

همچنین لیست دستگاه ها و ابزار و مواد مورد نیاز در جداول 1، 2 و 3 نشان داده شده است.

2-2-1- سنجش کلروفیل (a, b) و کارتنوئید

اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌های فتوستتزی در گیاه استویا از طریق روش آرنون [9] و به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. پس از تهیه نمونه‌ها، جذب محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های 663، 645 و 480 نانومتر اندازه‌گیری و برای شاهد نیز از استون 80% استفاده گردید. مقدار کلروفیل‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم محاسبه گردید.

2-2-2- سنجش آنتوسیانین کل

برای سنجش میزان آنتوسیانین کل، مقدار 0/02 گرم از بافت خشک گیاهی با 4 میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک 1% متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت 24 ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس، محلول به مدت 10 دقیقه و در 13000 دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی را برداشته و جذب محلول‌ها در طول موج 530 و 657 نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. از محلول اسید کلریدریک 1% متانول به عنوان شاهد استفاده گردید. میزان آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید [10].

$$A = A_{530} - (0.25 - A_{657})$$

A: جذب محلول (اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آنها اندازه‌گیری شده است).

2-2-3- استخراج محلول آنزیمی

جهت استخراج محلول‌های آنزیمی کاتالاز و گایاکول پراکسیداز 0/5 گرم از نمونه برگ‌گی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع ساییده شدند و سپس به آن 2 میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH=7) محتوی EDTA 0/5 میلی‌مولار، اضافه شد. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به مدت 15 دقیقه با 20000 دور در دقیقه و دمای 4 درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند. برای پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها، محلول آنزیمی تا زمان اندازه‌گیری در دمای 20- سانتی‌گراد نگهداری شد (46). آنزیم آسکوربات پراکسیداز دوام کمی در محیط خارج از سلول دارد به طوری‌که برخی از ایزوزیم‌های آن، نیمه‌ی عمر کمتر از 2 دقیقه در محیط‌های با غلظت پائین آسکوربات دارند. به همین دلیل جهت حفظ ساختار

فسفات دی پتاسیک همگی از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. سرم آلبومن گاوی از شرکت سیگما الدریچ تهیه گردید. نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم با خلوص 99/99% با قطر 20 نانومتر در فرم روتیل/ آتاتاز 80/20 از شرکت US Nano خریداری گردید.

وسایل مورد استفاده عبارتند از: اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-120-02) آون (Electrolux)، اتوکلاو (Electric Steroclave)، بن‌ماری (Fan Azma)، pH متر (Metrohm)، ترازوی آنالیتیک (Savtorius)، سانتریفوژ معمولی (Tomy Seiko)، شیکر (Fan Azma Gostor)

2-2-2- طرح آزمایش، مواد اولیه و سنجش

پارامترها

این پژوهش در دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان در سال 96-1395 صورت پذیرفت. به منظور بررسی تاثیر نانوذره تیتانیوم بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه رزماری، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نانو ذره تیتانیوم از US Research Nanomaterials, Inc تهیه گردید. سایر مواد مصرفی در گرید نجزیه ای از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم (0، 20، 40، 80، 100، 200 و 400 پی پی ام) بر گیاه رزماری، طی سه مرحله با بازه زمانی یک‌هفته محلول پاشی شدند. گیاهچه‌های 45 روزه رزماری از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی کرج تهیه شد و به گلدان‌های پلاستیکی با بستر حاوی پرلیت و پیت موس انتقال داده شد. تامین نیاز تغذیه‌ای توسط محلول غذایی هوگلند صورت گرفت. بعد از گذشت یک هفته غلظت‌های مختلف نانوذره به صورت محلول پاشی برگی به گیاه اعمال شد. همچنین بعد از آن شوری به صورت آبیاری به همراه محلول غذایی هوگلند در اختیار گیاهان قرار گرفت. سپس مقدار رنگیزه های فتوستتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کارتنوئید)، بیوشیمیایی (فلاونوئید، قند محلول، آنتوسیانین و آب اکسیژنه) و برخی از خصوصیات آنتی اکسیدانی (فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و درصد مهار رادیکال آزاد) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS صورت گرفت و رسم نمودارها در نرم افزار Excel انجام شد.

تبخیر الکل، عصاره بدست آمده در دمای 70 درجه قرار گرفت. برای حذف کلروفیل عصاره حاصل به نسبت 1 به 5 با کلروفرم مخلوط شد و بعد از ورتکس به مدت 5 دقیقه به حال سکون رها شد. فاز بالایی عصاره بدست آمده به مدت 10 دقیقه در سرعت 10000 rpm سانتریفیوژ شد. قسمت شفاف بالایی جدا و برای اندازه گیری قند محلول استفاده گردید. اندازه‌گیری قند با اندازه‌گیری بوسیله انترون بر طبق روشمک ردی [14]. انجام پذیرفت. سه میلی‌لیتر محلول انترون به 200 میکرولیتر عصاره اضافه گردید و به مدت 20 دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن نمونه‌ها میزان جذب آنها در طول موج 620 نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تهیه 100 میلی‌لیتر معرف آنترون، ابتدا 76 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 98 درصد با 30 میلی‌لیتر آب مقطر رقیق گردید. بعد از سرد شدن 150 میلی‌گرم آنترون در آن حل و در ظرف کهربایی نگهداری شد.

