

پاسخ‌های رشدی، آناتومیکی و بیوشیمیایی گیاه اسفناج به تیمار نانوذرات اکسید روی

هانیه محجل شجاع^{۱*}، وحیده آژیر^۱، الهام محجل کاظمی^۲، الهام لامی زاده^۳، مهدی نورزاده حداد^۲

۱. گروه علوم گیاهی، سلولی و مولکولی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز ایران
 ۲. پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران
 ۳. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- * مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohajelh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۰

DOI: [10.30470/jsp.2025.735507](https://doi.org/10.30470/jsp.2025.735507)

چکیده

گسترش روزافزون کاربرد نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) در کشاورزی مدرن، با وجود مزایای عملکردی، نگرانی‌هایی جدی پیرامون سمیت سلولی و پیامدهای زیست‌محیطی آن‌ها ایجاد کرده است. پژوهش حاضر با هدف واکاوی دقیق برهم‌کنش‌های این نانوذرات با گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) و ارزیابی پاسخ‌های چندجانبه گیاه طراحی گردید. بدین منظور، پس از سنتز و مشخصه‌یابی دقیق نانوذرات با بهره‌گیری از تکنیک‌های پیشرفته XRD، TEM، FT-IR، تأثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر شاخص‌های مورفولوژیکی (وزن و طول اندام‌ها)، ویژگی‌های تشریحی (ضخامت دیواره سلولی و ساختار آوندی) و پارامترهای بیوشیمیایی (رنگدانه‌های فتوسنتزی، متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها حاکی از رفتار دوگانه و وابسته به دوز نانوذرات بود؛ به‌طوری‌که غلظت‌های پایین محرک رشد بوده، اما سطوح بالا با القای تنش اکسیداتیو، منجر به فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه شامل ضخیم‌شدن دیواره‌های سلولی و ارتقای فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گردید. این مطالعه با ارائه شواهد علمی از نحوه سازگاری آناتومیکی و بیوشیمیایی اسفناج، الگویی کارآمد جهت بهینه‌سازی مصرف نانوکودها، مدیریت ریسک سمیت و توسعه کشاورزی پایدار و ایمن فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مورفولوژی، نانوتکنولوژی در کشاورزی، نانوذرات اکسید روی

Growth, anatomical and biochemical responses of spinach plants to zinc oxide nanoparticles treatment

H. Mohajjel-Shoja^{1*}, V. Ajir¹, E. Mohajel Kazemi², E. Lamizadeh³, M. Nourzadeh Hadad²,

1. Department of Plant, Cell and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Karaj, Iran

3. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

*Corresponding Author, Email: mohajelh@yahoo.com

Received: August 20225 Accepted: February 2026

DOI: [10.30470/jsp.2025.735507](https://doi.org/10.30470/jsp.2025.735507)

Abstract

The widespread application of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) in modern agriculture, despite their functional benefits, has raised serious concerns regarding cytotoxicity and environmental implications. The current study was designed to rigorously investigate the interactions of these nanoparticles with spinach (*Spinacia oleracea L.*) and to evaluate the plant's multifaceted responses. To this end, following the synthesis and precise characterization of the nanoparticles utilizing advanced TEM, XRD, and FT-IR techniques, the effects of various concentrations (0, 35, 75, and 150 mg/L) on morphological indices (organ weight and length), anatomical features (cell wall thickness and vascular structure), and biochemical parameters (photosynthetic pigments, secondary metabolites, and antioxidant enzymes) were assessed. The findings revealed a dual, dose-dependent behavior of the nanoparticles; low concentrations stimulated growth, whereas high levels induced oxidative stress, triggering the activation of plant defense mechanisms, including cell wall thickening and the enhancement of antioxidant system activity. By providing scientific evidence regarding the anatomical and biochemical adaptation mechanisms of spinach, this study offers a valuable framework for optimizing nano-fertilizer application, managing toxicity risks, and fostering the development of safe and sustainable agriculture.

Keywords: antioxidant enzymes, morphology, nanotechnology in agriculture, zinc oxide nanoparticles.

مقدمه

پیشین حاکی از اثرات دوگانه نانوذرات اکسید روی بر گیاهان است؛ بدین معنا که این نانوذرات در غلظت‌های پایین با تحریک هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین و جیبرلین، موجب بهبود شاخص‌های رشد و بهره‌وری می‌شوند، حال آنکه در غلظت‌های بالا با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای تنش اکسیداتیو، به ساختارهای سلولی، مکانیسم‌های فتوسنتزی و متابولیسم گیاه آسیب می‌رسانند (Tripathi et al., 2010; Pandey et al., 2011). شایان ذکر است که شدت و نوع این اثرات به متغیرهایی همچون اندازه نانوذرات، غلظت، روش کاربرد (مانند محلول‌پاشی برگ یا کاربرد خاکی) و گونه گیاهی وابسته است (Raliya et al., 2015). پژوهش‌های متعددی اثرات متنوع نانوذرات اکسید روی را بر گیاهان مختلف مورد واکاوی قرار داده‌اند. به‌عنوان مثال، در گیاه گندم گزارش شده است که کاربرد غلظت‌های پایین نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش غلظت کلروفیل و بهبود رشد رویشی می‌گردد، درحالی‌که غلظت‌های بالا سبب کاهش رشد و تخریب غشاهای سلولی شده است (Amirjani et al., 2016). همچنین در گیاه نخود، اگرچه محلول‌پاشی سولفات روی موجب بهبود رشد و عملکرد شد، اما اثرات نانوذرات به دلیل ابعاد کوچک‌تر و نفوذپذیری بالاتر، پیچیدگی‌های بیشتری را نشان داد (Dadkhah et al., 2014). در خصوص گیاه اسفناج، تحقیقات محدودی پیرامون اثرات نانوذرات اکسید روی انجام شده است، با این حال شواهد موجود بیانگر آن است که این گیاه به واسطه سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کارآمد خود، قادر به پاسخگویی در برابر تنش‌های ناشی از نانوذرات می‌باشد (Aly et al., 2023). این مکانیسم‌های دفاعی شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و همچنین بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مانند فنول‌ها و فلاونوئیدها است که نقش حیاتی در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن ایفا

