

پاسخ مورفولوژیک و فیزیولوژیک لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) به محلول پاشی اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن تحت تنش نانو نقره

مهسا رفعتی آلاشتی^۱، مهدی برادران فیروزآبادی^{۱*}، علی دهستانی^۲، احمد غلامی^۱، مهدیه پارسائیان^۱

^۱ گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، سمنان، ایران.

^۲ پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸)

چکیده

توسعه روز افزون استفاده از نانو ذرات نقره در کشاورزی و صنعت موجب توجه به اثرات منفی ناشی از تجمع آنها در گیاهان شده است. لوبیا سبز یکی از پرمصرفترین حبوبات در سراسر جهان است که در نواحی مختلف دنیا کشت می شود. در این پژوهش اثر اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن بر پاسخ های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه لوبیا سبز تحت تنش نانو ذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۶ انجام شد. نتایج نشان داد تنش نانو نقره سبب کاهش معنی داری در سطح برگ، ارتفاع بوته، وزن خشک برگ و غلاف شد و از طرفی میزان فلاونوئید کل، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون-اس ترانسفراز را افزایش داد. تنش نانونقره محتوای مالون دی آلدئید و نشت الکترولیت را به ترتیب در حدود ۳۳ و ۲۸ درصد افزایش داد که نشانگر آسیب اکسیداتیو و تخریب غشاء سلولی است، در حالی که این مقادیر در گیاهان تیمار شده با اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن کمتر بودند. همچنین بالاترین شاخص های رشدی به ترتیب در گیاهان شاهد، گیاهان تیمار شده با القاگرها و گیاهان تحت تنش مشاهده شد که بیانگر نقش مؤثر القاگرها در تخفیف تنش می باشد. نتایج نشان داد اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن با کاهش تجمع گونه های اکسیژن آزاد و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها موجب تعدیل خسارت های ناشی از تنش نانونقره در گیاه لوبیا سبز شده و سبب افزایش میزان رشد و نمو گیاهان تحت تنش شدند. یافته های این پژوهش می تواند برای کاهش خسارت گیاهان در مناطق آلوده با نانو ذرات مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: بیوماس، پراکسیداسیون لیپید، فلز سنگین، نشت الکترولیت

تنش های غیرزیستی به شمار می روند (Pandey et al., 2017). عناصر سنگین عنصری هستند که وزن اتمی آنها بین ۶۳/۵۴۶ تا ۲۰۰/۵۹۰ و جرم مخصوص آنها بزرگتر از ۵ گرم بر سانتی-متر مکعب باشد. بعضی از این عناصر مانند آهن (Fe)، مولیبدن (Mo) و منگنز (Mn) جزء عناصر ریزمغذی هستند. اما عناصر

گیاهان در طول چرخه زندگی خود در معرض تنش های مختلف محیطی قرار دارند که رشد و بهره وری آنها را محدود می کند. تنش غیرزیستی به عنوان اثرات مضر عوامل غیرزنده بر رشد گیاهان در یک محیط خاص توصیف می شود. خشکی، شوری، نوسانات دمایی و سمیت فلزات سنگین از مهم ترین

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: m.baradaran.f@gmail.com

است که سمیت نانو ذرات نقره آثار مخربی بر سایر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نیز دارد. از جمله آسیب‌های ناشی از سمیت نانو ذرات نقره می‌توان به کاهش فتوسنتز، تخریب کلروفیل و کاهش پایداری غشاء اشاره نمود (Vishwakarma *et al.*, 2017). پاره‌ای از محققین نشان دادند که سمیت نانو ذرات نقره فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تغییر می‌دهد (Mehrian *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای تیمار نانو ذرات نقره توانست به‌طور معنی‌داری کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی، عملکرد فتوسنتزی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکاتایون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و محتوای گلوکاتایون را در پی داشته باشد (Tripathi *et al.*, 2017).