2-2-5- سنجش محتوای آب اکسیژنه

برای اندازه‌گیری میزان آب اکسیژنه، از روش سرگیو و همکاران (1997) استفاده شد. برای این منظور، 500 میلی‌گرم از بافت برگ را با 5 میلی‌لیتر TCA 0/1 درصد در حمام یخ، ساییده تا هموژن شوند. سپس همگنای حاصل به مدت 15 دقیقه در 12000 دور سانتریفیوژ شد. 0/5 میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و 0/5 میلی‌لیتر از بافر فسفات بتاسیم 10M و 1 میلی‌لیتر یدوربتاسیم 1 مولار به آن اضافه گردید. در نهایت، جذب نمونه در طول موج 390 نانومتر خوانده شد. میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد بدست خواهد آمد [15].

2-2-6- سنجش مقدار فلاونوئیدهای کل

از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد [16]. هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (0/5 mL از 1:10g. mL⁻¹) به صورت جداگانه با 1/5 میلی‌لیتر متانول، 0/1 میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (10% متانولی)، 0/1 میلی‌لیتر استات پتاسیم (1M) و 2/8 میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت 30 دقیقه قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در 415 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

و پایداری آن به محلول استخراج آنزیم پلی‌وینیل پیرولیدین (5%) و آسکوربات 2 میلی‌مولار اضافه شد و در سایر موارد استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز مشابه آنزیم‌های فوق می‌باشد.

2-2-3-1- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش لوک [11] استفاده شد. 20 میکرولیتر عصاره آنزیمی با 980 میکرولیتر از بافر فسفات حاوی آب اکسیژنه دو میلی‌مولار مخلوط شدند و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج 240 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد.

2-2-3-2- گایاکول پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (2 میلی‌لیتر) شامل 1 میلی‌لیتر بافر فسفات 100 میلی‌مولار (PH=7)، 250 میکرولیتر از 0/1 EDTA میلی‌مولار، 1 میلی‌لیتر گایاکول 5 میلی‌مولار، 1 میلی‌لیتر پراکسید 15 میلی‌مولار و 50 میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شد. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج 470 نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی بر اساس میزان تراگایاکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی 1/33 mmol¹.cm⁻¹ به دست آمد [12].

2-2-3-3- سنجش فعالیت درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH)

جهت اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال آزاد 2 میلی‌لیتر عصاره با 2 میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH 0/004% مخلوط گردید. جذب نمونه‌ها در 517 نانومتر در مقابل شاهد متانول خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد (%I) هر عصاره به کمک فرمول ذیل محاسبه شد [13].

$$\%I = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

2-2-4- اندازه‌گیری میزان قند محلول

جهت سنجش میزان قند محلول، 0/1 گرم بافت تازه را با 5 میلی‌مولار اتانول 80% گرم در هاون چینی خرد و 15 دقیقه در بن ماری قرار داده شد. بعد از آن، عصاره الکی حاوی قند محلول را جدا و قسمت پایینی همراه با 5 میلی‌مولار اتانول 80% دوباره برای تکرار عصاره‌گیری به حمام آب جوش منتقل گردید. عمل استخراج با اتانول 4 بار تکرار شد. بعد از استخراج به منظور

3- نتایج و بحث

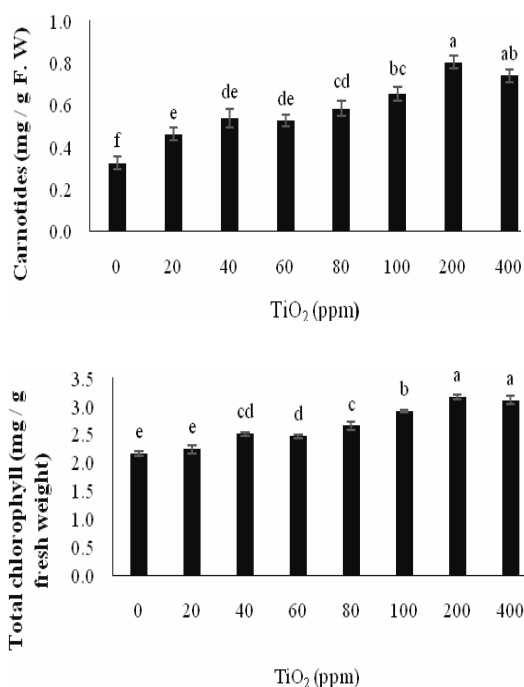
3-1- نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر رنگدانه های فتوسنتزی و غیر

فتوسنتزی

Table 1 Analysis of variance of the effect of titanium nanoparticles on photosynthetic and non-photosynthetic pigments

