

بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره زیتون بر رشد و رنگیزه‌ها در گاوزبان

شهلا هاشمی^{۱،۲}، نازی نادرنژاد^{۱*}، شهرام پورسیدی^۳ و زهرا اسرار^۱

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، ^۲ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد واحد

شهرکرد، ایران، ^۳ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶)

چکیده

سنتز نانوذرات، توجه دانشمندان را در زمینه‌های فیزیکی، شیمیایی، علوم بیولوژیکی و پزشکی به خود جلب کرده است. سنتز نانوذرات توسط عصاره گیاهان بر سایر فرآیندهای بیولوژیکی، دلیل حذف فرآیند کشت سلول‌ها مزیت دارد و همچنین سنتز می‌تواند در مقیاس بزرگ انجام شود. در این تحقیق، سنتز نانوذرات اکسید روی از روش سنتز سبز با استفاده از عصاره زیتون انجام گردید. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری و جذب اسپکتروسکوپی UV-Visibe ویژگی‌های نانوذرات تعیین گردید. همچنین تأثیر نانوذرات اکسید روی سنتز شده (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) بر رشد، پرولین و MDA، فنل کل، فلاونوئید، پراکسید هیدروژن، کلروفیل، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم‌های گاوزبان در دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۴ انجام شد. سنتز نانوذرات اکسید روی توسط ماکزیم جذب در طول موج ۳۷۰ نانومتر تأیید گردید. تصویر نانوذرات اکسید روی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که نانوذرات کروی و با اندازه میانگین ۴۱ نانومتر هستند. نتایج اثر نانوذرات بر گیاه گاوزبان نشان داد که طول ریشه و ساقه در گیاهانی که با نانوذرات اکسید روی تیمار شدند، افزایش یافت، اما محتوای قند محلول، آنتوسیانین و فعالیت کاتالاز تغییر معنی‌داری نشان نداد. علاوه بر این، تیمار نانوذرات اکسید روی در غلظت ۴۰۰ پی پی ام، مقدار فنل کل، پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آسکوربات پراکسیداز، گایاکل پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیااز را افزایش داد. از سوی دیگر تیمار نانوذرات اکسید روی، محتوای پرولین و کلروفیل را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش محتوای پرولین و کلروفیل در گاوزبان شد.

کلمات کلیدی: اکسید روی، سمیت، رنگیزه، زیتون، گاوزبان، نانوذرات

مقدمه

و... سنتز می‌گردد. در روش سنتز زیستی نانوذرات، از گیاه زنده یا عصاره اندام‌های گیاه استفاده می‌گردد. در میان روش‌های سنتز زیستی نانوذرات، سنتز توسط عصاره گیاه دلیل کنترل آسانتر رشد نانوذرات و همچنین عدم نیاز به خارج کردن باقیمانده موجودات از مواد سنتز شده مقبولیت بیشتری نسبت به بقیه روش‌های سنتز زیستی، دارد. سنتز زیستی نانوذرات اکسید

نانوذرات، موادی با حداقل یک بعد در مقیاس ۱ الی ۱۰۰ نانومتر می‌باشند (Ostiguy et al., 2010). اندازه ذرات در حد نانومتر سبب تغییراتی در خواص فیزیکی و شیمیایی می‌شوند که مهمترین آن‌ها، افزایش نسبت سطح به حجم می‌باشد. نانوذرات توسط روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی و زیستی

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: nnnadernejad@yahoo.com

مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shafaghi *et al.*, 2002). بنابراین با توجه به اهمیت دارویی گاوزبان و استفاده فراوان نانوذرات روی بدلیل کاربردهای مختلفی که در صنعت، پزشکی، داروسازی و غیره دارد، اثر نانوذرات روی بر گیاه گاوزبان بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نانوذرات اکسید روی: ۱۰ گرم از برگ‌های زیتون را بعد از شسته شدن با آب مقطر در ارلن ۲۵۰ میلی لیتر قرار داده و به ارلن ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و ارلن بر روی دستگاه هیتر استیرر با دمای ۸۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، محتویات ارلن سرد شده و سپس از کاغذ صافی عبور داده شدند. عصاره بدست آمده داخل شیشه‌های تیره داخل یخچال برای ادامه آزمایش قرار گرفتند. مقادیر ۸۰ میلی‌لیتر از عصاره در داخل بشر روی هیتر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۵ گرم نمک نیترات روی به عصاره‌ها اضافه شد و روی هیتر که قبلاً دمای هیتر استیرر در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد (سرعت ۴۰۰ rpm استیرر) به مدت نیم ساعت تنظیم گردیده بود، قرار داده شدند. بعد از این مدت زمان، مخلوط واکنش حالت خمیری پیدا کرده، خمیر بدست آمده در داخل آون در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پودر بدست آمده بوسیله هاون چینی پودر شد و پودر حاصل برای خالص سازی ۳ بار سانتریفوژ (۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) گردید و بعد از خالص سازی برای تعیین مشخصات برای آنالیز UV-visible و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) آماده گردید.