نانوتکنولوژی به‌عنوان یکی از فناوری‌های پیشرو در قرن بیست و یکم، با قابلیت کنترل و مهندسی مواد در مقیاس نانومتری (۱ تا ۱۰۰ نانومتر)، تحولات شگرفی را در حوزه‌های گوناگون از جمله کشاورزی، پزشکی، محیط‌زیست و صنعت رقم زده است (Feyzi et al., 2020). در این میان، نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد نظیر پایداری شیمیایی بالا، فعالیت فتوکاتالیستی و خواص ضد میکروبی، در مصارف کشاورزی به‌منظور بهبود جذب عناصر غذایی، افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی و تولید محصولات با ارزش افزوده بالا، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند (Laware and Raskar, 2014; Casa et al., 2016). با این وجود، ورود گسترده این نانوذرات به محیط‌زیست از طریق پساب‌های صنعتی، کشاورزی و محصولات مصرفی، نگرانی‌هایی را پیرامون پیامدهای زیست‌محیطی و سمیت احتمالی آن‌ها برای موجودات زنده، به‌ویژه گیاهان، برانگیخته است (Lv et al., 2019). گیاهان به‌عنوان تولیدکنندگان اولیه در زنجیره غذایی و اجزای کلیدی زیست‌بوم‌ها، در تعامل مستقیم با نانوذرات موجود در خاک، آب و هوا قرار دارند؛ تعاملی که می‌تواند تأثیرات مثبت یا منفی بر رشد، فیزیولوژی و متابولیسم آن‌ها بر جای گذارد (Ma et al., 2010).

گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) متعلق به تیره تاج‌خروسیان (*Amaranthaceae*)، به دلیل دارا بودن ارزش غذایی بالا و غنی بودن از ویتامین‌های A، C و K، عناصر معدنی (نظیر آهن و منیزیم) و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، یکی از مهم‌ترین سبزیجات برگی در رژیم غذایی انسان محسوب می‌شود (Alia et al., 2015). این گیاه به دلیل کشت وسیع در اراضی حاشیه شهرها، که بعضاً آلوده به آلاینده‌های محیطی نظیر فلزات سنگین یا نانوذرات هستند، به‌شدت در معرض تنش‌های زیست‌محیطی قرار دارد (Noor et al., 2023). مطالعات

پارامترهای بیوشیمیایی (غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی، سطح متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) در گیاه اسفناج مورد واکاوی قرار گرفت. انتظار می‌رود نتایج حاصل از این پژوهش، ضمن ارائه درکی عمیق از مکانیسم‌های تعامل میان نانوذرات و گیاه اسفناج، داده‌های بنیادینی را برای توسعه کاربردهای ایمن و بهینه فناوری نانو در کشاورزی پایدار و کاهش مخاطرات زیست‌محیطی احتمالی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

بذرهای گیاه اسفناج از یک تأمین‌کننده معتبر تجاری (شرکت پاکان بذر اصفهان) تهیه شدند تا از کیفیت و یکنواختی ژنتیکی آن‌ها اطمینان حاصل شود. برای جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی و قارچی، بذرها ابتدا با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت پنج دقیقه استریل شدند. پس از استریل‌سازی، بذرها چندین بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند تا مواد شیمیایی باقی‌مانده حذف شوند. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتی‌متر و عمق ۲۰ سانتی‌متر کاشته شدند که حاوی مخلوط خاک و ورمی‌کولیت (نسبت ۱:۱) بودند. این نسبت به‌منظور ایجاد بستر یکنواخت با تهویه مناسب، ظرفیت نگهداری رطوبت بالا و حداقل برهم‌کنش شیمیایی با نانوذرات انتخاب شد. استفاده از ورمی‌کولیت باعث کاهش تنوع فیزیکی بستر و افزایش قابلیت تکرارپذیری آزمایش می‌شود. pH بستر کشت 6.8 ± 0.2 و هدایت الکتریکی آن $1/1 \text{ dS m}^{-1}$ بود که در محدوده مناسب برای رشد اسفناج قرار دارد. این مخلوط پیش از استفاده در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد تا از وجود عوامل بیماری‌زا جلوگیری شود. گیاهان در یک اتاق رشد کنترل‌شده با شرایط محیطی دقیق پرورش یافتند. دمای محیط روی 25 ± 2 درجه سلسیوس تنظیم شد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰ میکرومول

می‌کنند (Halliwell, 2006; Nakabayashi et al., 2014).

از منظر تشریحی (آناتومیکی)، نانوذرات قادر به ایجاد تغییراتی در ساختارهای گیاهی هستند. برای نمونه، افزایش ضخامت دیواره سلولی و تغییر در ساختار آوندهای گیاه توتون تحت تیمار با نانوذرات اکسید روی گزارش شده است که به‌عنوان مکانیسمی تدافعی جهت کاهش ورود نانوذرات به سیتوپلاسم عمل می‌کند (Mazaheri Tirani et al., 2019). این تغییرات ساختاری ممکن است با فعال‌سازی آنزیم‌های دخیل در سنتز لیگنین و در نتیجه تقویت دیواره‌های سلولی مرتبط باشد (Lin and Xing, 2007). از دیدگاه بیوشیمیایی نیز نانوذرات اکسید روی می‌توانند بر غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی، از جمله کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها که برای فرایند فتوسنتز حیاتی هستند، تأثیرگذار باشند (Lichtenthaler and Wellburn, 1983). افزون بر این، افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه نظیر فنول‌ها و آنتوسیانین‌ها به‌عنوان بخشی از پاسخ سازگاری گیاه به تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات گزارش شده است (Pandjaitan et al., 2005).

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی جامع و چندجانبه‌ی اثرات ناشی از نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) بر گیاه اسفناج طراحی گردید. در این راستا، ابتدا مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی نانوذرات با بهره‌گیری از تکنیک‌های تحلیلی پیشرفته شامل میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) جهت تعیین مورفولوژی و اندازه، پراش اشعه ایکس (XRD) به‌منظور تأیید ساختار بلوری و طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) برای شناسایی گروه‌های عاملی سطحی به انجام رسید. در ادامه، پیامدهای حاصل از اعمال غلظت‌های مختلف نانوذرات (صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر شاخص‌های مورفولوژیکی (وزن تر و طول اندام‌های هوایی و ریشه)، ویژگی‌های تشریحی (آناتومیکی) (ضخامت دیواره سلولی و ساختار بافت آوندی) و

محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ سانتی‌متر معکوس استفاده شد (Navarro et al., 2008).

نانوذرات سنتز شده در آب مقطر دوبار تقطیر معلق شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (فرکانس ۴۰ کیلوهرتز) سونیک شدند تا پراکنش یکنواخت و جلوگیری از تجمع ذرات تضمین شود. محلول‌های نانوذرات در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه شدند که بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شدند تا طیف وسیعی از اثرات محرک رشد تا سمیت احتمالی را پوشش دهند (Raliya et al., 2015).