	Anthocyanin	Carotenoids	Chlorophyll total	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Degree of freedom
TiO ₂	0.002**	0.7**	0.431**	0.11**	0.132**	7
Error	0.000065	0.003	0.008	0.006	0.004	16

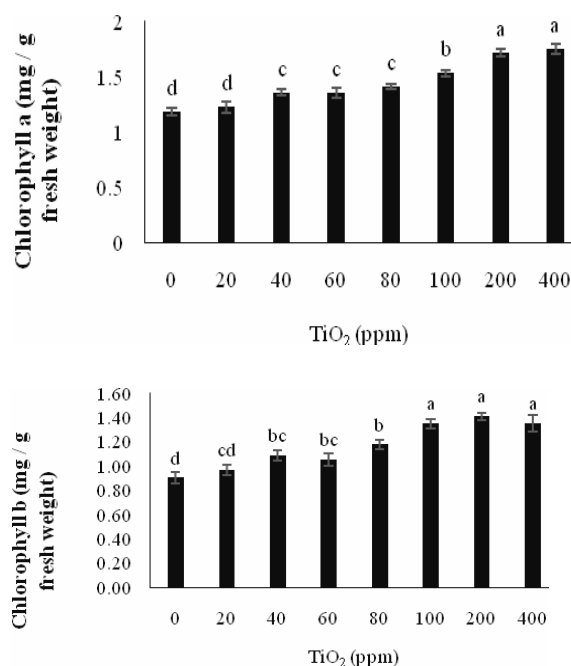
*and **Significance effect at 1 and 5 percent probability level, respectively

**Fig 1** Investigation of the effect of titanium nanoparticles on photosynthetic pigments in Rosemary

در هر ستون میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی داری ندارند.

مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر مقدار آنتوسیانین نشان داد که با افزایش غلظت های نانو ذره تیتانیوم، مقدار این صفت افزایش یافت به صورتیکه بیشترین مقدار آن در غلظت 200 پی پی ام (0/14 میلی گرم برگرم وزن خشک) بود که نسبت به نمونه شاهد (0/06 میلی گرم برگرم وزن خشک) معنی دار گزارش شد. (نمودار 2).

مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر رنگدانه های فتوسنتزی حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانو ذره تیتانیوم مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید روند افزایشی را نشان داد به گونه ای که بیشترین مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئید مربوط به غلظت 200 و 400 پی پی ام نانو ذره تیتانیوم بود به گونه ای که مقادیر کلروفیل کل در غلظت های 200 و 400 پی پی ام به ترتیب 3/2 و 3/1 میلی گرم بر گرم وزن تر بود که نسبت به نمونه شاهد (2/2 میلیگرم بر گرم وزن تر) روند افزایشی معنی داری داشت (نمودار 1).



2-3- نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثر

نانو ذره تیتانیوم بر برخی از صفات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر نانو ذره تیتانیوم بر برخی از صفات بیوشیمیایی (قند محلول، فلاونوئید و مقدار آب اکسیژنه) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و درصد مهار رادیکال آزاد) در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول 2).

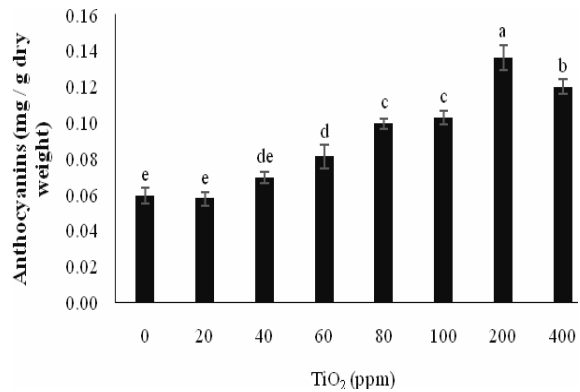


Fig 2 The effect of titanium nanoparticles on the amount of anthocyanin in rosemary

Table 2 Variance analysis of the effect of titanium nanoparticles on some biochemical compounds and rosemary plant enzymes

	Catalase	Peroxidase	Polyphenol Oxidase	H ₂ O ₂	Percentage of restraint	Flavonoid	Soluble Sugar	Degree of freedom
TiO ₂	0.153**	133.02**	0.001**	0.005**	278.64**	361.032	0*	7
Error	0.005	20.984	0.0000337	0.0000758	10.043	16.659	0.0000494	16

**Significant effect on probability level of one percent

مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر مقدار آب اکسیژنه حاکی از آن بود که با افزایش غلظت‌های نانو ذره تیتانیوم روند کاهشی در این صفت مشاهده گردید که کمترین مقدار آب اکسیژنه مربوط به غلظت 200 پی پی ام نانو ذره بود (نمودار 4).