روش‌های زیادی برای افزایش مقاومت گیاهان زراعی در برابر آلودگی اکوسیستم‌های کشاورزی با مواد خطرناک، به ویژه فلزات سنگین وجود دارد. استفاده از عناصر مفید گیاهی یک روش مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست برای کاهش سمیت فلزات سنگین در خاک‌های آلوده و یا کاهش تحرک آن‌ها در گیاهان می‌باشد (O'Connor *et al.*, 2018). اسیدهای آلی از ترکیبات مهم ریزوسفر خاک هستند که نقش مهمی در جذب مواد مغذی، هوازگی معدنی و کاهش تنش بی‌هوازی ریشه دارند و همچنین به عنوان منابع کربن برای رشد میکروارگانیسم‌ها عمل می‌کنند و از این طریق موجب حفظ باروری، ساختمان و فعالیت‌های حیاتی خاک می‌شوند (Dinh *et al.*, 2017). در سال‌های اخیر استفاده از اسیدهای آلی به منظور کاهش سمیت فلزات سنگین در خاک موفقیت آمیز بوده است. اسید سیتریک یا جوهر لیمو با فرمول شیمیایی $C_6H_7O_8$ در پرتقال و لیمو ترش وجود دارد که یک عامل بسیار عالی کلات کننده فلزات سنگین می‌باشد. اثرات مفید اسید سیتریک در افزایش مقاومت به تنش فلز سنگین در گیاهانی مانند خردل چینی (Faraz *et al.*, 2020)، آفتابگردان (Farid *et al.*, 2019) و گل همیشه بهار (Saffari and Saffari, 2020) گزارش شده است.

سولفید هیدروژن (H_2S) گازی بی‌رنگ و قابل اشتعال است که از مدت‌ها قبل به عنوان یک فیتوتوکسین در نظر گرفته می-

آرسنیک (As)، جیوه (Hg)، نقره (Ag)، آنتیموان (Sb)، کادمیوم (Cd)، سرب (Pb) و اورانیوم (U) هیچ نوع نقشی از نظر غذایی ندارند و برای گیاهان و میکروارگانیسم‌ها کم و بیش سمی هستند (Vodyanitskii, 2013).

آلودگی اکوسیستم‌های کشاورزی با فلزات سنگین یکی از اصلی‌ترین محدودیت‌های تولید محصولات کشاورزی در جهان است که از پسماندهای صنعتی و کشاورزی حاصل می‌شود (Etesami, 2018). تنش فلزات سنگین باعث بروز مشکلات زیادی در رشد و نمو گیاهان از جمله تأخیر در رشد گیاه، نکروزه شدن برگ‌ها، قهوه‌ای شدن ریشه، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، تخریب ماکرومولکول‌ها و ایجاد اختلال در مسیرهای متابولیکی می‌شود (Yadav, 2010). علاوه بر این آلودگی خاک به فلزات سنگین سبب ایجاد اختلال در جذب عناصر معدنی ضروری برای رشد گیاه از خاک و در نهایت تجمع فلزات سنگین در بافت گیاهان می‌گردد. مهمتر از همه اینکه، سمیت فلزات سنگین می‌تواند به شدت بر کیفیت و ایمنی محصولات کشاورزی تأثیرگذار باشد و امنیت غذایی جهانی را باخطر مواجه کند (Shahid *et al.*, 2017).

نقره یکی از سمی‌ترین عناصری است که هیچ‌گونه نقش زیستی در گیاهان ندارد و اغلب از طریق فرآیندهای صنعتی وارد خاک‌های کشاورزی می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که نانونقره وارد آب‌های زیرزمینی و پساب‌ها شده و در نهایت وارد سیستم آبیاری زمین‌های کشاورزی می‌شود و گیاهان را آلوده می‌سازد (Farkas *et al.*, 2011). از آنجایی که گیاهان اساس و پایه زنجیره غذایی هستند، نفوذ نانونقره به اکوسیستم سبب نگرانی در کشاورزی، امنیت غذایی و سلامت انسان شده است (Ma *et al.*, 2010). نقره به راحتی می‌تواند توسط ریشه گیاهان جذب شود و در بافت گیاهان زراعی تجمع یابد و در نهایت ایمنی غذایی را به خطر بیندازد. گزارشات متعددی درباره اثرات مضر تنش نقره بر رشد و عملکرد گیاهان مهم زراعی مانند نخود فرنگی (Tripathi *et al.*, 2017)، سیب زمینی (Homae *et al.*, 2016)، گندم (Dimkpa *et al.*, 2013) و خیار (Shams *et al.*, 2013) وجود دارد. از سویی دیگر گزارش شده

