

Impact of titanium dioxide nanoparticles on biochemical characteristics across various developmental stages of *Aptenia cordifolia*

Pages
87-102

M. Bohli-Bohl¹, H. Mohajjel Shoja^{2*} and S. Behboudi³

1, 2 & 3) Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author : mohajelh@yahoo.com

Received date: 2024.09.28

Accepted date: 2025.01.19

Abstract

In recent years, titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs) have garnered significant attention due to their unique photocatalytic properties and broad applications in life sciences and agriculture. However, their impact on plant biochemical processes remains poorly understood. This study, conducted using a completely randomized design with three replications, evaluated the effects of varying concentrations of TiO₂-NPs (0, 0.03%, and 0.05%) on the biochemical parameters of the ice plant (*Aptenia cordifolia*) during its vegetative and reproductive stages. The parameters measured included anthocyanin, phenol, and flavonoid contents, catalase antioxidant enzyme activity, and soluble sugar levels. The results indicated that TiO₂-NPs exerted concentration-dependent and growth stage-specific effects. At both vegetative and reproductive stages, TiO₂-NPs at concentrations of 0.03% and 0.05% significantly increased anthocyanin levels compared to control plants. In the reproductive stage, phenol content decreased, with the most significant reduction observed at 0.03% TiO₂-NPs, while flavonoid content increased, reaching its highest level at 0.05%. These changes were not significant during the vegetative stage. Catalase enzyme activity decreased in both growth stages, while soluble sugar levels increased in the vegetative stage and decreased in the reproductive stage. These findings suggest that TiO₂-NPs have distinct effects on plant biochemical processes, indicating an adaptive response of the plant to nanoparticle-induced stress.

Keywords: Anthocyanin, Catalase, Flavonoid, Phenol and Soluble sugar.

بررسی تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر شاخص‌های بیوشیمیایی در مراحل مختلف تکوینی گل ناز یخی

شماره صفحات

۱۰۲-۸۷

معصومه بهلی بهل^۱، هانیه محجل شجاع^{۲*} و سمیرا بهبودی^۳

۱، ۲ و ۳) گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول: mohajelh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

چکیده

در سال‌های اخیر، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂-NPs) به دلیل خواص فتوکاتالیستی و کاربردهای گسترده در علوم زیستی و کشاورزی، مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند. با این حال، اثرات آن‌ها بر فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. مطالعه حاضر بر پایه یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به بررسی مقایسه‌ای تأثیر غلظت‌های مختلف TiO₂-NPs (۰، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد) بر شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه گل ناز یخی (*Aptenia cordifolia*) در دو مرحله رویشی و زایشی پرداخت و محتوای آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید، آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و قندهای محلول اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد تیمار TiO₂-NPs اثر وابسته به غلظت و وابسته به مرحله رشدی دارد. به طوری که در مرحله رویشی و زایشی، غلظت ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد موجب افزایش آنتوسیانین نسبت به گیاهان شاهد شد. میزان فنل در مرحله زایشی کاهش یافت که بیشترین کاهش در غلظت ۰/۰۳ درصد مشاهده شد اما فلاونوئید افزایش نشان داد که بیشترین افزایش در غلظت ۰/۰۵ درصد مشاهده شد و در مرحله رویشی این تغییرات معنادار نبودند. در هر دو مرحله رویشی و زایشی کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد. در مرحله رویشی افزایش و در مرحله زایشی کاهش قندهای محلول مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از TiO₂-NPs اثرات متفاوتی بر فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان داشته و بیانگر پاسخ سازشی گیاه به تنش نانوذرات است.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید، قند محلول و کاتالاز.

مقدمه

نانوذرات (NPs) با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به دلیل خواص منحصر به فرد مانند فعالیت ضدباکتریایی، مقاومت در برابر اکسیداسیون و هدایت حرارتی بالا، در سال‌های اخیر مورد توجه گسترده‌ای قرار گرفته‌اند (Klaine *et al.*, 2008; Hasan, 2015). با این حال، نگرانی‌هایی در مورد اثرات سمی و مخاطرات احتمالی آن‌ها بر سلامت انسان و محیط زیست وجود دارد، زیرا ممکن است در طی فرآیندهای تولید، استفاده و دفع در محیط منتشر شده و در هوا، خاک، آب و سیستم‌های بیولوژیکی باقی بمانند (Roy *et al.*, 2014). نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO₂-NPs) از پرمصرف‌ترین و پرتولیدترین نانوذرات فلزی در جهان هستند که سالانه تا ۲ میلیون تن در جهان تولید می‌شوند (Larue *et al.*, 2011). این نانوذرات به دلیل پایداری نوری بالا، فعالیت فتوکاتالیستی قوی، دسترسی آسان و هزینه مقرون به صرفه، در صنایع مختلف از جمله لوازم آرایشی (مانند ضدآفتاب)، پزشکی (مانند داروهای ضد سرطان)، محصولات خانگی، پوشش سطح (مانند رنگ و جوهر چاپ)، حسگرهای گاز، پنل‌های خورشیدی، دیوذهای ساطع کننده نور، آینه‌های ضد مه و وسایل نقلیه کاربرد گسترده‌ای دارند (De Filpo *et al.*, 2015; Kim, 2013; Shi *et al.*, 2011; Macwan *et al.*, 2013). مطالعات نشان داده‌اند که TiO₂-NPs می‌توانند تأثیرات متفاوتی بر گیاهان داشته باشند که این اثرات به ویژگی‌های نانوذره (اندازه، غلظت، زمان مواجهه و غیره)، گونه گیاهی و مرحله رشد بستگی دارد (Dağhan, 2018). برخی تحقیقات حاکی از آن هستند که این نانوذرات موجب افزایش رشد گیاه، بهبود فتوسنتز، جذب مواد مغذی و بهبود مورفولوژی محصول می‌شوند (Ko and Hwang, 2019; Lyu *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2020). همچنین، TiO₂-NPs در اصلاح محیطی کاربرد دارند، زیرا می‌توانند آلاینده‌ها را جذب کرده و فاضلاب را تصفیه کنند (Farahi, 2023). کاربرد این نانوذرات در گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana*) نشان داد غلظت بالاتر نانوذرات محتوای کلروفیل برگ‌ها، فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز را افزایش داد (Rezaizad *et al.*, 2021). در گیاه بادرنجبویه (*Moldavica Dracocephalum*) تحت تنش شوری، همه صفات زراعی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید (Gohari *et al.*, 2020). در گیاه جینسینگ (*Panax ginseng*) نیز اثر قابل توجه این نانوذرات بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو گزارش شده است (Yang *et al.*, 2024). در مقابل، برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که غلظت بالای TiO₂-NPs می‌تواند اثرات سمی از جمله افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تخریب کلروفیل، سمیت سلولی، آسیب به دیواره سلولی و پراکسیداسیون لیپیدی ایجاد کند که این اثرات وابسته به سطح و مدت زمان مواجهه هستند (Gohari *et al.*, 2020). سمیت این نانوذرات در گیاهانی مانند پیاز، تنباکو و گندم نیز گزارش شده است (Santos *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019). بیشتر این مطالعات در شرایط هیدروپونیک انجام شده‌اند و بررسی‌های محدودی در شرایط خاک صورت گرفته است. همچنین محلول‌پاشی نانوذرات نسبت به اعمال از طریق خاک، در جذب نانوذرات در گیاهان مؤثرتر است (Raliya *et al.*, 2015). گیاهان نقش مهمی در سرنوشت و انتقال NPs در اکوسیستم دارند (Song