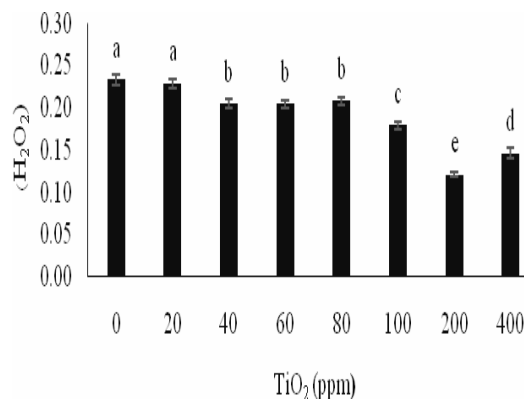


Fig 4 Investigation the effect of titanium nanoparticles on the amount of oxygenated water in rosemary

مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر مقدار قند محلول نشان داد که با افزایش غلظت‌های نانو ذره تیتانیوم روند افزایشی در این صفت مشاهده گردید که بیشترین مقدار مربوط به غلظت-

مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر مقدار فلاونوئید حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانو ذره تیتانیوم، مقدار فلاونوئید در گیاه رزماری افزایش یافت که این افزایش در غلظت‌های 100، 200 و 400 پی پی ام (به ترتیب 61.58 و 61 میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر) بیشترین مقدار را داشت (نمودار 3).

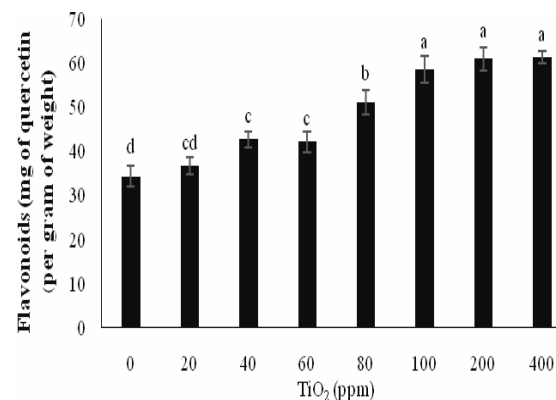


Fig 3 Investigation the effect of titanium nanoparticles on the amount of flavonoids in rosemary

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.

معنی‌داری دهد به گونه‌ای که مقدار این آنزیم در غلظت 200 پی پی ام، 1 واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه و در نمونه شاهد 0/4 واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه گزارش شد. همچنین مقدار آنزیم پراکسیداز نیز در غلظت‌های 80، 100، 200 و 400 پی پی ام نانو ذره تیتانیوم به ترتیب 61/08، 59/37، 68/27 و 63/12 واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه نسبت به نمونه شاهد (40 واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه) بود که بیشترین مقدار این آنزیم مربوط به نمونه‌هایی بود که با غلظت 200 پی پی ام محلول پاشی شدند. مقایسه میانگین صفت آنزیم پلی فنل اکسیداز نشان داد که در سطوح بالای غلظتی نانو ذره تیتانیوم (100، 200 و 400 پی پی ام) مقدار این آنزیم افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد داشت. مقایسه میانگین صفت درصد مهار رادیکال آزاد حاکی از آن بود که در غلظت 200 پی پی ام نانو ذره تیتانیوم، بیشترین مقدار درصد مهار رادیکال آزاد (66 درصد) را نسبت به نمونه شاهد (40 درصد) نشان داد. این نتیجه بیانگر آن است که افزایش غلظت نانو ذره منجر به افزایش درصد مهار رادیکال آزاد در گیاه رزماری گردید (جدول 3).

های 100، 200 و 400 پی پی ام نانو ذره بود که نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بود به گونه‌ای که در سطوح پایین نانو ذره تیتانیوم (20، 40، 60 و 80 پی پی ام) روند افزایشی آن نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار نبود (نمودار 5).

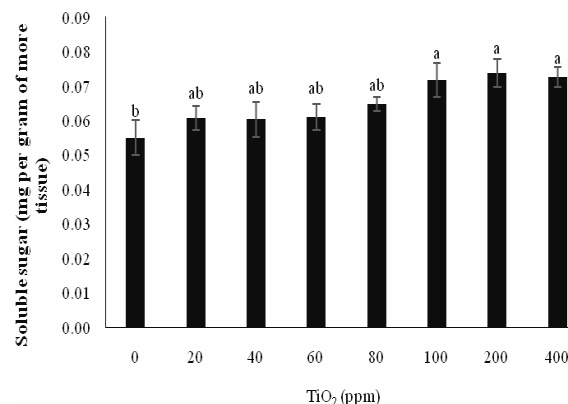


Fig 5 Evaluation of the effect of titanium nanoparticles on the soluble sugar in rosemary (in each column, the averages that have at least one common letter do not have a statistically significant difference)

مقایسه میانگین اثر نانو ذره تیتانیوم بر مقدار آنزیم کاتالاز نشان داد که غلظت‌های بالای نانو ذره تیتانیوم (100، 200 و 400 پی پی ام) توانست مقدار این آنزیم را در گیاه رزماری افزایش

Table 3 Comparison of the effect of titanium nanoparticles on some antioxidant enzymes in rosemary