آماده سازی نمونه برای آنالیز بوسیله UV-visible: برای آنالیز ۰/۱ گرم پودر نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط گیاه زیتون را به طور جداگانه با ۳ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط کرده و با توجه به اینکه نانوذرات اکسید روی دارای پیک حداکثر در محدوده ۳۰۰-۵۵۰ نانومتر می‌باشد، جذب آن در طول موج‌های ۳۰۰-۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

بررسی تصویر نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی

روی توسط عصاره گیاه صبرزرد به‌عنوان یک عامل کاهنده و پایدار کننده انجام گردید (Sangeetha *et al.*, 2011). نانوذرات در زمینه‌های مختلفی مانند صنعت، کشاورزی، پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نانوذرات اکسید روی در محصولات حفاظت از پوست (Nohynek *et al.*, 2007)، رنگ و غیره کاربرد دارد. به‌دلیل کاربرد این نانوذرات در صنعت و دیگر زمینه‌ها، این مواد به محیط آزاد می‌شوند. نگرانی در مورد اثرات خطرناک نانوذرات موجب افزایش میزان تحقیق در مورد سمیت نانوذرات شده است. تعدادی از پژوهش‌های انجام شده در مورد اثر نانوذرات بر رشد گیاهان بوده است. در مورد اثر تیمار نانوذرات بر رشد گیاهان نتایج ضد و نقیضی وجود دارد. برخی محققان گزارش کرده‌اند که رشد تحت تیمار نانوذرات اکسید روی افزایش می‌یابد. به‌طور مثال در تحقیقاتی که Vinash و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، مشخص شد که نانوذرات اکسید روی، منجر به افزایش رشد و جوانه‌زنی در گیاه نخود شده است (Vinash *et al.*, 2010). در حالیکه Lin و Xing در سال ۲۰۰۷ سمیت نانوذرات مختلف نانولوله‌های کربنی چندجداره، آلومینیوم، آلومینا، روی و اکسید روی را بر جوانه‌زنی بذر و رشد ریشه گیاهان تربچه، چاودار، کاهو، ذرت و خیار مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که تنها ذرات روی و اکسید روی باعث مهار قابل توجهی از جوانه‌زنی و رشد ریشه شد (Lin and Xing, 2007). همچنین Lee و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر چهار نانوذرات اکسید فلز، اکسید آلومینیوم، دی‌اکسید سیلیکون، مگنتیت و اکسید روی را بر گیاه آراییدوپسیس گزارش کردند. محققان دریافتند که نانوذرات اکسید روی در میان نانوذرات دیگر، بیشترین سمیت را نشان داد. برخی گزارشات دیگر نیز حاکی از بی‌تأثیری نانوذرات روی بر رشد گیاه داشت. برای مثال در تحقیقاتی که Yuhui و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، مشخص شد که نانوذرات اکسید روی، تأثیری بر رشد و جوانه‌زنی در گیاه گندم و گوجه نداشته است. از سوی دیگر، گیاه گاوزبان به‌عنوان گیاه دارویی به‌دلیل خواص تسکین‌دهندگی، مدر بودن، نرم‌کننده بافت‌های مخاطی، خلط‌آور بودن، کاهش‌دهنده تپش قلب از دیرباز

در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاه در هاون چینی با ۱۰ میلی لیتر اتانول اسیدی (الکل اتیلیک و اسید استیک گلاسیال به نسبت حجمی ۱:۹۹) ساییده شده و پس از سانتریفوژ عصاره به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. نتایج بر حسب درصد جذب گزارش گردید.

سنجش محتوای آنتوسیانین، فنل کل و قندهای محلول با استفاده از معرف آنترون: برای سنجش محتوای آنتوسیانین از روش Wagner در سال ۱۳۷۹ استفاده شد. برای سنجش محتوای آنتوسیانین، ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاه با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از ضریب خاموشی $33000 M^{-1}cm^{-1}$ غلظت آنتوسیانین محاسبه و نتایج برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر ارائه گردید. محتوای فنل کل با استفاده از روش Guo و همکاران در سال ۲۰۰۴ و محتوای قندهای محلول نمونه‌ها با استفاده از معرف آنترون و براساس روش Roe در سال ۱۹۵۵ تعیین گردید.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید: ۰/۲ گرم از برگ‌های فریز شده گیاه با ۱۵ میلی لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): سنجش فعالیت کاتالاز بر اساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش (۳ میلی لیتر) شامل بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار، آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با افزودن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش، واکنش شروع و کاهش در جذب آب اکسیژنه در مدت

عبوری (TEM): نمونه‌ها بر روی گرید میکروسکوپ قرار گرفته و تصاویر با بزرگ‌نمایی‌های در مقیاس متفاوت گرفته شد. میکروسکوپ‌های استفاده شده در این پژوهش Philips، Carl zeiss و مدل LE0912-AB ساخت شرکت آلمان بود.

تیمار نانوذرات اکسید روی بر گیاه گاوزبان: به منظور ارزیابی اثر نانوذرات اکسید روی بر گیاه گاوزبان آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۴ انجام شد. برای شروع پژوهش، بذرهایی گاوزبان با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد برای ۶ دقیقه ضدعفونی شده و سپس بخوبی با آب مقطر دو بار شسته شد. دانه‌ها به مدت ۷۴ ساعت در محیط کشت آگار حاوی محلول غذایی هوگلند، حاوی غلظت‌های صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی کشت داده شد. قابل ذکر است که نانوذرات استفاده شده در محلول غذایی هوگلند قبلاً التراسونیک (Ultrasonic) شده بودند. بعد از ۵ روز گیاهچه‌های حاصل از دانه‌ها به گلدان‌های حاوی پرلیت در گلخانه انتقال داده شدند. بعد از ۲ هفته آبیاری با محلول غذایی هوگلند، گیاهان برای سنجش پارامترهای رشد، محتوای کلروفیل، آنتوسیانین و فنل کل برداشت شدند.

اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه: طول ساقه و ریشه با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد. طول ساقه از یقه تا قسمت انتهایی ساقه و طول ریشه از یقه تا انتهای ریشه در نظر گرفته شد. برای هر گروه تیماری ۳ تکرار و مقادیر بر اساس سانتیمتر گزارش شد.