(*et al.*, 2012). گیاه گل ناز یخی (*Aptenia cordifolia* L.) که متعلق به تیره Aizoaceae و راسته Caryophyllales است، به دلیل رشد سریع، زیبایی و کاربردهای دارویی، یکی از گیاهان زینتی و دارویی پرکاربرد در ایران محسوب می‌شود (*Cela et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2009). با توجه به اینکه این گیاه در فضای سبز و به‌عنوان گیاه دارویی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، احتمال مواجهه آن با TiO_2 -NPs زیاد است. در مطالعه پیشین، ویژگی‌های مورفولوژیکی، تشریحی و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه گل ناز یخی در شرایط هیدروپونیک مورد ارزیابی قرار گرفتند (*Mohajjel Shoja et al.*, 2021). تحقیق پیش رو مصمم است به مطالعه مقایسه‌ای تأثیر غلظت‌های مختلف این نانوذرات در مراحل رشد رویشی و زایشی بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی (آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید، کاتالاز، قند محلول) به شیوه‌ی محلول‌پاشی از طریق برگ بپردازد.

مواد و روش‌ها

مکان و زمان پژوهش: این پژوهش به مدت ۶۳ روز در شرایط آزمایشگاهی در دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز انجام

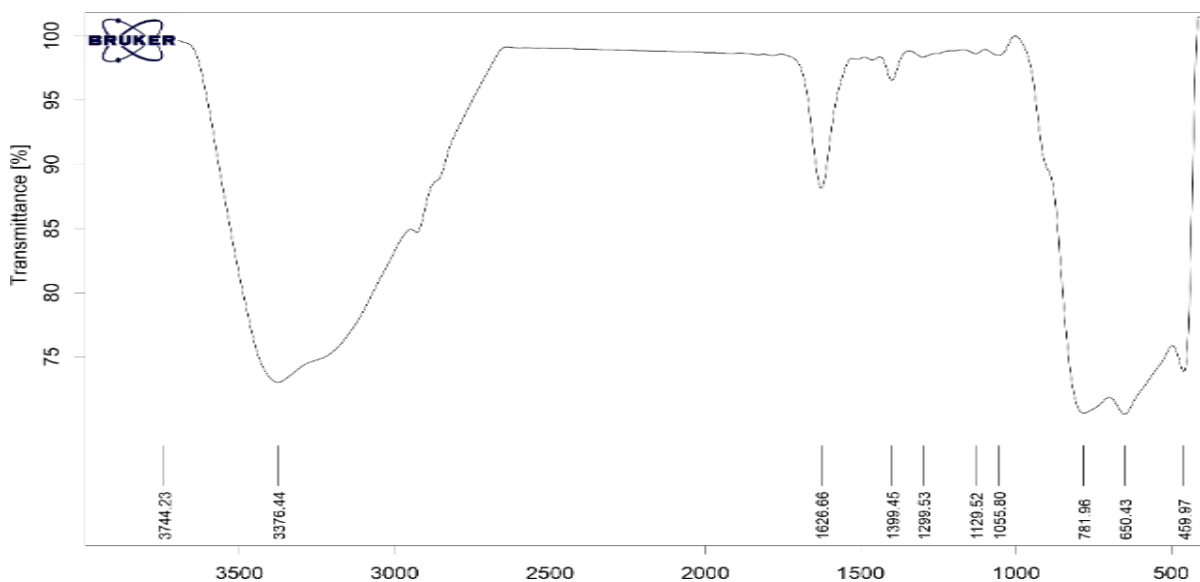
پذیرفت.