شد که برای رشد و نمو گیاهان مضر است. ولی اکنون پژوهشگران دریافته‌اند که این مولکول کوچک در غلظت بسیار کم می‌تواند نقش‌های مفید متعددی در گیاهان ایفا کند (Li, 2013). گزارش شده است که سولفید هیدروژن در گیاهان به عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل می‌کند و اثرات مثبتی در رشد و نمو گیاهان در شرایط تنش محیطی دارد (Hancock, 2019). پژوهشگران از سولفید هیدروژن برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی مختلفی مانند شوری (Mostofa et al., 2015)، خشکی (Zhang et al., 2010)، گرما (Li et al., 2013) و فلز سنگین (Ahmad et al., 2020) استفاده کرده‌اند.

لوبیا سبز با نام علمی *Phaseolus vulgaris* گیاهی یکساله از تیره Fabaceae و یکی از پر مصرف‌ترین حبوبات در سراسر جهان است. از نظر تغذیه‌ای، لوبیا سبز منبع عالی کربوهیدرات‌های پیچیده (تا ۶۰ درصد)، پروتئین (۲۰ الی ۲۷ درصد)، فیبر (تا ۲۸ درصد)، ویتامین‌ها و مواد معدنی (۴ الی ۶ درصد) و دارای چربی کمی می‌باشد (Pitura and Arntfield, 2019). لوبیا به عنوان گوشت فقرا به صورت خشکبار (دانه) و یا به عنوان یک سبزی (برگ و غلاف) توسط انسان مصرف می‌شود (Loko et al., 2018). همچنین از ساقه و برگ این گیاه به عنوان علوفه برای تغذیه دام استفاده می‌شود (Darkwa et al., 2016).