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن: مقدار پراکسید هیدروژن براساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم‌یدید (KI) و با روش Alexieva در سال ۲۰۰۱ انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه درتری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در $12000 \times g$ سانتریفوژ گردید. برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده گردید (Alexieva et al., 2001).

اندازه‌گیری مقدار فلاونوئیدها: اندازه‌گیری فلاونوئیدها به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از روش Krizek و همکاران

سطح احتمال ۵ درصد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج آنالیز جذب اسپکتروفتومتری UV-visible و میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط گیاه زیتون: نتایج آنالیز نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط گیاه زیتون با دستگاه اسپکتروفتومتری UV-visible در غلظت ۸۰ میلی لیتر عصاره، در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به طیف مشاهده می شود که ماکزیمم جذبها در غلظت ۸۰ میلی لیتر عصاره زیتون در طول موج ۳۷۰ نانومتر می باشد. به منظور بررسی شکل، اندازه دقیقتر نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. میانگین اندازه نانوذرات زیتون ۴۱ نانومتر بدست آمد. همچنین توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری شکل نانوذرات، کروی تشخیص داده شد.

اثر نانوذرات اکسید روی بر طول ریشه و ساقه: مطابق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) طول ریشه و ساقه تحت اثر تیمار نانوذرات در سطح ۱ درصد معنی دار بوده است. با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، طول ریشه و ساقه نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داد. تیمار ۴۰۰ پی پی ام نانوذرات نسبت به تیمار ۲۰۰ پی پی ام منجر به افزایش معنی دار طول ساقه شده است (جدول ۲).

اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید: همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود، با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل کاهش می یابد و محتوای کلروفیلها در غلظت ۴۰۰ پی پی ام نسبت به ۲۰۰ پی پی ام تغییر معنی داری نداشته است. در جدول ۲، نتایج اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای کاروتنوئید نشان داده شده است. با توجه به مقایسه میانگینها، تیمار نانوذرات اکسید روی ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام به ترتیب منجر به افزایش ۷۰٪ و ۷۱٪ محتوای کاروتنوئید نسبت به شاهد شده است اما تیمارهای نانوذرات ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام

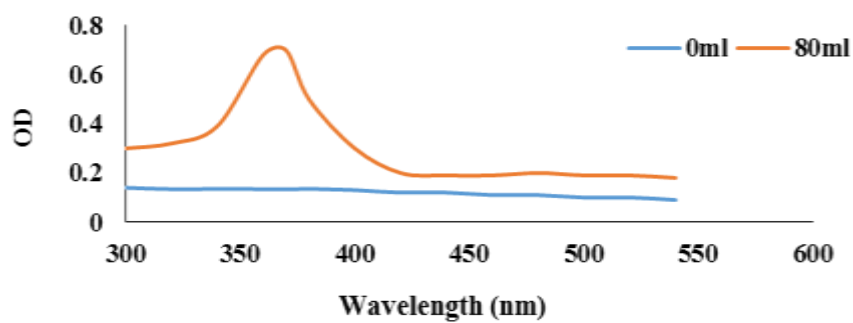
۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (Dhindsa et al., 1981).

سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX): در این روش مخلوط واکنش حاوی بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، آب اکسیژنه ۰/۱ مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آسکوربات بر اساس اکسیداسیون آسکوربیک اسید و کاهش در جذب، در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه اندازه گیری شد (Nakano and Asada, 1981).

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و گایاکول پراکسیداز (GPX): برای اندازه گیری فعالیت آنزیم PAL، ۱ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میلی لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار متوقف شد و جذب نمونه ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید (Dcunha et al., 1996). سنجش فعالیت گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Zhang و همکاران (۲۰۰۵) اندازه گیری شد.

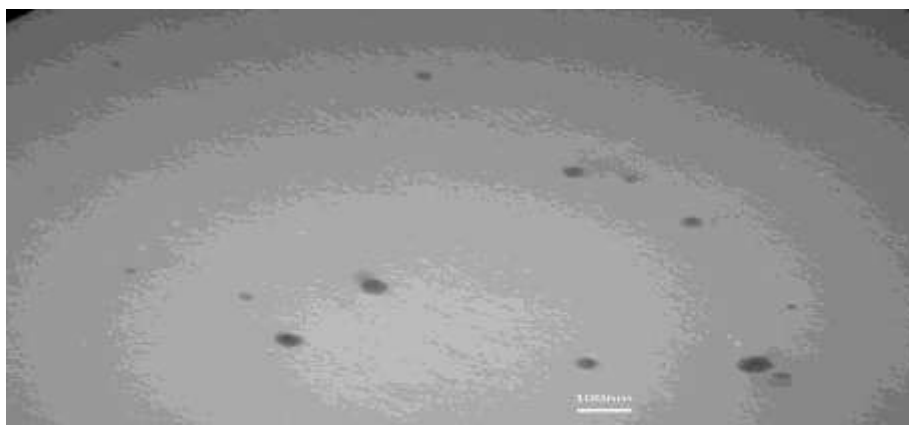
تعیین میزان یون روی در برگ به روش جذب اتمی: به منظور اندازه گیری یون روی از روش جذب اتمی (Lozak et al., 2002) استفاده شد. اندازه گیری یون روی در بافت برگ انجام شد. برای این منظور ۰/۵ گرم از بافت گیاهی خشک را در ۱۰ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده تا نمونه گیاهی به خوبی در اسید هضم شود. بعد از این مدت محلول حاصل را گرم کرده تا بخارات اسیدی از محلول خارج شوند. سپس حجم محلول را با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده و از کاغذ صافی عبور داده شد. از محلول بدست آمده برای اندازه گیری عنصر مورد نظر استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با تعداد ۳ تیمار و هر تیمار ۳ تکرار انجام شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA صورت گرفت. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در



شکل ۱- طیف جذبی UV-visible نانوذرات اکسید روی سنتز شده در عصاره زیتون.

a)



b)



c)



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط عصاره زیتون.