روش تهیه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم: TiO_2 -NPs از شرکت بازرگانی نوترینو به مقدار ۲۵ گرم تهیه شد. به منظور

بررسی مکانیسم واکنش، آنالیز FTIR در آزمایشگاه خدماتی دانشکده شیمی دانشگاه تبریز با استفاده از دستگاه FT-IR مدل

TENSOR 27 ساخت کشور آلمان، (کمپانی Bruker) انجام شد (شکل ۱). همچنین مشخصات TiO_2 -NPs مورد استفاده در

جدول ۱ آمده‌است.



شکل ۱. الگوی FTIR تهیه شده از TiO_2 -NPs

Fig 1. FTIR pattern prepared from TiO_2 -NPs

جدول ۱. مشخصات نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مصرف شده

Table 1. characteristics of the TiO₂-NPs used

TiO ₂ -NPs وضعیت ظاهری Appearance of TiO ₂ -NPs	درصد خلوص (cm ³ g ⁻¹) Purity (cm ³ g ⁻¹)	سطح ویژه (m ² /g) Surface area of total porosity volume (m ² /g)	اندازه متوسط نانوذره (nm) (Average particle size nm)
پودر سفید White powder	99.9%	>200	30

کشت گیاهان و شیوه محلول پاشی: بذر گل نازیخی از موسسه پاکان بذر اصفهان تهیه شد. دانه‌های گیاه به گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۱ سانتی‌متر و ارتفاع ۷ سانتی‌متر که حاوی خاک با ترکیبات کوکوپیت، پرلیت و پیت ماس بودند منتقل شدند. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله ۸ برگی اعمال تیمار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در یک طرح کاملاً تصادفی در سه غلظت (۰، ۰/۰۳، ۰/۰۵ درصد) و سه تکرار هر سه روز یک بار بر سطح رویی و پشتی برگ‌ها اسپری شد. در محلول پاشی گیاهان شاهد از اسپری آب مقطر استفاده شد. آبیاری در حد ظرفیت مزرعه‌ای هر روز یک بار انجام شد. مطالعات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بعد از گذشت ۲۱ روز پس از اعمال تیمار در مرحله رویشی و ۶۳ روز پس از اعمال تیمار در مرحله زایشی انجام گرفت.

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین: محتوای آنتوسیانین به روش Mancinelli *et al.*, (1990) اندازه‌گیری شد. مقدار ۰/۱ گرم از بافت تازه گیاهی با ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد سابیده و ۴۸ ساعت در تاریکی در یخچال نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و جذب فاز رویی در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر نسبت به شاهد (متانول ۸۰ درصد) اندازه‌گیری شد. غلظت آنتوسیانین از رابطه ۱ محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

رابطه ۱: $A_{530} - (0.25 * A_{657})$

که در آن A₅₃₀: جذب در طول موج ۵۳۰ A₆₅₇: جذب در طول موج ۶۵۷

اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید کل، مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی با ۲ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد سابیده و ۴۸ ساعت در تاریکی در یخچال نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه‌ای در ۱۰۰۰۰ دور، فاز رویی برای سنجش استفاده شد. برای اندازه‌گیری فنل کل ۱۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین مخلوط، ورتکس و ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب در ۷۲۰ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری و بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر بیان شد (Meda *et al.*, 2005). برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل ۵۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط، ورتکس و ۴۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب در ۴۱۵

نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری و بر اساس میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر بیان شد. از لوله آزمایش فاقد عصاره گیاهی به عنوان شاهد استفاده شد (Chang *et al.*, 2002).

تعیین فعالیت کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6): مقدار ۰/۱ گرم از برگ تازه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار و pH برابر با ۷ ساییده شد. سپس عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و فاز بالایی برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت کاتالاز با کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۱۹۵ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۱۰۰۰ میکرولیتر H_2O_2 و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. لوله فاقد H_2O_2 به عنوان شاهد استفاده شد. جذب هر ۳۰ ثانیه به مدت سه دقیقه با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با ضرب خاموشی $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ محاسبه و بر حسب $U \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ گزارش شد (Elavarthi *et al.*, 2010).

اندازه‌گیری میزان قند محلول: برای اندازه‌گیری میزان قند محلول، ۰/۰۵ گرم از بافت خشک پودر شده گیاه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد ساییده شد و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری گردید. پس از صاف کردن محلول با کاغذ صافی، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول صاف شده برداشته و حجم آن با آب مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد. بعد از ۳۰ دقیقه جذب محلول در ۴۸۵ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. لوله فاقد عصاره به عنوان شاهد استفاده شد و داده‌ها بر اساس میلی‌گرم قند محلول بر گرم وزن خشک گزارش گردید (Roberts *et al.*, 1959).

سنجش‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (METASH مدل UV-5100) اندازه‌گیری شد.

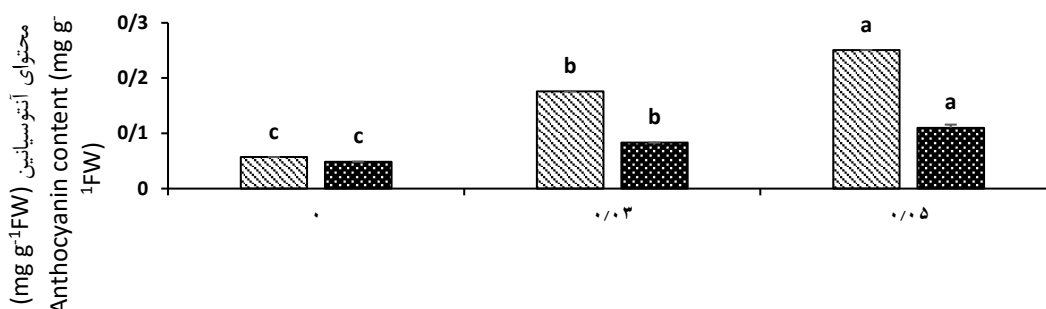
آنالیز آماری: آنالیز داده‌های آماری بر اساس طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال آماری $P < 0/05$ انجام گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار EXCEL رسم شدند.