طراحی آزمایش

گیاهان اسفناج در سن چهار هفته‌ای، زمانی که به مرحله رشد رویشی پایدار رسیده بودند، برای آزمایش انتخاب شدند. گیاهان به چهار گروه تقسیم شدند (هر گروه شامل ۲۰ گیاه) و با محلول‌های نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های ذکر شده تیمار شدند. تیمارها به دو روش اعمال شدند: (۱) محلول پاشی برگ، که محلول نانوذرات به طور یکنواخت روی برگ‌ها پاشیده شد تا جذب از طریق روزنه‌ها و کوتیکول بررسی شود، و (۲) آبیاری خاک، که محلول نانوذرات مستقیماً به خاک اطراف ریشه‌ها اضافه شد تا جذب ریشه‌ای مطالعه شود. هر تیمار هر پنج روز یکبار به مدت سه هفته (مجموعاً ۶ تیمار) اعمال شد. گروه شاهد با آب مقطر دوبار تقطیر به همان روش تیمار شد تا اثرات محیطی و مکانیکی فرآیند تیمار حذف شوند. گیاهان پس از ۴۵ روز از شروع آزمایش (در مرحله بلوغ رویشی) برداشت شدند. این زمان برای ارزیابی اثرات بلندمدت نانوذرات بر رشد و متابولیسم گیاه انتخاب شد. نمونه‌ها برای تحلیل‌های مورفولوژیکی، آناتومیکی و بیوشیمیایی جمع‌آوری و بلافاصله پردازش شدند تا از تخریب بافت‌ها و متابولیت‌ها جلوگیری شود.

اندازه‌گیری‌های مورفولوژیکی

بر مترمربع بر ثانیه تأمین شد. رطوبت نسبی محیط روی 5 ± 60 درصد حفظ شد تا شرایط بهینه برای رشد گیاه فراهم شود. آبیاری گیاهان هر سه روز یکبار با محلول غذایی هوگلند^۱ انجام شد که حاوی تمام عناصر غذایی ضروری برای رشد گیاه بود. این محلول با pH 6.5 تنظیم شد تا جذب بهینه مواد مغذی توسط گیاه تضمین شود.

تهیه و مشخصه‌یابی نانوذرات اکسید روی

نانوذرات اکسید روی (ZnO NPs) با استفاده از روش رسوب‌گذاری شیمیایی سنتز شدند که روشی استاندارد برای تولید نانوذرات با اندازه و مورفولوژی کنترل شده است (Casa et al., 2016). در این روش، محلول نیترات روی $(Zn(NO_3)_2)$ با یک عامل کاهنده مانند هیدروکسید سدیم (NaOH) در شرایط کنترل شده واکنش داد تا نانوذرات اکسید روی تشکیل شوند. پس از سنتز، نانوذرات شستشو داده شده و در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس کلسینه شدند تا خلوص و پایداری آن‌ها افزایش یابد. برای اطمینان از کیفیت و ویژگی‌های نانوذرات، مشخصه‌یابی جامع با استفاده از تکنیک‌های زیر انجام شد:

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): برای تعیین اندازه ذرات، توزیع اندازه و مورفولوژی نانوذرات استفاده شد. نمونه‌ها روی شبکه‌های مسی پوشش‌دار با کربن قرار گرفتند و با دستگاه TEM در ولتاژ ۲۰۰ کیلوولت بررسی شدند (Mazaheri Tirani et al., 2019). پراش اشعه ایکس (XRD): برای تأیید ساختار بلوری نانوذرات و شناسایی فاز وورتزیت اکسید روی از دستگاه پراش اشعه ایکس با اشعه Cu-K α استفاده شد. این تحلیل برای اطمینان از خلوص بلوری و عدم وجود ناخالصی‌های فازی انجام شد (Ma et al., 2010). طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری (FT-IR): برای شناسایی گروه‌های عاملی موجود روی سطح نانوذرات، مانند گروه‌های هیدروکسیل و کربونیل، که می‌توانند با بافت‌های گیاهی تعامل کنند، از دستگاه FT-IR در

¹ Hoagland's nutrient solution

مقاطع آماده‌شده با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40\times$ و $100\times$ بررسی شدند. پارامترهای آناتومیکی مانند ضخامت دیواره سلولی در بافت‌های کورتکس و آندودرم ریشه و ساقه و قطر آوندهای چوبی در بافت‌های آوندی اندازه‌گیری شدند. برای کمی‌سازی دقیق، تصاویر میکروسکوپی با نرم‌افزار ImageJ تحلیل شدند و داده‌ها به صورت میانگین انحراف استاندارد گزارش شدند.

تحلیل‌های بیوشیمیایی رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای ارزیابی تأثیر نانوذرات بر فتوسنتز، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها اندازه‌گیری شد. برگ‌های تازه (۰/۵ گرم) از هر گیاه جمع‌آوری و در استون ۸۰ درصد خرد شدند تا رنگدانه‌ها استخراج شوند. عصاره‌ها سانتریفیوژ شدند ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و جذب محلول در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر (کاروتنوئیدها) با استفاده از طیف‌سنج نوری (uv-vis) اندازه‌گیری شد. محاسبات انجام شده نیز بر اساس معادلات لیچنتالر و ولبرن (Lichtenthaler and Wellburn, 1983) صورت پذیرفت و نتایج به صورت میکروگرم بر میلی‌گرم وزن تر گزارش شدند.

متابولیت‌های ثانویه

برای بررسی پاسخ‌های دفاعی گیاه، غلظت متابولیت‌های ثانویه اندازه‌گیری شد:

فنول کل: با روش Folin-Ciocalteu اندازه‌گیری شد. نمونه‌های برگ (۰/۵ گرم) در متانول ۸۰ درصد استخراج شدند و با معرف Folin-Ciocalteu واکنش دادند. جذب در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج بر اساس استاندارد اسید گالیک (mg GAE/g) وزن تر گزارش شدند (Singleton et al., 1999).

فلانوئیدها: با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شدند. عصاره‌های متانولی با کلرید آلومینیوم ۲ درصد واکنش داده و جذب در ۴۱۵ نانومتر

برای ارزیابی اثرات نانوذرات بر رشد گیاه، پارامترهای مورفولوژیکی زیر اندازه‌گیری شدند:

وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه: گیاهان به دقت از خاک جدا شدند و ریشه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند تا خاک باقی‌مانده حذف شود. وزن تر اندام‌های هوایی (برگ‌ها و ساقه) و ریشه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

وزن تر کل گیاه: مجموع وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه‌ها برای هر گیاه محاسبه شد.