Polyphenol oxidase (Enzyme unit per mg of protein per minute)	Peroxidase (Enzyme unit per mg of protein per minute)	Catalase (Enzyme unit per mg of protein per minute)	Percentage of restraint	Treatment of Titanium nanoparticles (PPM)
0.13 ^c	49 ^e	0.4 ^d	40 ^f	Ti (0 ppm)
0.13 ^c	51.47 ^{de}	0.4 ^d	40 ^f	Ti (20 ppm)
0.13 ^c	54.23 ^{de}	0.5 ^{cd}	48 ^{de}	Ti (40 ppm)
0.13 ^c	52.27 ^{de}	0.4 ^d	46 ^e	Ti (60 ppm)
0.15 ^b	61.07 ^{abc}	0.6 ^c	53 ^{cd}	Ti (80 ppm)
0.15 ^{ab}	59.37 ^{bcd}	0.8 ^b	62 ^{ab}	Ti (100 ppm)
0.16 ^a	68.27 ^a	1 ^a	66 ^a	Ti (200 ppm)
0.16 ^a	63.13 ^{ab}	0.9 ^{ab}	58 ^{bc}	Ti (400 ppm)

برگ قرار گرفته اند. اندازه ذرات بین 30 تا 38 نانومتر گزارش شد (شکل 6).

3-3- نتایج مطالعات میکروسکوپی

بررسی میکروگرافهای تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات تیتانیوم به طور تجمعی بر سطح اپیدرم

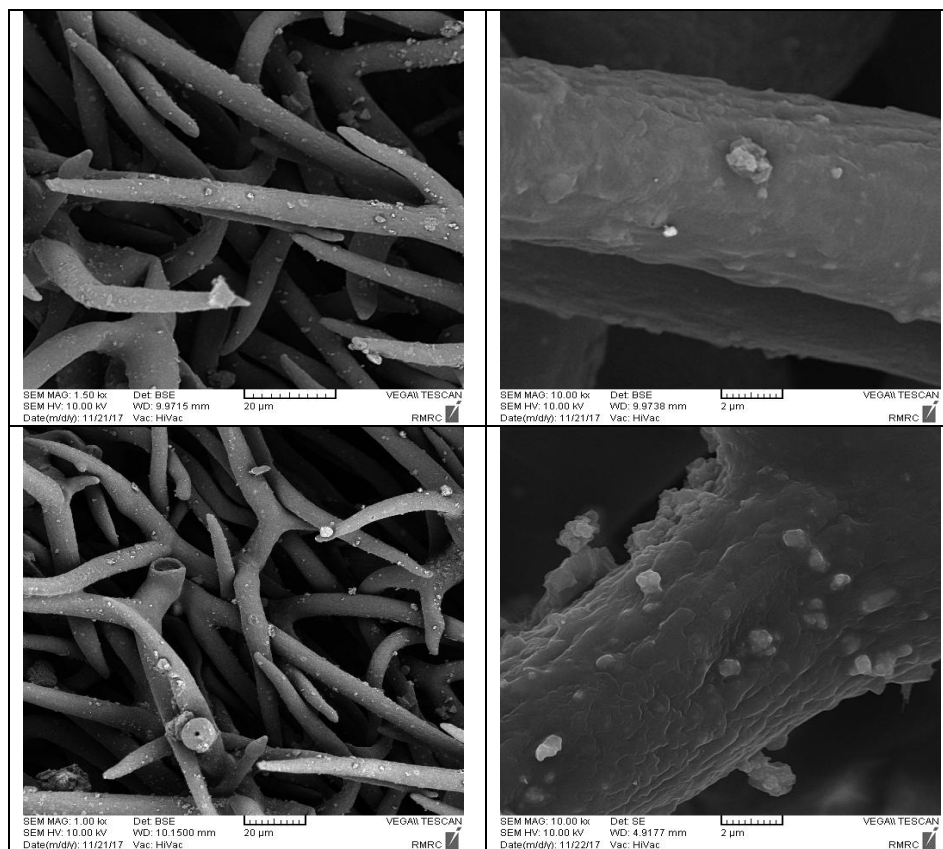


Fig 6 Electron microscopy images (SEM) of sprayed rosemary leaves (titanium 400 ppm)

فعالیت رایبیسکو می‌شود [19]. کاربرد بیولوژیکی نانو ذره تیتانیوم باعث افزایش میزان فتوسنتزی خالص، هدایت آب و میزان تعرق در گیاهان می‌شود نانو آاناتاز به شدت انتقال الکترون، فعالیت فتوسنتز، فعالسازی O_2 و فعالیت فتوفسفوریلاسیون کلروفیل را در نور مرئی و نور ماوراء بنفش منجر می‌شود [20]. زی و همکاران (2016) گزارش دادند که نانو ذره تیتانیوم باعث افزایش جذب نور توسط کلروپلاست‌ها می‌شود که در نتیجه آن کمپلکس برداشت کننده نوری فعال می‌گردد. این فعال شدن، ظرفیت فتوسنتزی را افزایش می‌دهد [21]. محققان تلاش می‌کنند که جهت بالا بردن بهبود کارایی فتوسنتز در گیاهان از دستکاری های ژنتیکی و فناوری های نانو استفاده نمایند. نانوذرات تیتانیوم از دو طریق باعث افزایش فتوسنتز می‌شود یکی از طریق تغییر در فعالیت پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز از جمله فروکتوز 1 و 6 دی فسفاتاز که در چرخه کالوین موثر است و تغییر در چرخه پنتوز فسفات که در متابولیسم کربوهیدرات نقش دارد و دوم از طریق افزایش کلروفیل که باعث تحریک و افزایش فتوسنتز