نتایج و بحث

تاثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر مقدار آنتوسیانین گیاه گل ناز یخی

نتایج نشان داد که میزان آنتوسیانین در هر دو مرحله رویشی و زایشی بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0/01$) بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار ۰/۰۵ درصد به ترتیب با ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد، درحالی‌که کمترین میزان آن در گیاهان شاهد به ترتیب ۰/۰۵۷ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود. این یافته‌ها با مطالعات روی گیاهان مرزه (Davari *et al.*, 2018)، شنبلیله (Missaoui *et al.*, 2017) و زعفران (Rikabad *et al.*, 2019) مطابقت دارد. همچنین، مطالعه قبلی روی گل ناز یخی نیز افزایش آنتوسیانین تحت تیمار TiO_2 -NPs را نشان داده‌است (Mohajjel Shoja *et al.*, 2021). مطالعات نشان‌دهنده این است که آنتوسیانین‌ها نقش مهمی در برابر تنش‌های غیرزیستی از جمله

نورهای شدید، پرتوهای UV-B، دمای خیلی زیاد، تنش فلزات سنگین و تنش خشکی برای حفاظت سلولهای گیاهی دارند (Gould and Lister, 2006). آنتوسیانین، نوعی فلاونوئید واقع در سیستم واکوئلی و یکی از رایجترین آنتی اکسیدانهای غیرآنزیمی است و به عنوان یک جاذب رادیکال سوپراکسید، دهنده هیدروژن و شل کننده فلز عمل می کند (Mourato *et al.*, 2012). به عبارتی می توان گفت علت افزایش آنتوسیانینها تحت تاثیر تنش به دلیل نقش حفاظتی این رنگیزهها است که باعث محافظت کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری می گردد (Inze and Montagu, 2000).



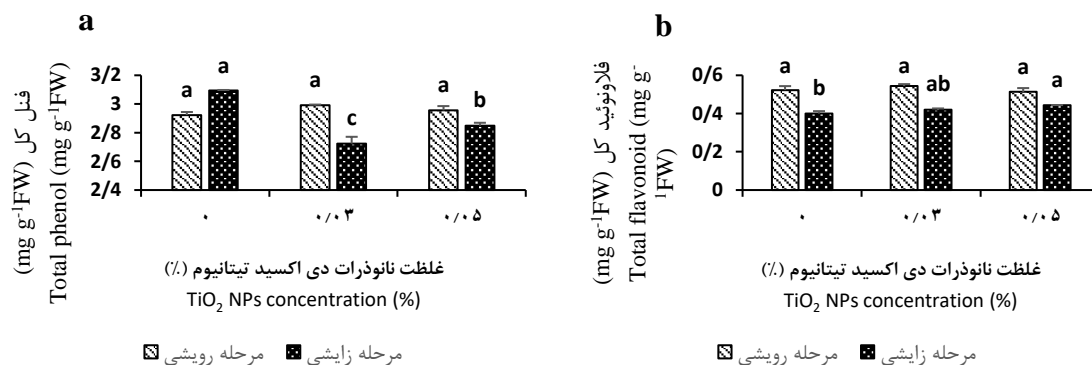
شکل ۲. اثر سطوح مختلف تیمار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر محتوای آنتوسیانین در مرحله رویشی و مرحله زایشی، در گیاه گل ستونهایی که دارای حروف یکسان هستند، است ناز یخی. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت آماری معنی داری ندارند.

Fig 2. Effect of different levels of titanium dioxide nanoparticles treatment on anthocyanin content in the vegetative and reproductive stages of *Aptenia cordifolia*. Different letters indicate a significant difference at the 0/05 probability level. Columns with the same letters are not statistically significantly different.

تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر مقدار فنل و فلاونوئید گیاه گل ناز یخی

در مرحله زایشی، اختلاف معنی داری ($P < 0/01$) بین تیمارهای مورد بررسی مشاهده شد. بیشترین میزان فنل در گیاهان شاهد با ۳/۰۹ میلی گرم بر گرم وزن تر و کمترین میزان آن در تیمار ۰/۰۳ درصد با ۲/۷۲ میلی گرم بر گرم وزن تر مشاهده گردید. همچنین، بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۰/۰۵ درصد با ۰/۹۷ میلی گرم بر گرم وزن تر بود، در حالی که تیمار ۰/۰۳ درصد تفاوت معنی داری با گیاهان شاهد و تیمار ۰/۰۵ درصد نداشت. در مرحله رویشی، اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. بنابراین در مرحله زایشی در گیاهان تحت تیمار میزان فنل رو به کاهش و میزان فلاونوئید رو به افزایش بوده است. نتایج ما با نتایج حاصل از مطالعه برگ گیاه مریم گلی قرمز همسو می باشد. در این مطالعه گیاه مریم گلی قرمز به دو روش محلول پاشی برگی و تغذیه خاکی در دو مرحله رشد رویشی و زایشی تحت تاثیر نانوذرات اکسید سزیم قرار گرفته است، بیشترین مقدار فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی عصاره برگ گیاه مریم گلی قرمز در اثر محلول پاشی برگی با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانو اکسید سزیم در مرحله زایشی حاصل شده است (Paryan *et al.*, 2020). تولید فلاونوئیدها و اجتماع آنها در واکوئل سلولهای لایه اپیدرمی برگ و ساقه سبب کاهش اثرهای