جدول ۱- تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) اثرات نانوذرات اکسید روی بر رنگیزه‌ها در گاو زبان

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول ساقه	محتوای (µg/gFW)			محتوای کل فنل کل
				کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل کل	
نانوذرات	۲	۱۹/۳۷۳**	۱۲**	۰/۰۳۹ ^{ns}	۱/۶۵۴**	۲/۱۹۶**	۰/۰۴۲*
خطا	۶	۱/۱۷۶	۱	۰/۰۰۹	۱/۳۹	۰/۱۵۷	۰/۰۰۷

*، **، ***: به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ^{ns}: عدم اختلاف معنی دار

ادامه جدول ۱

منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای پراکسید هیدروژن	محتوای MDA	محتوای پرولین	محتوای قند محلول	محتوای فلاونوئید	
						فلاونوئید ۳۰۰	فلاونوئید ۲۷۰
نانوذرات	۲	۷۲۸/۷۷۸**	۰/۰۳۱**	۳۸/۹۲۳**	۰/۰۵۲ ^{ns}	۱۲۰۴/۸۷۷**	۱۴۵۳/۴۴۴**
خطا	۶	۱۷/۴۴۴	۰/۰۰۱	۱/۲۱۱	۵/۴۲۱	۲۰/۷۷۸	۲۶/۴۴۴

*، **، ***: به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ^{ns}: عدم اختلاف معنی دار

ادامه جدول ۱

منابع تغییر	درجه آزادی	فعالیت آنزیم کاتالاز	فعالیت آنزیم پراکسیداز	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز	غلظت روی در برگ
نانوذرات	۲	۶/۷۷۸ ^{ns}	۴۴/۳۳۳**	۷۳۰/۳۳۳**	۱۳۴/۳۳۳**	۳۲۷۶**
خطا	۶	۶/۵۵۶	۱/۸۸۹	۷/۲۲۲	۱/۵۵۶	۴۹/۳۳۳

*، **، ***: به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ^{ns}: عدم اختلاف معنی دار

نسبت به یکدیگر اختلاف معنی داری نشان ندادند.

اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای فنل کل، آنتوسیانین و فلاونوئید: با توجه به جدول ۲، محتوای فنل کل در غلظت ۴۰۰ پی پی ام نانوذرات اکسید روی، نسبت به شاهد افزایش یافت اما محتوا در غلظت ۲۰۰ پی پی ام نانوذره نسبت به شاهد تغییر معنی داری نداشت. محتوای آنتوسیانین، با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، اختلاف معنی داری نشان نداد. با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، محتوای فلاونوئید ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نسبت به شاهد افزایش یافت. محتوای فلاونوئید ۲۷۰ در غلظت ۴۰۰ پی پی ام نانوذره نسبت

به ۲۰۰ پی پی ام تغییر معنی داری نداشت (جدول ۲).

اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای پرولین: نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که محتوای پرولین تحت تیمار نانوذرات در سطح ۱ درصد معنی دار می‌باشد (جدول ۱). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، محتوای پرولین کاهش یافت. محتوای پرولین در غلظت ۴۰۰ پی پی ام نانوذره نسبت به ۲۰۰ پی پی ام تغییر معنی داری نداشت (جدول ۳).

اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای مالون‌دآلدئید و پراکسید هیدروژن: با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی،

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثرات نانوذرات اکسید روی بر رنگیزه‌ها در گاوزبان

تیمار	طول ریش	طول ساقه	محتوای		محتوای کلروفیل a	محتوای کلروفیل کل	محتوای کاروتنوئید	محتوای آنتوسیانین	محتوای فنل کل
			b	a					
		(cm)		(µg/gFW)			(µM/gFW)		(µg/gFW)
شاهد	۳/۱۶±۰/۴۹ ^b	۵/۵±۰/۵۷ ^c	۰/۹۲±۰/۰۶۲ ^a	۲/۵۵±۰/۲۹ ^a	۳/۴۸±۰/۳۵ ^a	۱/۰۲۶±۰/۱۵ ^b	۰/۷۶±۰/۰۷ ^a	۰/۷۱±۰/۰۵۸ ^b	
۲۰۰ [#]	۷/۵±۰/۷۶ ^a	۷/۵±۰/۲۸ ^b	۰/۷۴±۰/۰۳۸ ^a	۱/۳±۰/۱۷ ^b	۲/۰۴±۰/۱۳ ^b	۳/۴۴±۰/۲۴ ^a	۰/۸±۰/۱ ^a	۰/۸۷±۰/۰۴۳ ^{ab}	
۴۰۰ ^{&}	۷/۶۶±۰/۵۹ ^a	۹/۵±۰/۷۶ ^a	۰/۷۱±۰/۰۵۷ ^a	۱/۲۴±۰/۱۴ ^b	۱/۹۵±۰/۱۱ ^b	۳/۵۸±۰/۱۷ ^a	۰/۷۳±۰/۱ ^a	۰/۹۵±۰/۰۴۱ ^a	

حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. داده‌ها، میانگین تکرار ± SE است. # ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی، & ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثرات نانوذرات اکسید روی بر رنگیزه‌ها در گاوزبان