نتایج این پژوهش نشان داد که محلول پاشی نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (TiO_2) بر رنگیزه های فتوسنتزی و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) موثر می‌باشد به گونه‌ای که غلظت‌های مختلف نانوذره تیتانیوم منجر به روند افزایشی در رنگیزه های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی گردید که با تحقیقات هونگ و همکاران (2005) مطابقت داشت آنها دریافتند که به کارگیری نانوذره تیتانیوم بر گیاه اسفناج منجر به افزایش مقدار کلروفیل، فتوسنتز و وزن خشک گیاه شد [17]. گزارش یانگ و همکاران (2006) حاکی از آن بود که نانو ذرات تیتانیوم با افزایش فعالیت آنزیم رایبیسکو منجر به افزایش رشد می‌گردد [18]. پژوهشگوتتا و تریفاتی (2011) نشان داد که به کارگیری نانوذرات تیتانیوم بر گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea*) باعث تجزیه ترکیبات آلی و افزایش هیدروژن می‌گردد. همچنین محلول پاشی این ترکیب منجر به افزایش وزن تر و خشک گیاه و محتوای کلروفیلی و مقدار فتوسنتز و افزایش

می شود [22].

گزارش شده است که در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) استفاده از نانو ذرات آهن Fe_3O_4 منجر به افزایش غلظت ذرات، سطح کربوهیدرات کل به طور معنی داری شد [29] که با نتایج پژوهش حاضر همسو است

نانوذرات تیتانیوم می تواند آنزیم های آنتی اکسیدان را در گیاهان افزایش دهد [30]، این ترکیب همچنین فعالیت های دیگر آنزیم هایی که در متابولیسم نیتروژن مانند گلوتامات دهیدروژناز، را افزایش می دهد همچنین یک محرک برای جذب نیترات و سایر ترکیبات آلی و غیر آلی نیتروژن است و در نهایت پروتئین کل و کلروفیل را در گیاه افزایش می دهد. نانو ذرات تیتانیوم دی اکسید با افزایش جذب فوتون باعث تحریک واکنش اکسایش و کاهش در گیاه می شود که در نهایت منجر به افزایش ظرفیت فتوسنتزی در گیاه و جلوگیری از پیری کلروپلاست می شود [31]. این نانو ذرات باعث افزایش فعالیت کربوکسیلاسیون آنزیم رایسکوو بهبود وضعیت رشد گیاه می گردد [17] به گونه ای که زن مارکر ناشی از نانو آنتاز برای mRNA رویبکس (rca) activated و افزایش سطح پروتئین و فعالیت فعال رویسکو باعث بهبود کربوکسیلاسیون این آنزیم و سرعت بالای واکنش کربن فتوسنتزی شد. همچنین این ترکیب از طریق کاهش اثرات سمی عناصر دیگر، باعث افزایش رشد می شود. نانو ذرات تیتانیوم موجب افزایش فعالیت آهن در کلروپلاست برگ و کروموپلاست میوه می گردد و در نهایت جذب مواد غذایی را بالا می برد [32].

نانو آنتاز قدرت ریشه را جهت جذب تحریک می کند و سبب افزایش توانایی ریشه در جذب آب و مواد غذایی می گردد که به دنبال آن وزن تر و خشک گیاه افزایش می یابد [18].

4- منابع

- [1] Sharifi Ashorabady, A. (2000). Effect of soil fertility in agricultural ecosystem. The PhD Thesis of Agriculture, Islamic Azad University, Science and Research, page 252, (In Persian).
- [2] Montano, P,A, Shenoy, G,K, Alp, E,E, Schulze, W,& Urban, J. (1986). Lett Nanomaterials Toxicity Health and Environmental, 56, 2076.
- [3] Nair, R, Varghese, S,H, Nair, B,G, Maekawa, T, Yoshida, Y, & Sakthi Kumar, D.

نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که غلظت های بالای نانو ذره تیتانیوم توانست مقدار آنزیم های آنتی اکسیدانی را در گیاه رزماری افزایش معنی داری دهد به گونه ای که مقدار این آنزیم در غلظت 200 پی پی ام بیشترین مقدار را داشت. مطالعه ای به اثر محلول پاشی نانو ذره تیتانیوم بر گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum L.*) پرداخته شد که نشان دهنده آن بود که نانو ذره تیتانیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی می گردد [23]. مارتینز سانچز و همکاران (2010). به بررسی اثر نانو ذره تیتانیوم بر فعالیت های آنزیم های آنتی اکسیدانی گیاه فلفل پرداختند. نتایج نشان داد که نانو ذره تیتانیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز، نیترات ردکتاز و پراکسیداز می شود [24]. همچنین استفاده از نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم می تواند باعث تحریک تقسیم سلولی، افزایش اندازه سلول گردد. این ترکیب می تواند جذب نور را افزایش، انتقال و تبدیل انرژی نورانی را تسریع، از زوال کلروپلاست ها ممانعت و طول دوره فتوسنتزی کلروپلاست ها را افزایش دهد [17].

مطالعات مرتضی و همکاران (2013) در بررسی تأثیر محلول پاشی نانو ذرات تیتانیوم (در غلظت های 0/02 ، 0/04 ، 0/06 درصد) بر ویژگی های بیوشیمیایی و عملکرد دانه ی زیره ی سبز نشان دادند که به کار گیری نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بر گیاه زیره ی سبز، در مقایسه با گروه شاهد (بدون استعمال برگی)، تأثیر مثبتی بر ویژگی های بیوشیمیایی گیاه داشت و بنابراین استفاده از این نانو ذره عملکرد گیاه را افزایش داد [25]. تحقیقات نشان داده اند که نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم سبب سنتز کلروفیل، تغییر در وزن خشک، عملکرد و برخی از ویژگی های متابولیسمی موجودات فتوسنتز کننده شده که این تغییرات غالباً همراه با القای سامانه های دفاعی و کاهش قابل توجه در شاخصهای خسارت بوده است [26]. همچنین در مورد مشابه صابرو همکاران (2014) گزارش کردند نانو اکسید تیتانیوم به واسطه تسریع فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز، سبب افزایش سنتز اسیدهای آمینه، پروتئین کلروفیل و افزایش فتوسنتز می گردد [27]. پژوهش سالما (2012) نشان داد که محتوای کربوهیدرات ها در گیاهان لوبیا و ذرت تیمارشده با غلظت های 20، 40 و 60 پی پی ام نانو ذرات نقره افزایش یافت، اما در تیمار 80 و 100 پی پی ام کاهش یافت [28].

- &Vanbeek, T, A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237.
- [14] McCready, R.M, Guggolz, J. Silveira, V, &Owens, H, S. (1950). Determination of starch and amylase in vegetables, *Analytical chemistry*, 22, 1156-1158.
- [15] Sergiev, I, Alexieva, V, & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus Academic Bulgare Science*, 51: 121-124.
- [16] Chang, C, Yang, M, Wen, H, & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal Food Drug analysis*, 10: 178-182.
- [17] Hong, F, Zhou, J, Liu, C, Yang, F, Wu, C, Zheng, L, & Yang, P. (2005). Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological trace element research*, 105(1-3), 269-279.
- [18] Yang, F, & Hong, S. (2006). Influence of nano anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110: 179-190.
- [19] Gupta, S.M, & Tripathi, M. (2011). A review of TiO₂ nanoparticles, *Chin. Sci. Bull*, 56, 1639-1657.
- [20] Qi, M, Liu, Y, & Li, T. (2013). Nano-TiO₂ Improve the Photosynthesis of Tomato Leaves, *Biological trace element research*, 156: 323-328.
- [21] Ze, Y, Liu, C, Wang, L, Hong, M, & Hong, F. (2011). The regulation of TiO₂ nanoparticles on the expression of light-harvesting complex II and photosynthesis of chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Biological Trace Element Research*, 143: 1131-1141.
- [22] Kiss, F, Deak, G, Feher, M, Balo, G, H, A, Szabolsci, L, & Pais, I. (1985). The effect of titanium and gallium in photosynthetic rate of algae. *Journal of Plant Nutrition*, 8, 825-832.
- [23] Song, U, Jun, H, Waldman, B, Roh, J, Kim, Y, i, & Lee, E. J. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93 (1): 60-67.
- (2010). Nano particulate material delivery to plants, *Plant Science*, 179: 154-163.
- [4] Reynolds, G.H. (2002). Forward to the Future Nanotechnology and Regulatory Policy, *Pacific Research Institute*, 20p.
- [5] Sungkaworn, T, Triampo, W, Nalakarn, P, Triampo, D, Tang, I.M, & Lenbury, Y. (2007). The effects of TiO₂ nanoparticles on tumor cell colonies: fractal dimension and morphological properties, *International Journal of Biomedical Science*, 2(1):67-74.
- [6] Bollella, P, Schulz, C, Favero, G, Mazzei, F, Ludwig R, & Gorton, L. (2017). Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor *Electroanalysis*, Vol. 29, No. 1, p. 77-86.
- [7] Duffy, E.F, Touati, F.A, & Kehoe, S.C. (2004) A novel TiO₂-assisted solar photocatalytic batch process disinfection reactor for the treatment of biological and chemical contaminants in domestic drinking water in development countries, *Sol. Energy*, 77, 649-655.
- [8] Gao, F, Chao, I, Zheng, L, Mingyu, S, Xiao, W, Yang, F, Cheng, W, Ping, Y. (2006). Mechanism of nano anatase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach, *Biological Trace Element Research*, 111 .239-245.
- [9] Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*, *Plant physiology*, 24: 1-15.
- [10] Mita S, Murano, N, Akaike, M, & 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 are inducible by sugars, *Plant Journal*, 11: 841-851.
- [11] Luck, H. (1974). In: *Methods in Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.) p885. *Academic press. New York*.
- [12] Tang, W, & Newton, J.R. (2005). Polyamines reduced salt induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine, *Journal of Plant Growth Regulation*, 46: 31-43.
- [13] Miliauskas, G, Yenkutonis, P, R,