تنش اکسیداتیو می‌شود (Atanassova *et al.*, 2011). ایجاد محدودیت در انتقال الکترون‌های فتوسنتزی طی فرآیند تنش که سبب ایجاد تغییرات متابولیت در گیاه از جمله منجر به القای فلاونوئیدها برای تعدیل این وضعیت می‌شود، از دلایل افزایش فلاونوئیدها است (Levitt, 1980) در گیاهانی که تحت تاثیر تیمار واقع شده‌اند علت افزایش فلاونوئیدها در اثر افزایش سنتز آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز است که یکی از آنزیم‌های مهم در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها است (Kula *et al.*, 2002). بسیاری از فلاونوئیدها اجزای فعال گیاهان دارویی هستند که نقش مهمی در گیاهان به عنوان ترکیبات فعال فیزیولوژیکی، عوامل محافظتی در برابر تنش‌ها و عوامل جذب ایفا می‌کنند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد فلاونوئیدهای موجود در گیاهان در کاهش اثرات تشعشعات مضر و مواد سمی و همچنین واکنش گیاه به استرس از طریق کنترل انتقال اکسین نقش دارند (Shoarian *et al.*, 2020). قرار گرفتن در معرض TiO_2 -NPs منجر به تولید ROS ها و انفجار اکسیداتیو می‌گردد (Falck *et al.*, 2009). افزایش فلاونوئید در این گیاه می‌تواند به این دلیل باشد که، حضور نانوذرات باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد و همین عامل موجب می‌شود که گیاه با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز فنل و فلاونوئیدها و افزایش محتوای فلاونوئید، آسیب ناشی از تنش‌های ایجاد شده را کاهش دهد (Yousefi and Riahi Madvar, 2016).



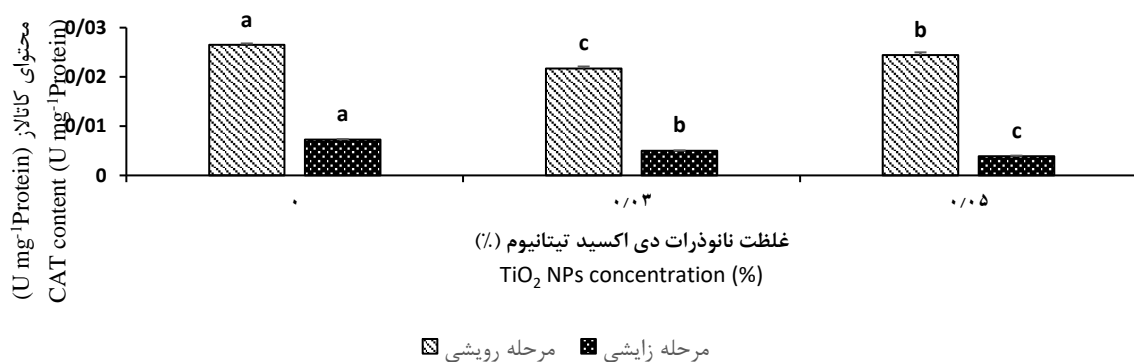
شکل ۳. اثر سطوح مختلف تیمار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر a: فنل، b: فلاونوئید در مرحله رویشی و مرحله زایشی، در گیاه گل نازیخی. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است. ستون‌هایی که دارای حروف یکسان هستند، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند.

Fig 3. Effect of different levels of titanium dioxide nanoparticles treatment on a: phenol, b: flavonoid in the vegetative and reproductive stages of *Aptenia cordifolia*. Different letters indicate a significant difference at the 0/05 probability level. Columns with the same letters are not statistically significantly different.

تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) گیاه گل نازیخی

مطابق با داده‌های آماری مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مرحله رویشی و مرحله زایشی بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) است. در مرحله رویشی و مرحله زایشی بیشترین میزان آنزیم کاتالاز مربوط به گیاهان شاهد به

ترتیب با مقادیر 0.026 و 0.073 ($U\ mg^{-1}\ protein$) و کمترین میزان آن در مرحله رویشی مربوط به تیمار 0.03 درصد نانوذرات با مقدار 0.021 ($U\ mg^{-1}\ protein$) و در مرحله زایشی مربوط به تیمار 0.05 درصد نانوذرات با مقدار 0.039 است. در راستای نتایج ما با افزایش غلظت نانوذرات نقره میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در وارپته‌های شمعدانی کاهش یافته است (Hatami and Ghorbanpour, 2014). در مقابل بررسی اثر TiO_2 -NPs بر فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه فلفل نشان می‌دهد که TiO_2 -NPs باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT، نیترات ردوکتاز و POD شده است (Martínez-Sánchez *et al.*, 1993). فعالیت CAT در عدسک آبی با افزایش غلظت TiO_2 -NPs افزایش یافت (Song *et al.*, 2012). فعالیت آنزیم CAT به عواملی همچون شدت، مدت و نوع تنش بستگی دارد (Salama, 2012). مطالعات نشان داده که آنزیم CAT احتمال دارد در فرآیندهای علامت‌دهی سلولی از طریق کنترل H_2O_2 ایفای نقش کند. هنگامی که فعالیت CAT رو به کاهش است، فعالیت آنزیم‌های دیگر حذف کننده ROS از طریق یک مسیر جبرانی رو به افزایش است (Malecka *et al.*, 2012).