تیمار	محتوای پراکسید هیدروژن	محتوای MDA	محتوای پرولین	محتوای قند محلول	فلاونوئید	فلاونوئید	فلاونوئید	فعالیت آنزیم کاتالاز
شاهد	۲۳±۱/۱۵ ^c	۰/۰۳±۰/۰۰۶ ^c	۱۰/۵±۰/۷۶ ^a	۱۰/۱۳±۰/۴۶ ^a	۱۷±۱/۵ ^c	۴۷±۱/۵ ^c	۱۱±۰/۵۷ ^b	۱۷/۳۳±۱/۴۵ ^a
۲۰۰	۳۵/۶±۳/۸ ^b	۰/۱۱±۰/۰۱ ^b	۵/۶±۰/۳۷ ^b	۱۰/۱۴±۱/۴ ^a	۳۰±۲/۵ ^b	۶۴±۳/۲۱ ^b	۸±۲/۰۳ ^a	۱۹±۱ ^a
۴۰۰	۵۴±۱/۱ ^a	۰/۲۳±۰/۰۳ ^a	۳/۴۷±۰/۶۹ ^b	۱۰/۳۶±۱/۷۶ ^a	۵۶±۳/۴۸ ^a	۹۰±۶/۵ ^a	۱۲±۲/۰۸ ^a	۲۰/۳۳±۱/۸۵ ^a

حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. داده‌ها، میانگین تکرار ± SE است. # ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی، & ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثرات نانوذرات اکسید روی بر رنگیزه‌ها در گاوزبان

تیمار	فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاپلاز	غلظت روی در برگ
شاهد	۳/۶۶±۱/۲ ^b	۲۷/۶۶±۱/۴۵ ^c	۱۰±۰/۵۷ ^c	۸۹/۳۳±۳/۴۸ ^c
۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی	۹/۳۳±۰/۳۳ ^a	۴۸±۲/۰۸ ^b	۱۵/۶۶±۰/۶۶ ^b	۱۲۵/۳۳±۲/۹۰۵ ^b
۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات اکسید روی	۱۱±۰/۵۷ ^a	۵۸/۳۳±۰/۸۸ ^a	۲۳/۳۳±۰/۸۸ ^a	۱۵۵/۳۳±۵/۳۶۴ ^a

حروف مشترک در هر ستون بیانگر اختلاف غیرمعنی دار تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. داده‌ها، میانگین تکرار ± SE است.

درصد می‌باشد (جدول ۴).

اثر نانوذرات اکسید روی بر محتوای قندهای محلول:

نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که محتوای قندهای محلول تحت تیمار نانوذرات معنی دار نمی‌باشد (جدول ۱). در جدول ۴، نتایج اثر نانوذرات اکسید

محتوای مالون دآلدئید افزایش می‌یابد. افزایش محتوا در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذره نسبت به شاهد ۷۲ و ۸۶ درصد می‌باشد (جدول ۴). با افزایش غلظت همچنین نانوذرات اکسید روی، محتوای پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد. افزایش محتوا در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذره نسبت به شاهد ۳۴ و ۵۷

نتایج ما Rajiv و همکاران در سال ۲۰۱۳ موفق به سنتز نانوذرات اکسید روی توسط عصاره گیاه *hysterophorus Parthenium* شدند که حداکثر جذب در طول موج ۳۵۸ نانومتر بود (Rajiv et al., 2013).

در این تحقیق، اندازه نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط میکروسکوپ TEM ۴۱ نانومتر بود. Rajiv و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانوذرات اکسید روی با اندازه ۸۴ نانومتر توسط عصاره گیاه *Parthenium hysterophorus* سنتز کردند. از طرف دیگر، نانوذرات به دلیل اثرات خاص و ویژگی‌های منحصر به فردشان، ورود گسترده‌ای به دنیای کشاورزی و بیولوژی داشته‌اند. این ذرات به اشکال مختلف در محیط زیست آزاد شده و تأثیرات ناشناخته آنها بر موجودات زنده و اکوسیستم، موجبات نگرانی‌های فراوانی شده است. گیاهان جز اساسی و ضروری تمام اکوسیستم‌ها می‌باشند و نقش اساسی در سرنوشت و جابه جایی نانومواد در محیط، از طریق جذب ایفا می‌کنند. اگرچه بررسی‌های نسبتاً زیادی در مورد سمیت نانومواد روی گونه‌های جانوری و باکتری‌ها صورت گرفته است، ولی بررسی‌های محدودی روی گیاهان عالی گزارش شده است. بنابراین در این پژوهش، اثر تیمار نانوذرات اکسید روی بر گیاه گاوزبان بررسی گردید.

نتایج رشد ما با نتایج رشد گیاه در تحقیقات Vinash و همکاران در سال ۲۰۱۰ در حضور نانوذرات اکسید روی بر گیاه نخود مطابقت دارد. در حالیکه تحقیقاتی که Yuhui و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، مشخص شد که نانوذرات اکسید روی، تأثیری بر رشد در گیاه گندم و گوجه نداشته است. تیمار نانوذرات اکسید روی مقدار مالون دآلدئید را در گیاهان مورد آزمایش افزایش داده است و این مطلب نشان می‌دهد که تیمار نانوذرات اکسید روی، منجر به خسارت به غشاء گردیده و پراکسیداسیون لیپیدها را تشویق نموده است. اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمولترین و قابل قبولترین روشهای اندازه گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء است و به‌میزان وسیعی در گیاهان استفاده می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر

روی بر محتوای فندهای مجلول نشان داده شده است. با توجه به مقایسه میانگین‌ها، با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی، محتوای فندهای مجلول نسبت به شاهد تغییر معنی داری نشان نداده است (جدول ۴).