باتوجه به افزایش روزافزون آلودگی خاک‌های کشاورزی و آب به فلزات سنگین، باید مقدار تجمع این عناصر در گیاهان پر مصرف مانند لوبیا سبز به حداقل ممکن رسانده شود؛ زیرا علاوه بر محدودیتی که این فلزات برای رشد و عملکرد گیاه ایجاد می‌کند، حضور این مواد خطرناک در زنجیره غذایی، تهدید بزرگی برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده به شمار می‌رود. در پژوهش حاضر نقش اسید سیتریک و سولفید هیدروژن در نحوه پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان لوبیا سبز به تنش نانو ذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفته و میزان اثربخشی آن‌ها در تخفیف خسارت‌های ناشی از تنش مورد تحلیل قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاهان و اعمال تنش: این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار، در شهریور ماه ۱۳۹۷ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. بذر لوبیا سبز مورد استفاده رقم سانری بوده است. مزرعه دارای ۵۴ پلات بود، که در هر پلات ۴ خط کاشت به طول ۵ متر با فاصله بین ردیف ۵۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر ایجاد شد. دو خط کناری به عنوان حاشیه و دو خط وسط جهت نمونه‌برداری در نظر گرفته شد. یک روز قبل از کشت آبیاری سبک در مزرعه صورت گرفت و روز بعد، کشت بذرها به صورت دستی و در عمق ۳ تا ۵ سانتی متری انجام شد و تا زمان سبز شدن مزرعه آبیاری صورت نگرفت. تیمارهای آزمایش شامل محلول‌پاشی نانونقره در سه سطح (صفر، ۱/۵ و ۲/۵ گرم در لیتر)، محلول‌پاشی اسیدسیتریک در سه سطح (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم بر لیتر) و محلول‌پاشی با سدیم هیدروسولفاید به عنوان دهنده سولفید هیدروژن در دو سطح (عدم مصرف و مصرف با غلظت ۰/۶ میلی‌مولار) بودند. محلول‌پاشی با استفاده از مه‌پاش دستی و به هنگام غروب و در هوایی آرام و ملایم صورت گرفت. جهت محلول‌پاشی ابتدا مه‌پاش با آب مقطر کالیبره شد و مقدار محلول مورد نیاز برای هر خط کشت تعیین گردید، که حدود ۲۰۰ سی سی محلول برای هر خط کاشت لازم بود، سپس برای اعمال تیمارها مقدار مورد نیاز برای هر خط کاشت در مه‌پاش ریخته و محلول‌پاشی انجام شد. نانو نقره مورد استفاده در پژوهش حاضر با قطر ۸-۵ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان-مشهد تهیه گردید. همچنین اسیدسیتریک از شرکت مرک و سدیم هیدروسولفاید از شرکت سیگما تهیه شد. محلول‌پاشی با نانونقره طی یک مرحله و قبل از گلدهی انجام شد. پس از گذشت یک هفته محلول‌پاشی با اسیدسیتریک و روز بعد محلول‌پاشی سولفید هیدروژن صورت گرفت. در نهایت ۱۵ روز پس از محلول‌پاشی زمانی که گیاه در مرحله گلدهی بود نمونه برداری انجام شد. جهت نمونه برداری ۵ بوته از هر کرت با حفظ اثر حاشیه انتخاب شد.

اندازه‌گیری خصوصیات رشدی: برخی از صفات

$$dA = \epsilon L dC$$

رابطه (۲)

dA = تغییرات جذب، ϵ = ضریب خاموشی ۹/۶ میلی مول بر سانتی متر، L = فاصله حرکت نور از داخل کووت، dC = تغییرات غلظت در دو دقیقه: اندازه‌گیری فعالیت مالون دی-آلدهید: برای اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدهید (MDA)، در حدود نیم گرم از نمونه‌های برگ در ده میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید هموزن و به مدت ده دقیقه در $15000 \times g$ سانتریفیوژ گردید. دو میلی‌لیتر از روشناور به-دست آمده با چهار میلی‌لیتر از محلول ۰/۲۰٪ تری کلرواستیک اسید محتوی نیم درصد تیوباریبوتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به ظرف آب سرد منتقل گردید. در مرحله بعد نمونه‌ها دوباره به مدت ده دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. جذب در طول موج ۵۳۳ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین طول موج‌های جذبی در ضریب خاموشی ۱۵۵ بر میکرومول بر سانتی‌متر به‌دست آمد (Dhindsa et al., 1981).

سنجش میزان آنتوسیانین‌ها: میزان آنتوسیانین‌های گیاه لوبیا سبز با روش Wagner (۱۹۷۹) اندازه‌گیری شد. به این منظور، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید کلریدریک خالص با نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده شد و عصاره به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، در نهایت محلول بالایی جداسازی و میزان جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس رابطه‌ی (۳) محاسبه شد.

$$A = \epsilon bc$$

رابطه (۳)

A = جذب، ϵ = ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول، b = عرض کووت و c = غلظت محلول مورد نظر می‌باشد.

سنجش میزان فلاونوئید: برای سنجش میزان فلاونوئید، ۰/۱ گرم وزن تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵ درصد و اسیداستیک گلاسیال به نسبت حجمی

مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته با خط کش، شاخص سطح برگ (با نرم افزار Digimizer v4) برای یک متر مربع از سطح مزرعه، وزن خشک برگ و غلاف با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند.