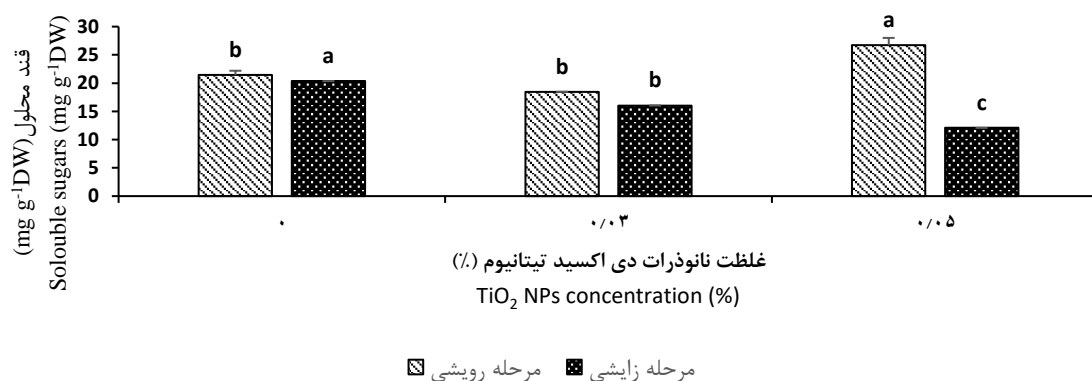
شکل ۴. اثر سطوح مختلف تیمار نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر محتوای آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز در مرحله رویشی و مرحله زایشی در گیاه گل نازیخی. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 0.05 است. ستون‌هایی که دارای حروف یکسان هستند، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند.

Fig 4. The effect of different levels of titanium dioxide nanoparticles treatment on the content of the antioxidant enzyme catalase in the vegetative and reproductive stages of *Aptenia cordifolia*. Different letters indicate a significant difference at the 0/05 probability level. Columns with the same letters are not statistically significantly different.

تاثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر قند محلول گیاه گل نازیخی

بر اساس داده‌های آماری در مرحله رویشی و مرحله زایشی بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) است، به طوری که در مرحله رویشی بیشترین میزان قند محلول مربوط به تیمار 0.05 درصد نانوذرات با مقدار $26/7$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک است، در حالی که تیمار 0.03 درصد نانوذرات اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد ندارد. همچنین در مرحله زایشی بیشترین میزان قند محلول در گیاهان شاهد با مقدار $20/35$ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و کمترین میزان قند محلول در تیمار 0.05

درصد نانوذرات با مقدار ۰/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. بنابراین در مرحله رویشی، گیاهان تحت تیمار ۰/۰۵ درصد سطح قند محلول بالاتری را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. این نتایج با مطالعات قبلی همسو است؛ به‌عنوان مثال، در گیاه نخود، در سطح کمتر کاربرد TiO_2 -NPs، سطح قند بالا بود و در سطح ۰/۰۵ درصد تقریباً ۹۰ درصد افزایش داشت (Hajra and Mondal, 2017). همچنین، تیمار TiO_2 -NPs اثر مثبت بر سطح قند در گیاهان گشنیز (Sardar *et al.*, 2022) و باقلا (Abdel Latef *et al.*, 2018) نشان داد. برخی تحقیقات نشان داده‌است که افزایش غلظت فلزات سنگین، میزان تعادل آب درون سلولی را دچار اختلال کرده و باعث تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلولی و آنزیم‌های مسیر متابولیسم قندها می‌شود و با افزایش غلظت فلزات سنگین فعالیت آنزیم اینورناز کاهش می‌یابد. به دنبال تجمع این عناصر سنگین در سلول و کاهش انتقال آب به برگ‌ها، مقدار کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها افزایش می‌یابد. در واقع افزایش قندها یک نوع مکانیسم سازگار یافته برای حفظ پتانسیل اسمزی تحت تنش دی‌اکسید تیتانیوم است و تجمع کربوهیدرات‌ها در حفظ غشای سلولی و تنظیم اسمزی موثر است (Ch and Sh, 2016). در مرحله زایشی، اما میزان قند محلول در گیاهان شاهد بیشتر از گیاهان تحت تیمار بود. کاهش محتوای قند محلول در گیاه مورد مطالعه در مرحله زایشی ممکن است به سطح سمی نانوذرات نسبت داده شود که باعث کاهش بعدی رشد می‌شود. نتایج مشابهی در گیاهان لوبیا و ذرت به دست آمده‌است که نشان می‌دهد تیمار با نانوذرات نقره موجب افزایش قند در غلظت‌های پایین و کاهش آن در غلظت‌های بالا شد (Salama, 2012). مطالعات مشابه بر روی گیاهان دیگر نشان داده‌است که در برخی موارد، مانند گیاه عدسک‌آبی تحت تیمار نانوذرات نیترا نقره موجب افزایش قند در غلظت‌های پایین و کاهش آن در غلظت‌های بالاتر شد (Jiang *et al.*, 2012). همچنین کاهش قند محلول ممکن است به علت کاهش فتوسنتز باشد که مربوط به پراکسیداسیون غشای تیلاکوئید است (mazza *et al.*, 2000).



شکل ۵. اثر سطوح مختلف تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای قند محلول در مرحله رویشی و مرحله زایشی در گیاه گل ستون‌هایی که دارای حروف یکسان هستند، است. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت آماری معنی‌داری ندارند.

Fig 5. Effect of different levels of titanium dioxide nanoparticles treatment on soluble sugar content in the vegetative and reproductive stages of *Aptenia cordifolia*. Different letters indicate a significant difference at the probability level. Columns with the same letters are not statistically significantly different.