اثر نانوذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیم‌ها: افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی بر فعالیت آنزیم کاتالاز اثر معنی داری نداشت، درحالی‌که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و فنیل آلانین پراکسیداز به‌طور معنی داری افزایش یافت. همچنین، فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات نسبت به شاهد افزایش یافت و فعالیت این آنزیم در غلظت ۲۰۰ نسبت به ۴۰۰ پی‌پی‌ام تغییر معنی داری نداشت.

اثر نانوذرات اکسید روی بر غلظت یون روی در برگ: مطابق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) غلظت یون روی تحت تیمار نانوذرات در سطح ۱ درصد معنی دار می‌باشد. افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی اثر معنی داری بر غلظت یون روی در برگ داشت. غلظت یون روی در برگ با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی افزایش یافت.

بحث

نانومواد، توده‌های اتمی یا ملکولی با اندازه‌ی ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند. در سال‌های اخیر، سنتز نانوذرات توجه دانشمندان را در زمینه‌هایی مانند صنایع شیمیایی، فیزیکی، مواد، بیولوژیکی و پزشکی، نوری، مهندسی و علوم مکانیکی به خود جلب کرده است. در میان روش‌های سنتز سبز نانوذرات، سنتز توسط عصاره، بدلیل کنترل آسانتر رشد نانوذرات و همچنین عدم نیاز به خارج کردن باقیمانده موجودات از مواد سنتز شده، مقبولیت بیشتری نسبت به بقیه روش‌های سنتز زیستی دارد. در این پژوهش نانوذرات اکسید روی توسط عصاره زیتون سنتز شد. تأیید سنتز نانوذرات اکسید روی توسط آنالیزهای UV-visible و میکروسکوپ TEM صورت گرفت. اولین آزمایشی که برای تأیید نانوذرات صورت می‌گیرد، آنالیزهای UV-visible می‌باشد. نانوذرات سنتز شده توسط ۸۰ میلی لیتر عصاره زیتون دارای حداکثر جذب در طول موج ۳۷۰ نانومتر بود. مشابه با

هیدروکسیل را حذف کند و بدین ترتیب ماکرومولکول‌های اساسی سلول مثل پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را از خطرات رادیکال‌های آزاد حفظ کند. همچنین پرولین به عنوان یک شلاته‌کننده فلز نیز گزارش شده است (Matysik. and Alia, 2002). تیمار نانوذرات اکسید روی تأثیر کاهشی معنی‌داری بر مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل داشت. کاهش در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تیمار نانوذرات اکسید روی، در برخی مطالعات گزارش شده است که عمدتاً به دلیل تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها است. نتایج ما با یافته‌های Shekhawat و Rao در سال ۲۰۱۴ در گیاه خردل مطابقت دارد. نانوذره اکسید روی می‌تواند به دلیل آزاد کردن یون روی باعث بهم ریختگی کلروپلاست و کاهش در تعداد تیلاکوئید و در نتیجه کاهش کلروفیل شده باشد (Moore, 2006).

سمیت نانوذرات ممکن است بدلیل رها کردن یون فلزی و یا تولید رادیکال‌های آزاد باشد. در شرایط طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن تعادل وجود دارد. اما در تنش‌های محیطی و زنده این تعادل به هم می‌خورد و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی دارند که قادر به سم‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. با کمک سیستم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان قادر به کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌باشند (Abdul Jaleel et al., 2009). آنتی‌اکسیدان‌های گیاهان به دو دسته آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شوند. دسته آنزیمی عبارتند از: آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، چرخه آب-آب، چرخه گلوتاتیون. اما دسته غیرآنزیمی مولکول‌هایی با وزن ملکولی پایین می‌باشند که هر یک دارای ساختار و خصوصیات شیمیایی خاص بوده و محل قرار گیری آن‌ها نیز متفاوت می‌باشد. این ترکیبات بواسطه دادن الکترون نقش اساسی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد دارند (Abdul Jaleel et al., 2009). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی به دو گروه تقسیم می‌شوند: ۱- آنتی

اشباع، آلدئیدهایی مثل مالون دآلدئید تولید می‌کنند که این محصولات آلدئیدی معمولاً به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه گیری می‌شوند (Shulaev and Oliver, 2006). سمیت نانوذرات اکسید روی می‌تواند بدلیل آزاد کردن یون روی و یا تولید رادیکال‌های آزاد باشد. تحت استرس فلزات سنگین، H_2O_2 و O_2^- از طریق واکنش هابر-وایس، به رادیکال OH^- بسیار واکنش پذیر تبدیل می‌شود، که باعث پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (Apel and Hirt, 2004) در کار تجربی حاضر، تجمع MDA در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام به بالاترین مقدار رسیده است. یافته‌های Wang و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان می‌دهد که سمیت روی باعث افزایش محتوای مالون‌دآلدئید شد. نتایج حاصل از سنجش پراکسید هیدروژن در گاوزبان نشان داد که میزان این ترکیبات تحت تیمار نانوذره اکسید روی افزایش معنی‌داری داشته‌اند. نتایج میزان پراکسید هیدروژن ما با یافته‌های تحقیقات Shekhawat و Rao در سال ۲۰۱۴ در حضور نانوذرات اکسید روی، در گیاه خردل مطابقت دارد. در شرایط طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن تعادل وجود دارد. اما در تنش‌های محیطی و زنده این تعادل به هم می‌خورد و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی دارند که قادر به سم‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. گیاهان با کمک سیستم‌های آنتی‌اکسیدان، قادر به کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌باشند (Abdul Jaleel et al., 2009). نتایج محتوای پرولین نیز نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذرات، محتوای پرولین کاهش می‌یابد. تحت تنش‌های غیرزنده مختلف، گیاهان غلظت بالای از پرولین آزاد در بافت تجمع می‌دهند. نتایج پرولین ما با نتایج تحقیقات Shekhawat و Rao در سال ۲۰۱۴ در حضور نانوذرات اکسید روی، در گیاه خردل مطابقت دارد. مکانیسم‌های مولکولی واضح که چگونه پرولین مقاومت گیاه را درمقابل تنش می‌افزاید هنوز کاملاً شناخته نشده است. اما گزارش شده که پرولین بخوبی می‌تواند رادیکال‌های