- [29] Elfeky, A,S, Mohammed, M,A, Khater, M,S, &Osman, Y,A,H. (2013). Effect of magnetite nanofertilizer on growth and yield of *Ocimum basilicum* L. *International Journal of Indigenous Medical Plants*, 46(3): 1286-1293.
- [30] Castiglione, M,R,, Giorgetti, L, Geri, C, &Cremonini, R. (2011). The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of roottip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L., *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 2443-2449.
- [31] Ma, X, Geiser-Lee, J, Deng, Y, & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineerednanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity,uptake and accumulation, *Science of the total environment*, 408,3053-3061.
- [32] Alcaraz, C, Botia, M, Carlos, F, & Fernando, R.(2004). Effect of foliar sprays containing calcium, magnesium and titanium on peach (*Prunus persica* L.) fruit qulity. *Journal of the Science of Food andAgriculture*, 949-954.
- [24] Martínez-Sánchez, F,M, Nunez, A, Amoros, J, & Gimenez, C,F. (2010). Effect of titanium leaf spray treatments on ascorbic acid levels of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal Plant Nutrition*. 16(5), 975-981.
- [25] Morteza, E., Moaveni, P., Farahani, H. A., & Kiyani, M. 2013. Study of photosynthetic pigments changes of maize (*Zea mays* L.) under nano TiO₂ spraying at various growth stages. *SpringerPlus*, 2(1): 247.
- [26] Feizi, H, Moghaddam, P,R, Shahtahmassebi, N, & Fotovat, A. (2012). Impact of bulk and nanosizetitanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germinationand seedling growth. *Biological Trace ElementResearch*, 146,101-106.
- [27] Saber, S,Z, Ghasimi, Hagh, & Mostafavi, S,h. (2014). Effect of Titanium Nano Mechanism on Physiological Processes of Spinach (*Spinacia oleracea*). The 2nd National Conference on Sustainable Agriculture and Environment, 16pp.Hamedan, Iran. (In Persian).
- [28] Salama, H. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.), *Int Res J Biotech*, 3(10), 190-7.

The effect of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) on photosynthetic pigments and some biochemical and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L.

Gholami, A. ¹, Abbaspour, H. ², Gerami, M. ³, Hashemi-Moghaddam, H. ^{4*}

1. Ph.D. graduate, Department of Biology, Faculty of Biological Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2. Associate professor, Department of Biology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistance professor, Department of Biology, Faculty of Biological Science, San University, Sari, Iran
4. Associate professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

(Received: 2018/11/29 Accepted: 2020/06/29)

The use of nanotechnology can create new important applications in various fields of agricultural resulting in improvement of plant yield, and increase of growth and photosynthesis. Using this technology, the techniques in product management can be improved. The absorption rate of nanoparticles varies in plants, depending on type of plant, chemical composition and size of particles. Nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂) are widely used in agricultural industries to enhance plant growth properties. In this case, the aim of this study was to study the effect of titanium dioxide nanoparticles on photosynthetic pigments and some biochemical properties and antioxidant enzymes of *Rosmarinus officinalis* L. This research was carried out in a completely randomized design with three replications in the greenhouse of Sana Institute of Higher Education of Sari in 2017-2018. Different concentrations of titanium nanoparticles in seven levels (0, 20, 40, 80, 100, 200 and 400 ppm) were sprayed onto rosemary plants in three stages with a one-hour interval. The results showed that the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids were increased by increasing the concentration of titanium nanoparticles, since the highest total chlorophyll content and carotenoids were related to 200 ppm nanoparticle titanium concentration. Also, the effect of titanium nanoparticle on the amount of soluble sugar indicated that by increasing the concentration of titanium nanoparticles as 100, 200 and 400 ppm nanoparticles, there was an increasing trend in this trait. In addition, there was a significant increase in the amount of antioxidant enzymes studied in high concentration of titanium nanoparticles (80, 100, 200 and 400 ppm). Generally, the application of different concentrations of titanium nanoparticles affected some of the antioxidant and biochemical properties of rosemary plants, so that in high concentrations of this nanoparticle, the most increase was observed in comparison with the control sample.

Keyword: Nanotechnology, Titanium nanoparticle, Rosemary plant, Photosynthetic pigments

* Corresponding Author E-Mail Address: hashemimoghaddam@yahoo.com