نتیجه گیری کلی

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (TiO₂-NPs) به عنوان پرکاربردترین نانوذرات فلزی، با احتمال آلودگی زیست محیطی و ورود به زنجیره غذایی از طریق گیاهان، نگرانی هایی را درباره سلامت انسان و اکوسیستم ایجاد کرده اند. گیاه گل نازیخی که در فضای سبز ایران و به عنوان گیاه دارویی کاربرد دارد، در معرض این نانوذرات قرار دارد. در مطالعه پیشین، ویژگی های مورفولوژیکی، تشریحی و برخی شاخص های بیوشیمیایی گیاه گل نازیخی در شرایط هیدروپونیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. تحقیق حاضر به صورت مقایسه ای، اثر محلول پاشی غلظت های مختلف TiO₂-NPs را بر پارامترهای بیوشیمیایی در مراحل رشد رویشی و زایشی مطالعه کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که TiO₂-NPs با اثراتی وابسته به غلظت و مرحله رشدی، توانستند پاسخ های بیوشیمیایی متنوعی را در گیاه گل نازیخی القا کنند. افزایش آنتوسیانین و فلاونوئیدها در برخی تیمارها نشان دهنده تقویت سازوکارهای دفاعی غیرآنزیمی در برابر تنش ناشی از نانوذرات بود، درحالی که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می تواند ناشی از اختلال در سامانه های آنزیمی آنتی اکسیدانی باشد. همچنین، تغییر در محتوای قند محلول بیانگر تنظیم اسمزی به منظور مقابله با استرس نانوذرات است. با توجه به این نتایج، کاربرد TiO₂-NPs در کشاورزی باید با دقت و آگاهی از نوع گیاه، غلظت مناسب و مرحله رشد همراه باشد. پیشنهاد می شود در مطالعات آتی، بررسی های گسترده تری شامل آنالیزهای مولکولی، بررسی بیان ژن های مرتبط با مسیرهای آنتی اکسیدانی و سنتز متابولیت های ثانویه و نیز ارزیابی بلندمدت اثرات این نانوذرات در شرایط مزرعه ای و خاک واقعی صورت گیرد. همچنین، مقایسه تأثیر TiO₂-NPs با سایر نانوذرات فلزی و بررسی اثرات تجمع آن ها در بافت های گیاهی می تواند به شناخت دقیق تر پایداری زیست محیطی این ترکیبات کمک کند.

منابع

- Abdel Latef, A. A. H., Srivastava, A. K., El-sadek, M. S. A., Kordrostami, M., & Tran, L. S. P. (2018). Titanium dioxide nanoparticles improve growth and enhance tolerance of broad bean plants under saline soil conditions. *Land Degradation & Development*, 29(4), 1065-1073.
- Atanassova, M., Georgieva, S., & Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology & Metallurgy*, 46(1).
- Cela, J., Arrom, L., & Munné-Bosch, S. (2009). Diurnal changes in photosystem II photochemistry, photoprotective compounds and stress-related phytohormones in the CAM plant, *Aptenia cordifolia*. *Plant science*, 177(5), 404-410.
- Ch, A., & Sh, Z. (2016). Developmental and biochemical responses of *Phaseolus vulgaris* L. to Aluminum oxide nano-particles treatment. *Journal of Cell & Tissue*, 7(1), 19-32.

- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3), 3.
- Dağhan, H. A. T. İ. C. E. (2018).** Effects of TiO₂ nanoparticles on maize (*Zea mays* L.) growth, chlorophyll content and nutrient uptake. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16.
- Davari, A., Solouki, M., & Fazeli, N. B. (2018).** Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis* L. (In Persian)
- De Filpo, G., Palermo, A. M., Munno, R., Molinaro, L., Formoso, P., & Nicoletta, F. P. (2015).** Gellan gum/titanium dioxide nanoparticle hybrid hydrogels for the cleaning and disinfection of parchment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 51-58.
- Elavarthi, S., & Martin, B. (2010).** Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. In *Plant stress tolerance* (pp. 273-280). Humana Press.
- Falck, G. C. M., Lindberg, H. K., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalan, J., ... & Norppa, H. (2009).** Genotoxic effects of nanosized and fine TiO₂. *Human & experimental toxicology*, 28(6-7), 339-352.
- Farahi, S. M. M., Yazdi, M. E. T., Einafshar, E., Akhondi, M., Ebadi, M., Azimipour, S., ... & Iranbakhsh, A. (2023).** The effects of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on physiological, biochemical, and antioxidant properties of Vitex plant (*Vitex agnus-Castus* L). *Heliyon*, 9(11).
- Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M. R., Fotopoulos, V., & Kimura, S. (2020).** Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Scientific reports*, 10(1), 912.
- Gould, K. S., & Lister, C. (2006).** Flavonoid functions in plants. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, 397-441.
- Hajra, A., & Mondal, N. K. (2017).** Effects of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germination, biochemical and morphoanatomical attributes of *Cicer arietinum* L. *Energy, Ecology and Environment*, 2(4), 277-288.
- Hasan, S. (2015).** A review on nanoparticles: their synthesis and types. *Res. J. Recent Sci*, 2277, 2502.
- Hatami, M., & Ghorbanpour, M. (2014).** Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 130-139.
- Hou, J., Wang, L., Wang, C., Zhang, S., Liu, H., Li, S., & Wang, X. (2019).** Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of environmental sciences*, 75, 40-53.

Hu, J., Wu, X., Wu, F., Chen, W., White, J. C., Yang, Y., ... & Wang, X. (2020). Potential application of titanium dioxide nanoparticles to improve the nutritional quality of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of hazardous materials*, 389, 121837.

Inze, D. and Montagu, M. V. (2000). Oxidative stress in plants. TJ International Ltd, Padstow, Cornwall. Great Britain.

Jiang, H. S., Li, M., Chang, F. Y., Li, W., & Yin, L. Y. (2012). Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1880-1886.

Kim, C., Park, H. J., Cha, S., & Yoon, J. (2013). Facile detection of photogenerated reactive oxygen species in TiO₂ nanoparticles suspension using colorimetric probe-assisted spectrometric method. *Chemosphere*, 93(9), 2011-2015.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., ... & Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(9), 1825-1851.

Ko, J. A., & Hwang, Y. S. (2019). Effects of nanoTiO₂ on tomato plants under different irradiances. *Environmental pollution*, 255, 113141.