(Singh et al., 2009). تغییرات در فعالیت PAL و سایر آنزیم‌های دخیل در مسیر فنیل پروپانوئید و تجمع انواع ترکیبات فنلی می‌تواند جزء اولین مراحل پاسخ به تنش‌ها باشد. در نتیجه افزایش فعالیت و بیان PAL، ترکیبات فنلی در بافت‌های تحت تنش تجمع می‌یابند و گیاهان را علیه تنش‌های زنده و محیطی محافظت می‌نمایند. در پژوهش حاضر، تیمار نانوذرات اکسید روی منجر به افزایش فعالیت آنزیم APX و GPX در غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام نانوذرات شده است. اما تیمار نانوذرات بر روی فعالیت آنزیم CAT تأثیر معنی‌داری نداشت. موافق با نتایج ما، تحقیقات انجام شده نانوذرات نقره بر گیاه *Arabidopsis thaliana* اثر افزایشی فعالیت آنزیم‌های APX را گزارش کردند (Nair and Chung, 2015). همچنین Servin و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که نانوذرات اکسید تیتانیوم منجر به افزایش فعالیت آنزیم ASP در گیاه مورد مطالعه شد.

نتیجه‌گیری کلی

روش‌های سنتز سبز نانوذرات توسط عصاره مقبولیت بیشتری نسبت به بقیه روش‌های سنتز سبز دارد. در این پژوهش سنتز نانوذرات اکسید روی، توسط عصاره زیتون انجام گردید. سنتز نانوذرات اکسید روی توسط ماکزیمم جذب در طول موج ۳۷۰ نانومتر تأیید گردید و اندازه نانوذرات اکسید روی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری، ۴۱ نانومتر تخمین زده شد. نتایج تیمار نانوذرات اکسید روی نشان داد که غلظت‌های بالاتر نانوذرات منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه شد. اما با وجود فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، سمیت نانوذرات منجر به افزایش محتوای پراکسید هیدروژن و مالون‌دآلدئید در گاوزبان شد.

اکسیدان‌های غشایی محلول در چربی نظیر کاروتنوئید ۲-آنتی اکسیدان‌های محلول در آب نظیر ترکیبات فنلی (Hayat et al., 2010). در این تحقیق تحت تنش نانوذره اکسید روی، مقدار کاروتنوئیدها افزایش یافته است. نتایج حاصل از سنجش فلاونوئیدها و فنل در گاوزبان نشان داد که میزان این ترکیبات تحت تیمار نانوذره اکسید روی افزایش معنی‌داری داشته‌اند. ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل خوردگی رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان گهرمایه آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با اهداء سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می‌کنند (Sakihama et al., 2002). ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌گردد اما تنش‌های محیطی یا زنده مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهد. فلاونوئیدها نیز آنتی‌اکسیدان‌های قوی هستند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تجزیه کنند (Yamasaki et al., 1997).

همچنین، Krishnaraj و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که نانوذرات نقره سنتز شده زیستی باعث افزایش محتوا ترکیبات فنلی *Bacopa monnieri* شد. از آنجا که همه این ترکیبات از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و سینامیک اسید خود محصول عمل دامیناز آنزیم PAL روی فنیل‌آلانین می‌باشند، به نظر می‌رسد که تغییرات در فعالیت PAL می‌تواند یکی از دلایل برای تغییر مقدار این ترکیبات در گیاهان باشد. فنیل‌آلانین آمونیاک‌آز آنزیم اصلی مسیر فنیل پروپانوئید می‌باشد که با دامیناسیون تبدیل L-فنیل‌آلانین به ترانس سینامیک اسید را انجام می‌دهد. سینامیک اسید اولین حدواسط برای سنتز ترکیبات فنلی، آنتوسیانین، فلاونوئیدها، تانن و لیگنین می‌باشد

منابع

- Abdul Jaleel, C., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, Z., Chang-Xing, S. and Hong-Bo, R. (2009) Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 427-43.