طول ساقه و ریشه: طول ساقه (از پایه گیاه تا نوک بلندترین برگ) و طول ریشه (از پایه ریشه تا نوک بلندترین ریشه) با استفاده از خط‌کش کالیبره با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

نسبت ریشه به ساقه: این نسبت با تقسیم وزن تر ریشه بر وزن تر اندام‌های هوایی محاسبه شد تا تعادل رشد بین بخش‌های زیرزمینی و هوایی گیاه ارزیابی شود. اندازه‌گیری‌ها طبق پروتکل‌های استاندارد (Jensen, 1962) انجام شد و برای هر گروه، میانگین داده‌ها از ۳۰ گیاه ثبت شد.

مطالعات آناتومیکی

برای بررسی تغییرات ساختاری ناشی از نانوذرات، نمونه‌های ریشه و ساقه از گیاهان برداشت‌شده جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها بلافاصله در محلول تثبیت‌کننده FAA (فرمالین ۱۰ درصد، اسید استیک ۵ درصد، اتانول ۵۰ درصد) به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند تا ساختارهای سلولی حفظ شوند. سپس نمونه‌ها از طریق سری اتانول (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) دهیدراته شدند و در پارافین مایع قالب‌گیری شدند. مقاطع عرضی نازک (۱۰ میکرومتر) با استفاده از میکروتوم چرخشی برش داده شدند و با رنگ‌های سافرانین (برای رنگ‌آمیزی دیواره‌های لیگنینی) و فست گرین (برای رنگ‌آمیزی بافت‌های غیرلیگنینی) رنگ‌آمیزی شدند (Jensen, 1962).

بین تیمارها انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون پس‌هوک توکی در سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ صورت گرفت. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند و نتایج به صورت میانگین انحراف استاندارد گزارش شدند. در جدول ۱، مشخصات دستگاه‌های به کار رفته در این پژوهش ارائه شده است.

نام دستگاه	مدل دستگاه
میکروسکوپ نوری	NOVEL
اسپکتروفوتومتر	Spekol 1500
هیتر- استایرر	IKA
اتوکلاو	کاوش آزما
آون	Memmert
آب مقطر گیری	DWJ
ترازوی دیجیتال	AND-GF200
سل یا کووت	شیشه‌ای، کوارتزی
سانتریفیوژ یخچال دار	Hettich
pH متر	Hanna

نتایج و بحث

مشخصه‌یابی نانوذرات اکسید روی

بررسی‌های انجام‌شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد که نانوذرات اکسید روی دارای اندازه‌ای بین ۲۰ تا ۳۰ نانومتر و مورفولوژی کروی هستند (شکل ۱). این اندازه و شکل ذرات، که برای نفوذپذیری و تعامل با بافت‌های گیاهی مناسب است، با استفاده از تصاویر با وضوح بالا تأیید شد. تحلیل پراش اشعه ایکس (XRD) ساختار بلوری و ورتزیت را برای نانوذرات تأیید کرد که نشان‌دهنده خلوص بالای نانوذرات و عدم وجود ناخالصی‌های فازی بود (شکل ۲). این ساختار بلوری با مطالعات قبلی همخوانی دارد و نشان‌دهنده پایداری ساختاری نانوذرات است. طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) حضور گروه‌های عاملی هیدروکسیل و کربونیل روی سطح نانوذرات را نشان داد. این گروه‌های عاملی می‌توانند با مولکول‌های زیستی در بافت‌های گیاهی تعامل کنند و بر جذب و اثرات بیولوژیکی نانوذرات تأثیر بگذارند. این ویژگی‌ها نشان‌دهنده کیفیت مناسب نانوذرات سنتز شده برای استفاده در آزمایش‌های گیاهی بودند (شکل ۳).

اندازه‌گیری شد. نتایج بر اساس استاندارد کوئرستین گزارش شدند (Meda et al., 2005).

آنتوسیانین‌ها: با روش استخراج در متانول اسیدی حاوی HCl ۱ درصد و اندازه‌گیری جذب در ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر انجام شد (Pandjaitan et al., 2005).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) اندازه‌گیری شد. بافت برگ تازه (۱ گرم) در بافر فسفات پتاسیم (pH 7.0)، ۵۰ میلی‌مولار (حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA و ۱ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) هموژنیزه شد. عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت آنزیم‌ها به روش‌های زیر اندازه‌گیری شد:

کاتالاز (CAT): با اندازه‌گیری کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر به دلیل تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) طبق روش چنس و مهلی (Chance and Mealy, 1955) صورت پذیرفت.

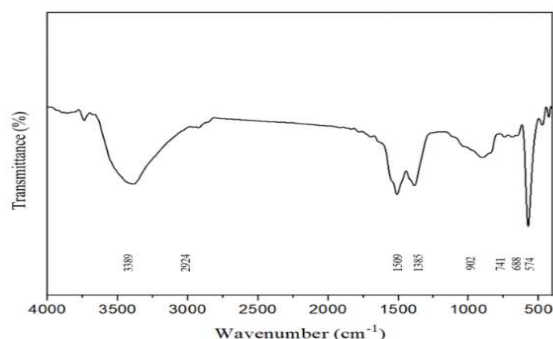
پراکسیداز (POD): با اندازه‌گیری افزایش جذب در ۴۷۰ نانومتر به دلیل اکسیداسیون گویاکول در حضور H_2O_2 طبق روش چنس و مهلی (Chance and Mealy, 1955) صورت پذیرفت.

آسکوربات پراکسیداز (APX): با اندازه‌گیری کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر به دلیل اکسیداسیون آسکوربات به روش (Nakano and Asada, 1981) انجام شد.

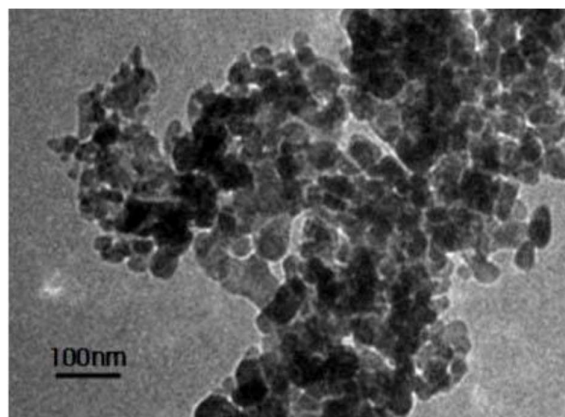
غلظت پروتئین کل عصاره‌ها با روش بردفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از استاندارد آلومین سرم گاوی (BSA) اندازه‌گیری شد تا فعالیت آنزیم‌ها به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شود.

تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از تمام آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تحلیل شدند. آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای بررسی تفاوت‌های معنی‌دار



شکل ۳- طیف FT-IR نانوذرات اکسیدروی



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از نانوذرات اکسید روی، ذرات کروی شکل و قطر ذرات ۳۰ تا ۴۰ نانومتر.

شکل ۲- الگوی XRD نانوذرات اکسید روی

اثرات مورفولوژیکی

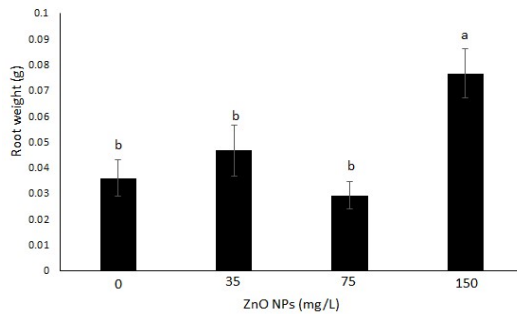
نیز کاهش یافت (شکل ۵)، که می‌تواند به اختلال در جذب مواد مغذی یا آسیب به بافت‌های ریشه‌ای به دلیل تجمع نانوذرات نسبت داده شود. این نتایج حاکی از ایجاد تنش اکسیداتیو یا عدم تعادل در متابولیسم مواد مغذی مانند رقابت روی با سایر عناصر مانند آهن است. جالب توجه است که در غلظت بالاتر (۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، گیاهان نشانه‌هایی از بهبود نسبی در پارامترهای رشدی نشان دادند. وزن تر اندام‌های هوایی (شکل ۴) و طول ساقه (شکل ۸) نسبت به غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت و به مقادیر نزدیک به گروه شاهد رسید. این بهبود نسبی حاکی از فعال شدن مکانیسم‌های سازگاری در گیاه است که احتمالاً با افزایش فعالیت سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی مرتبط است. این پاسخ سازگارانه نشان‌دهنده توانایی اسفناج برای تحمل تنش ناشی از غلظت‌های بالای نانوذرات است. درصد تغییرات مربوط به اثر تیمار نانوذرات اکسید روی بر شاخص‌های رشدی گیاه در جدول ۲ ارائه شده است.

تیمار گیاهان اسفناج با نانوذرات اکسید روی اثرات متفاوتی را بسته به غلظت نشان داد. در غلظت پایین (۳۵ میلی‌گرم بر لیتر)، بهبود قابل‌توجهی در پارامترهای رشدی مشاهده شد. وزن تر اندام‌های هوایی به طور چشمگیری افزایش یافت (شکل ۴) و طول ساقه نیز به طور قابل‌ملاحظه‌ای بیشتر از گروه شاهد بود (شکل ۸). همچنین، وزن تر ریشه‌ها در این غلظت به طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود (شکل ۵) که نشان‌دهنده تحریک رشد ریشه توسط نانوذرات در این سطح است. این بهبود در رشد احتمالاً به دلیل تأثیر مثبت نانوذرات بر فعالیت هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و جیبرلین است که فرآیندهای تقسیم و طویل شدن سلولی را تقویت می‌کنند. در مقابل، در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر، کاهش قابل‌توجهی در پارامترهای رشدی مشاهده شد. وزن تر اندام‌های هوایی (شکل ۴) و طول ساقه (شکل ۸) به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود، که نشان‌دهنده سمیت گیاهی ناشی از این غلظت است. وزن تر ریشه‌ها

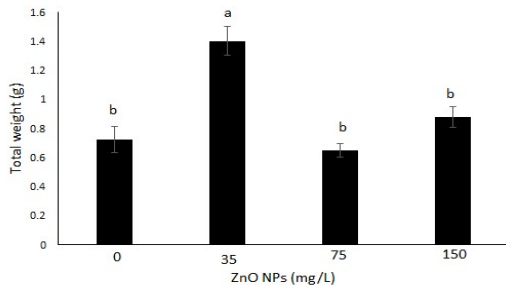
جدول ۲- درصد تغییرات مربوط به شاخص‌های رشدی گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز.

تیمار نانوذرات اکسیدروی (میلی‌گرم بر لیتر)	وزن تر		نسبت وزن تر ریشه به اندام هوایی	ارتفاع		نسبت طول ریشه به طول اندام هوایی
	اندام هوایی	ریشه		اندام هوایی	ریشه	
۳۵	۹۶	۱۶	-۳۰	۷۰	۲۶	-۲۵
۷۵	-۹	-۲۶	-۶	۲۱	۷۸	۴۷
۱۵۰	۱۶	۹۱	۸۶	۳۳	۹۰	۴۱

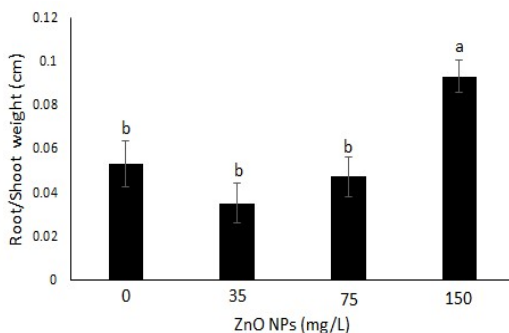
لیتر، قطر آوندها تا حدی بهبود یافت که نشان‌دهنده تلاش گیاه برای بازیابی تعادل ساختاری و عملکردی است.



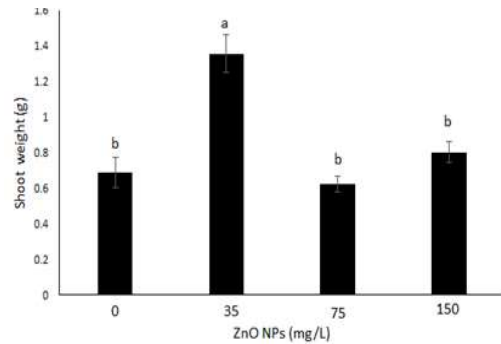
شکل ۵- تغییرات وزن تر ریشه در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۶- تغییرات وزن تر کل در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌ها صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۷- تغییرات نسبت وزن تر ریشه به اندام هوایی در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