Kula, B., Sobczak, A., & Kuśka, R. (2002). Effects of electromagnetic field on freeradical processes in steelworkers. Part I: Magnetic field influence on the antioxidant activity in red blood cells and plasma. *Journal of Occupational Health*, 44(4), 226-229.

Larue, C., Khodja, H., Herlin-Boime, N., Brisset, F., Flank, A. M., Fayard, B., ... & Carrière, M. (2011). Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 304, No. 1, p. 012057). IOP Publishing.

Levitt, J. (1980). Response of plants to environmental stresses: chilling, freezing, and high-temperature stresses. *Physiological ecology: a series of monographs, texts, and treatises*, 1, 23-64.

Lyu, S., Wei, X., Chen, J., Wang, C., Wang, X., & Pan, D. (2017). Titanium as a beneficial element for crop production. *Frontiers in plant science*, 8, 237149.

Macwan, D. P., Dave, P. N., & Chaturvedi, S. (2011). A review on nano-TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. *Journal of materials science*, 46, 3669-3686.

Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanć, A., Baralkiewicz, D., & Tomaszewska, B. (2012). Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(6), 1721-1730.

Mancinelli, A. L. (1990). Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant Physiology*, 92(4), 1191-1195.

Martínez-Sánchez, F., Nunez, M., Amoros, A., Gimenez, J. L., & Alcaraz, C. F. (1993). Effect of titanium leaf spray treatments on ascorbic acid levels of *Capsicum annuum* L. fruits. *Journal of plant Nutrition*, 16(5), 975-981.

Mazza, C. A., Boccalandro, H. E., Giordano, C. V., Battista, D., Scopel, A. L., & Ballaré, C. L. (2000). Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology*, 122(1), 117-126.

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.

Missaoui, T., Smiri, M., Chmingui, H., & Hafiane, A. (2017). Effects of nanosized titanium dioxide on the photosynthetic metabolism of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum L.*). *Comptes Rendus Biologies*, 340(11-12), 499-511.

Mohajjel Shoja, H., Ahmadi, L., Kolahi, M., & Mohajel Kazemi, E. (2021). Effect of TiO₂ NPs on the growth, anatomic features and biochemistry parameters of Baby sun rose (*Aptenia cordifolia*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27, 2071-2081.

Mourato, M., Reis, R., & Martins, L. L. (2012). Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. *Advances in selected plant physiology aspects*, 12, 1-17.

Paryan, S., Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2020). Influence of CeO₂-Nanoparticles on morpho-physiological traits and tanshinone contents of roots in *Salvia miltiorrhiza Bunge* upon foliar and soil application methods. *Journal of Medicinal Plants*, 19(75), 168-187. (In Persian)

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.

Rezaizad, M. S., Abbaspour, H., Hashemi-Moghaddam, H., Gerami, M., & Ramezani, M. (2021). Photocatalytic activity of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) on the physiological and phytochemical properties of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni]. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 10(2), 169-177.

Rikabad, M. M., Pourakbar, L., Moghaddam, S. S., & Popović-Djordjević, J. (2019). Agrobiological, chemical and antioxidant properties of saffron (*Crocus sativus L.*) exposed to TiO₂ nanoparticles and ultraviolet-B stress. *Industrial Crops and Products*, 137, 137-143.

Roberts, E. J., & Martin, L. F. (1959). Progress in determining organic non-sugars of sugarcane juice that affect sugar refining. *Proceedings of the 6th technical session on bone char* (ed. Deitz, VR), 67-99.

Roy, R., Kumar, S., Tripathi, A., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2014). Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunology letters*, 158(1-2), 79-87.

Salama, H. M. (2012). Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) and corn (*Zea mays L.*). *International Research Journal of Biotechnology*, 3(10), 190-197.

Santos Filho, R. D., Vicari, T., Santos, S. A., Felisbino, K., Mattoso, N., Sant'Anna-Santos, B. F., ... & Leme, D. M. (2019). Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. *Genetics and molecular biology*, 42(2), 425-435.

Sardar, R., Ahmed, S., & Yasin, N. A. (2022). Titanium dioxide nanoparticles mitigate cadmium toxicity in *Coriandrum sativum* L. through modulating antioxidant system, stress markers and reducing cadmium uptake. *Environmental Pollution*, 292, 118373.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., & Zhao, J. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*, 10, 1-33.

Shoarian, N., Jamei, R., Pasban Eslam, B., & Salehi Lisar, S. Y. (2020). Titanium dioxide nanoparticles increase resistance of *L. iberica* to drought stress due to increased accumulation of protective antioxidants. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 10(4), 3343-3354.

Silva, S., de Oliveira, J. M. P. F., Dias, M. C., Silva, A. M., & Santos, C. (2019). Antioxidant mechanisms to counteract TiO₂-nanoparticles toxicity in wheat leaves and roots are organ dependent. *Journal of hazardous materials*, 380, 120889.

Song, G., Gao, Y., Wu, H., Hou, W., Zhang, C., & Ma, H. (2012). Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), 2147-2152.

Takahashi, S., & Badger, M. R. (2011). Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in plant science*, 16(1), 53-60.

Yang, X., Li, Q., Lu, Y., Zhang, L., & Bian, X. (2024). Insight into the short-term effects of TiO₂ nanoparticles on the cultivation of medicinal plants: Comprehensive analysis of *Panax ginseng* physiological indicators, soil physicochemical properties and microbiome. *Science of The Total Environment*, 951, 175581.

Yousefi, K., & Riahi Madvar, A. A. B. (2016). Effect of flavone synthase gene expression and elicitor silver and copper on some biochemical parameters in seedlings of native Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Journal of Plant (Iranian Journal of Biology)*, 28, 210-223.