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24: 1337-1344
- Apel, K., and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism oxidative stress, and signaling transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Dcunha, G .B., Satyanarayan, V. and Nair, P. M. (1996) Purification of phenylalanine ammonialyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* 42: 17-20.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. and Thrope, T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid per oxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany* 32: 93-101.
- Guo, P., Cao, Y., Li, Z. and Zhao, B. (2004) Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. *Plant, Cell and Environment* 27: 473-477.
- Hayat, Q., Hayat, Sh., Irfan. M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G. and Ramachandran, S. M. (2010) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism .*Process Biochemistry* 47: 651-658.
- Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effect of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth. *Physiologia Plantarum* 103: 1-7.
- Lee, C. W., Mahendra, S., Zodrow, K., Tsai, D. and Braam, P. J. J. (2010) Develop-mental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology Chemistry* 29: 669-675.
- Lozak, A., Solytk, K., Ostapczuk, P. and Fijaleka, Z. (2002) Determination of selected trace elements in herbs and their influence. *Science of the Total Environment* 289:33-40.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymology* 148: 350-382.
- Lin, D. and Xing, B. (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution* 150: 243-250.
- Rao, K. V., and Srestry, T. (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cacanus cajan*) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science* 157:113-128.
- Matysik, J., and Alia, D. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plant. *Current Science* 82: 525-532.
- Moore, M. N. (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic Environ. *Environment International* 32: 967-976.
- Nair, P. M. G. and Chung, I. M. (2015) Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1719.
- Nakano, V. and Asada, K. (1981) Hydrogen Peroxide is scavenged by ascorbate-specific Peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C., and Roberts. M. S. (2007) Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical Reviews in Toxicology* 37: 251-277.
- Ostiguy, C., Roberge, M. S., Menad, L. and Endo, C. A. (2010) Best practices guide to synthetic nanoparticle management. *Bibliothèque et Archives nationales* 334-337.
- Rajiv, P., Rajeshwari, S. and Venckatesh, R. (2013) Bio-Fabrication of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Parthenium hysterophorus* L. and its size-dependent antifungal activity against plant fungal pathogens. *spectrochimica acta a mol biomol spectroscopy* 112 : 384-387.
- Rao, S. and Shekhawat, G. S. (2014) Toxicity of ZnO engineered nanoparticles and evaluation of their effect on growth, metabolism and tissue specific accumulation in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2: 105-114
- Roe, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *Journal of Biological Chemistry* 212: 335-343.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C. and Yamasaki, H. (2002) Plant phenolics antioxidant and oxidant activity: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metal in plants. *Toxicology* 177: 67-80.
- Sangeetha, G., Rajeshwari, S. and Venckatesh, R. (2011) Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *aloe barbadensis miller* leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin* 46, 12:2560-2566.
- Shafaghi, B., Naderi, N., Tahmasb, L. and Kamalinejad, M. (2002) Anxiolytic effect of *echium amoenum* L.in mice. *Iran Journal of Pharmaceutical Research* 1:37-41.
- Shulaev, V. and Oliver, D. J. (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress.new tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology* 141: 367-372.

- Singh, K., Kumar, S., Rani, A., Gulati, A. and Ahoja, P. S. (2009) Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C₄H) and catechins (flavon-3-ols) accumulation in tea. *Functional and Integrative Genomics* 9: 125-134.
- Vinash, A., Pandeyab, C., Sharda, S. and Raghvendra, S. (2010) Application of ZnO nanoparticles in influencing the growth rate of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental Nanoscience* 5: 488-497.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology* 64: 88-93.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., and Lin, Z. P. (2009) The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* 75: 1468-1476.
- Yamasaki, M., Shakihama, Y. and Ikenara, N. (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of Plant Cells against H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 1405-1412.
- Yuhui, M., Linglin, K., Xiao, H., Wei, B., Yayun, D., Yuliang, Z. and Zhifang, C. (2010) Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. *Chemosphere* 78: 273-279.
- Zhang, Z., Pang, X., Duan, X., Ji, Z. L. and Jiang, Y. (2005) Role of peroxidase in anthocyanine degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry* 90: 47-52.

Investigation of toxicity of zinc oxide nanoparticles synthesized by olive extract on growth and pigments in *Borago officinalis*

Shahla Hashemi^{1,2}, Nazi Nadernejad^{2*}, Shahram Pourseyedi³, Zahra Asrar²

¹Biology Department, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

²Young Researchers and Elite Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

³Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

(Received: 21/08/7 Accepted: 06/01/2018)

Abstract

The synthesis of metal nanoparticles has attracted the attention of scientists in various fields, particularly in the chemical, physical, biological and medical sciences. Using extract of plant for nanoparticle synthesis can be advantageous over other biological processes because it eliminates the elaborate process of maintaining cell cultures and can also be suitably scaled up for large-scale nanoparticle synthesis. In this study, zinc oxide (ZnO) nanoparticles were successfully synthesized from ZnNO₃ using Olive (*Olea europaea*). Nanoparticles were characterized with the help of Transmission electron microscopy (TEM) and UV-Vis absorption spectroscopy. To study the effects of zinc oxide (ZnO) nanoparticles (0, 200, 400 ppm) on growth, proline and Malondialdehyde (MDA), total phenol, flavonoid, Hydrogen peroxide (H₂O₂), chlorophylls and anthocyanin content in plant of *Borago officinalis*, experiment was carried out at shahid bahonar university of Kerman University in 2014. Synthesised ZnO nanoparticles were confirmed by the absorption maxima at the wavelength of 370 nm. TEM image revealed that ZnO nanoparticles were spherical with average size 41 nm. The results of the effect of nanoparticles on *Borago officinalis* showed the plants that treated with zinc oxide (ZnO) nanoparticles, increased root and shoot length. But soluble suger, anthocyanin and CAT activity in the plants that treated with zinc oxide (ZnO) nanoparticles had no significant effect. On the other hand, Zinc oxide (ZnO) nanoparticles decreased proline and chlorophyll content. In addition, ZnO nanoparticles treatment at 400 ppm increased phenol content, H₂O₂, lipid peroxidation and APX, GPX, PAL activity. Reactive oxygen species generation was a toxicological mechanism of nanoparticles that increased H₂O₂ content and lipid peroxidation in plants. ZnO nanoparticles causing increased production of reactive oxygen species and decreased proline and chlorophyll content in *Borago officinalis*.

Keywords: ZnO, Toxicity, Pigment, Olive, *Borago officinalis*, Nanoparticles.

*Corresponding author, Email: nnnadernejad@yahoo.com