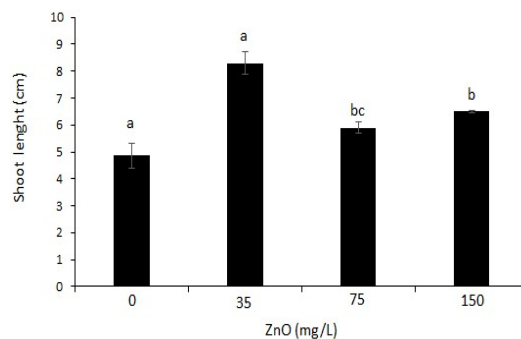
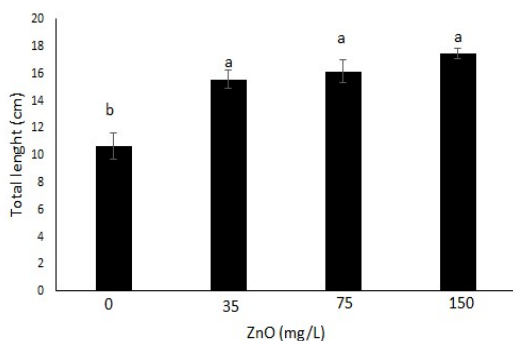


شکل ۴- تغییرات وزن تر اندام هوایی در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

تغییرات آناتومیکی

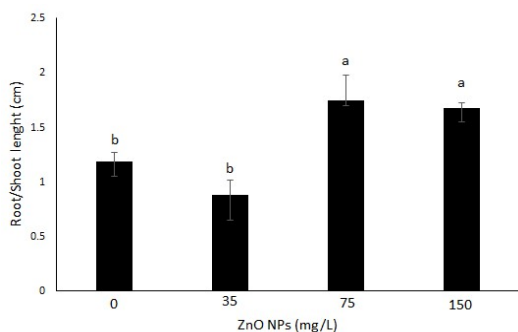
تحلیل‌های میکروسکوپی مقاطع عرضی ریشه (شکل ۱۳) و ساقه (شکل ۱۴) نشان‌دهنده تغییرات ساختاری معنی‌داری در پاسخ به تیمارهای نانوذرات بود. در غلظت‌های بالاتر، به‌ویژه ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، ضخامت دیواره سلولی در بافت‌های کورتکس و آندودرم ریشه و ساقه به طور قابل‌توجهی افزایش یافت. این افزایش ضخامت دیواره سلولی احتمالاً نتیجه فعال‌سازی آنزیم‌های سنتز لیگنین، مانند پراکسیداز، است که به تقویت دیواره‌های سلولی و کاهش نفوذ نانوذرات به داخل سلول‌ها کمک می‌کند. این تغییر ساختاری می‌تواند به عنوان یک مکانیزم دفاعی برای کاهش سمیت نانوذرات عمل کند.

در مورد ساختار آوندی، قطر آوندهای چوبی در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت که نشان‌دهنده بهبود ظرفیت انتقال آب و مواد مغذی در گیاه است. این امر می‌تواند به افزایش کارایی فتوسنتزی و رشد کلی گیاه در این غلظت کمک کرده باشد. با این حال، در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر، قطر آوندهای چوبی کاهش یافت که احتمالاً به دلیل تنش ناشی از تجمع نانوذرات و اختلال در رشد بافت‌های آوندی است. در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر

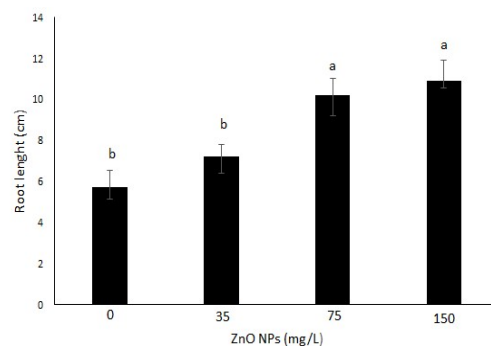


شکل ۸- تغییرات طول اندام هوایی در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

شکل ۱۱- تغییرات ارتفاع کل در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۱۲. تغییرات نسبت طول ریشه به طول اندام هوایی در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

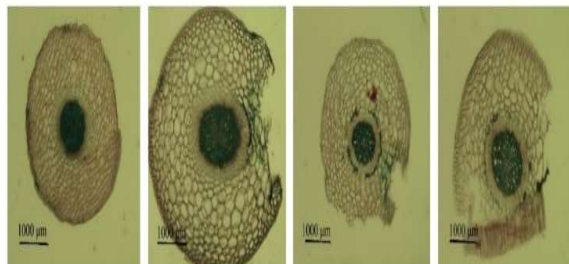


شکل ۹. تغییرات طول ریشه در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

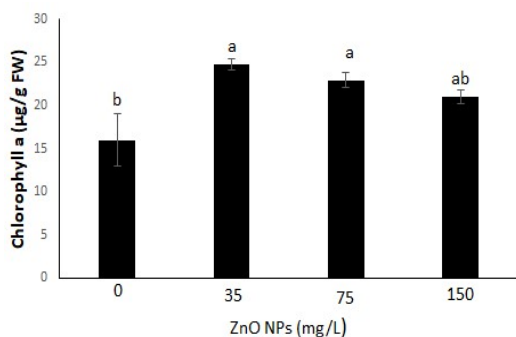
جدول ۲. تغییرات مربوط به شاخص‌های رشدی در گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



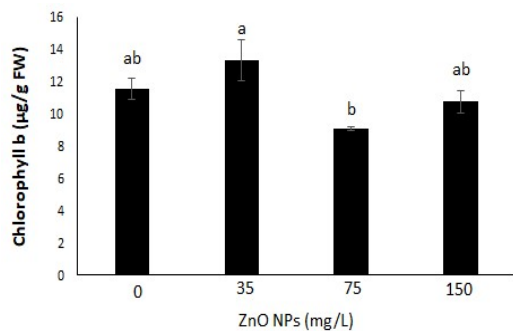
شکل ۱۰- ریشه گیاه اسفناج بعد از تیمار با نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های ۰، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز.



شکل ۱۳- برش عرضی ریشه گیاه اسفناج تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO NPs: بزرگنمایی ۴



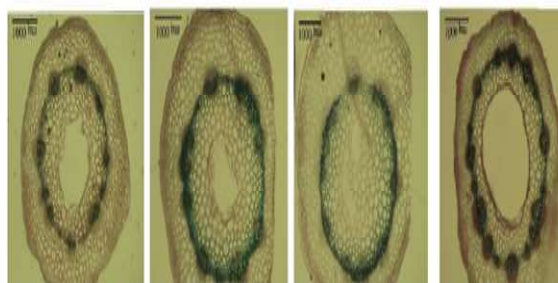
شکل ۱۵- تغییرات غلظت کلروفیل a در اندام هوایی گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۱۶- تغییرات غلظت کلروفیل b در اندام هوایی گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

متابولیت‌های ثانویه

غلظت متابولیت‌های ثانویه، که نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر تنش‌های محیطی دارند، تحت تأثیر تیمارهای نانوذرات قرار گرفت. در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت فنول کل به طور قابل‌توجهی افزایش یافت (شکل ۱۹). این افزایش نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیرهای بیوسنتزی فنولی برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات است. غلظت فلاونوئیدها (شکل ۱۸) و آنتوسیانین‌ها (شکل ۱۷) نیز در این غلظت به طور معنی‌داری بالاتر بود که نشان‌دهنده تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی است. این متابولیت‌ها به خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن کمک کرده و از



شکل ۱۴- برش عرضی ساقه گیاه اسفناج تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ZnO NPs : بزرگنمایی ۴

پاسخ‌های بیوشیمیایی رنگدانه‌های فتوسنتزی

تیمار با نانوذرات اکسید روی تأثیرات متفاوتی بر غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی داشت. در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت کلروفیل a به طور قابل‌توجهی افزایش یافت (شکل ۱۵) که نشان‌دهنده بهبود ظرفیت فتوسنتزی گیاه است. غلظت کلروفیل b (شکل ۱۶) و کلروفیل کل نیز در این غلظت افزایش یافت، که می‌تواند با افزایش تعداد کلروپلاست‌ها یا بهبود کارایی آن‌ها مرتبط باشد. غلظت کاروتنوئیدها نیز در این غلظت به طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود که نشان‌دهنده تقویت سیستم‌های محافظتی در برابر تنش نوری است. در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها کاهش یافت که نشان‌دهنده آسیب به دستگاه فتوسنتزی به دلیل تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع نانوذرات است. این کاهش می‌تواند نتیجه تخریب کلروپلاست‌ها یا اختلال در سنتز رنگدانه‌ها باشد. با این حال، در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، غلظت رنگدانه‌ها تا حدی بهبود یافت، هرچند به سطح گروه شاهد نرسید. این بهبود نسبی احتمالاً به دلیل فعال‌سازی مکانیزم‌های دفاعی گیاه، مانند افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها، است که به محافظت از کلروپلاست‌ها کمک می‌کند.

شکل ۱۹- تغییرات غلظت فنول کل در اندام هوایی گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

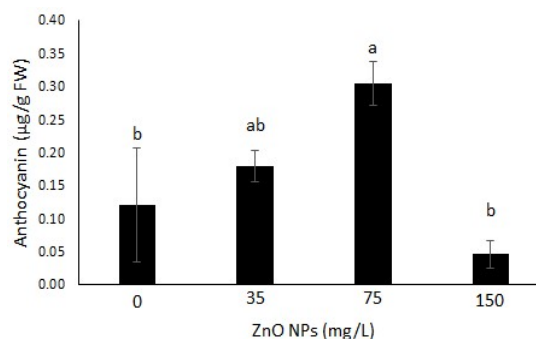
فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، که نقش کلیدی در خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن دارند، در پاسخ به تیمارهای نانوذرات به طور قابل‌توجهی تغییر کرد. در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) به بالاترین سطح خود رسید که نشان‌دهنده نقش مهم این آنزیم در تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و کاهش تنش اکسیداتیو است. به طور مشابه، فعالیت پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) نیز در این غلظت به طور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش فعالیت آنزیمی نشان‌دهنده پاسخ قوی گیاه به تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع نانوذرات است. در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت این آنزیم‌ها نیز افزایش یافت، اما به میزان کمتری نسبت به غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، که نشان‌دهنده تنش خفیف‌تر در این سطح است. در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت آنزیم‌ها نیز بالا بود، اما به دلیل سمیت بالاتر، این افزایش ممکن است برای جبران آسیب‌های سلولی کافی نبوده باشد.

بحث

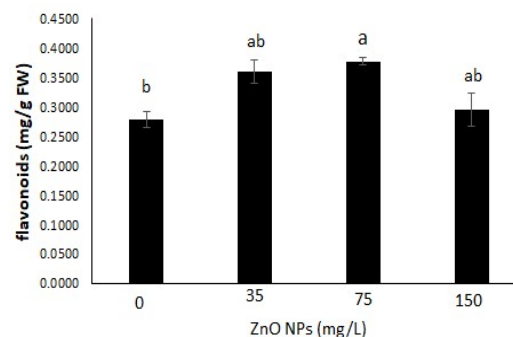
تأثیرات مورفولوژیکی

نتایج نشان‌دهنده اثرات دوگانه نانوذرات اکسید روی بر رشد اسفناج هستند. بهبود رشد در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر با مطالعات قبلی همخوانی دارد که نشان داده‌اند نانوذرات در غلظت‌های پایین می‌توانند با تحریک فعالیت هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و جبریلین، رشد را تقویت کنند (Pandey et al., 2010). کاهش رشد در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر احتمالاً نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و اختلال در متابولیسم مواد مغذی، مانند رقابت روی با آهن، است (Wang et al., 2009). بهبود نسبی در غلظت ۱۵۰

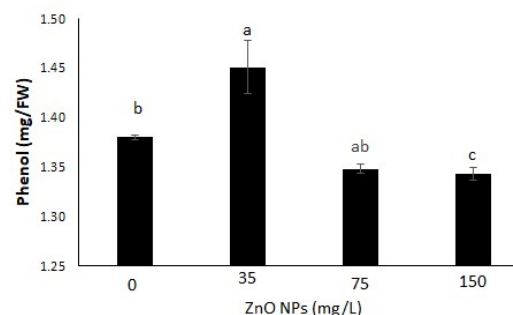
آسیب سلولی جلوگیری می‌کنند. در غلظت‌های پایین‌تر (۳۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر)، تغییرات در غلظت متابولیت‌های ثانویه کمتر بود، اما همچنان افزایش اندکی نسبت به شاهد مشاهده شد که نشان‌دهنده پاسخ دفاعی اولیه گیاه است.



شکل ۱۷- تغییرات غلظت آنتوسیانین در اندام هوایی گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



شکل ۱۸- تغییرات غلظت فلاونوئیدها در اندام هوایی گیاه اسفناج بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات اکسیدروی در غلظت‌های صفر، ۳۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲۱ روز. ستون‌ها میانگین سه تکرار بوده و بارهای عمودی نمایانگر انحراف معیار و حروف مختلف نشانگر تفاوت معنادار در سطح احتمال $p < 0.05$ بر اساس آزمون دانکن است.



این مطالعه نقش دوگانه نانوذرات اکسید روی را به عنوان محرک رشد در غلظت‌های پایین و عامل تنش‌زا در غلظت‌های بالا تأیید می‌کند. استفاده از غلظت‌های پایین می‌تواند برای بهبود بهره‌وری محصولات کشاورزی مفید باشد، اما غلظت‌های بالا نیازمند مدیریت دقیق برای جلوگیری از سمیت هستند. این یافته‌ها اهمیت تعیین آستانه‌های ایمن برای کاربرد نانوذرات در کشاورزی را برجسته می‌کند (Lv et al., 2019).

نتیجه‌گیری

ترکیب نانوذرات اکسیدروی می‌تواند سبب القاء اثرات مثبت و منفی بر روی شاخص‌های رشدی و دستگاه فتوسنتزی گیاه اسفناج گردد و این اثرات در غلظت‌های ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر به صورت مثبت مشاهده شد ولی در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر، میزان شاخص‌های رشدی نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت که احتمالاً به دلیل القاء اثرات سمی این ترکیبات بر گیاهان تیمار شده در غلظت‌های بالا است. اما با ادامه یافتن افزایش غلظت تیمارها، افزایش دوباره شاخص‌ها مشاهده گردید که می‌تواند به دلیل سازگاری و مقاومت گیاه اسفناج در برابر این ترکیبات باشد و این امر سبب شد حتی در غلظت بالای نانوذرات اکسیدروی، گیاه بتواند زنده مانده و به رشد خود ادامه دهد. علاوه بر این، افزایش قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاهان در تیمارهایی با غلظت بالا مشاهده شد. مطالعه صفات تشریحی و میکروسکوپی این گیاه توسط میکروسکوپ نوری، نیز حاکی از ایجاد تغییرات در ساختار بافت‌های ریشه و ساقه تحت تنش این ترکیبات بود.

میلی‌گرم بر لیتر نشان‌دهنده فعال‌سازی مکانیزم‌های سازگاری، مانند افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، است که به گیاه امکان می‌دهد تنش را تحمل کند (Raliya et al., 2015).

تغییرات آناتومیکی

افزایش ضخامت دیواره سلولی در ریشه و ساقه، به‌ویژه در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، به عنوان یک مکانیزم دفاعی برای کاهش نفوذ نانوذرات به سیتوپلاسم عمل می‌کند. این تغییر احتمالاً با فعال‌سازی آنزیم‌های سنتز لیگنین، مانند پراکسیداز، مرتبط است (Mazaheri Tirani et al., 2019). افزایش قطر آوندهای چوبی در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر نشان‌دهنده بهبود انتقال آب و مواد مغذی است که با افزایش رشد همخوانی دارد. کاهش قطر آوندها در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر احتمالاً نتیجه تنش و اختلال در رشد بافت‌های آوندی است (Lin and Xing, 2007).

پاسخ‌های بیوشیمیایی

افزایش غلظت کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر نشان‌دهنده بهبود کارایی فتوسنتزی است، در حالی که کاهش در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر نتیجه آسیب اکسیداتیو به کلروپلاست‌ها است (Lichtenthaler and Wellburn, 1983). افزایش متابولیت‌های ثانویه مانند فنول‌ها و فلاونوئیدها در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان‌دهنده فعال‌سازی مسیرهای دفاعی غیرآنزیمی برای خنثی‌سازی ROS است (Nakabayashi et al., 2014). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (APX, POD, CAT) نیز نقش کلیدی در کاهش تنش اکسیداتیو دارد (Halliwell, 2006).

پيامدها برای کشاورزی

REFERENCES

- Alia, N., Sardar, K., Said, M., Salma, K., Sadia, A., Sadaf, S., & Miklas, S. (2015). Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in a controlled environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 7400-7416.

- Aly, A. A., Safwat, G., Eliwa, N. E., Eltawil, A. H., & Abd El-Aziz, M. H. (2023). Changes in morphological traits, anatomical and molecular alterations caused by gamma-rays and zinc oxide nanoparticles in spinach (*Spinacia oleracea L.*) plant. *BioMetals*, 36(5), 1059-1079.
- Amirjani, M. R., Askari-Mehrabadi, M., & Azizmohammadi, M. (2016). Investigation of the effects of zinc oxide nanoparticles on vegetative traits, elemental content, and photosynthetic pigments of wheat plants. *Plant Biology Journal*, 8(27), 33-48. (In Persian)
- 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), 248-254.
- Casa, M., Sarno, M., Paciello, L., Beaumont, M. R., & Ciambelli, P. (2016). Synthesis and characterization of water stable ZnO quantum dots based-sensor for nitro-organic compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 47, 7-12.
- Chance, B., & Mealy, A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 11, 764-755
- Dadkhah, N., Ebadi, A., Parmoon, G., Ghlipoori, E., & Jahanbakhsh, S. (2014). Effect of spraying zinc on photosynthetic pigments and grain yield of chickpea under level different irrigation. *Iranian Dryland Agronomy Journal*, 3(2), 141-160. (In Persian)
- Feyzi, H., Azimi, R., & Kianian, M. K. (2020). Nano-technology research in agronomic, non-agronomic, medicinal, and ornamental plants. Torbat Heydariyeh University Press, pp. 1-3. (In Persian)
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Jensen, W. A. (1962). Botanical Histochemistry: Principles and practice, WH Freeman and Co.: San Francisco, CA, USA.
- Laware, S. L., & Raskar, S. (2014). Influence of zinc oxide nanoparticles on growth, flowering and seed productivity in onion. *International Journal of Current Microbiology Science*, 3(7), 874-881.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. 591-592.
- Lin, D., & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental pollution*, 150(2), 243-250.
- Lv, J., Christie, P., & Zhang, S. (2019). Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environmental Science: Nano*, 6(1), 41-59.
- Ma, M., Geiser-Lee, J., Deng, Y., & Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408: 3053-3061.
- Mazaheri Tirani, M., Madadkar Haghjou, M., & Ismaili, A. (2019). Hydroponic grown tobacco plants respond to zinc oxide nanoparticles and bulk exposures by morphological, physiological and anatomical adjustments. *Functional Plant Biology*, 46(4), 360-375.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*, 91(3), 571-577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>.
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., & Saito, K. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal*, 77(3), 367-379. <https://doi.org/10.1111/tpj.12388>.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., & Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372-386.
- Noor, R., Maqsood, A., Baig, A., Pande, C. B., Zahra, S. M., Saad, A., & Singh, S. K. (2023). A comprehensive review on water pollution, South Asia Region: Pakistan. *Urban Climate*, 48, 101413.
- Pandey, A. C., S. Sanjay, S., & S. Yadav, R. (2010). Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental nanoscience*, 5(6), 488-497.
- Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T., & Gil, M.I. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8618-8623.

- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W. N., & 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.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Tripathi, S., Sonkar, S. K., & Sarkar, S. (2011). Growth stimulation of gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, 3(3), 1176-1181.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., & Lin, Z. P. (2009). The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, 75(11), 1468-1476.