استخراج عصاره آنزیمی: جهت استخراج عصاره آنزیمی

۱ گرم از نمونه برگ با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموزن شده و سپس به آن پنج میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH=۷/۵)، که حاوی EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار بود، اضافه گردید. پس از آن هموزن‌ها به میکروتیوپ منتقل شده و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و با دور $15000 \times g$ سانتریفیوژ شدند. و تا زمان اندازه‌گیری در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری شدند (sairam et al, 2002).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز: سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۸، ۳۳ میکرولیتر ربوفلاوین و ۳۳ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به تیمار شاهد به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytic jena - SPEKOL 1300) در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و بر اساس رابطه‌ی (۱) محاسبه شد.

رابطه (۱):

$$\text{تغییرات جذب در حضور آنزیم 1-SOD} = 2 \times \frac{\text{تغییرات جذب در غیاب آنزیم SOD}}{\text{آنزیم واحد SOD}}$$

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون- اس ترانسفراز:

فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز طبق روش Naliwajski و Skalodowaska (۲۰۱۴) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنش شامل ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی-مولار با اسیدیته ۶/۲۵، ۲۰۰ میکرولیتر گلوکاتایون ۳۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر ۱- کلرو ۲ و ۴- دی نیتروبنزن ۰/۷۵ (CDNB) میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. میزان جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر و اندازه‌گیری بر اساس رابطه‌ی (۲) محاسبه شد.

اثر متقابل سه گانه تیمارها تنها بر ارتفاع بوته در سطح پنج درصد معنی دار بود (جدول ۱).

ارتفاع بوته: نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر سه گانه تیمارهای آزمایشی بر ارتفاع بوته گیاه نشان داد در مجموع تنش نانوقره موجب کاهش ارتفاع بوته گردید. محلول پاشی اسید سیتریک و کاربرد سولفید هیدروژن تنها در غلظت ۲/۵ گرم در لیتر نانو نقره موجب بهبود ارتفاع بوته نسبت به سطح شاهد گردید (شکل ۱).

شاخص سطح برگ: هر دو غلظت نانو نقره اثر منفی و معنی داری بر شاخص سطح برگ داشتند؛ به طوری که میزان شاخص سطح برگ از ۴/۵ متر مربع در گیاهان شاهد به ۳/۸ و ۳/۹۹ متر مربع به ترتیب در تیمارهای ۱/۲۵ و ۲/۵ گرم بر لیتر نانو نقره رسید. البته بین دو تیمار نانو نقره اختلاف معنی داری از نظر آماری وجود نداشت (شکل ۲-۱). نتایج حاکی از آن بود که مصرف توأم اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن موجب بهبود رشد برگ می شود. اثر برهم کنش اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن روی سطح برگ به گونه ای بود که مصرف اسیدسیتریک در هر دو سطح ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم در لیتر همراه با کاربرد سولفید هیدروژن با غلظت ۰/۶ میلی مولار موجب تولید سطح برگ بیشتری در گیاه (هر دو سطح ۴/۷ مترمربع) گردید (شکل ۲-۲).

وزن خشک برگ: تنش نانوقره باعث کاهش معنی دار در وزن خشک برگ گیاهان لوبیا شد. مقدار این کاهش در هر دو غلظت نانوقره تقریباً یکسان و حدود ۱۲/۵ درصد بود. به طوری که کاربرد غلظت ۲/۵ گرم در لیتر نانو نقره سبب کاهش وزن خشک برگ از ۴۰ گرم در گیاهان شاهد به ۳۴/۵۸ گرم در مترمربع گردید (شکل ۳-۱). نتایج نشان داد که استفاده توأم از اسیدسیتریک (هر دو غلظت) و سولفید هیدروژن وزن خشک برگ را به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش داد. بیشترین

۱:۹۹) به خوبی ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد، پس از خنک شدن میزان جذب آن در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید و برای محاسبه میزان فلاونوئید از منحنی استاندارد کوئرستین استفاده شد (Krizek et al., 1998).

بررسی نشت الکترولیت: به منظور اندازه گیری نشت الکترولیت (EL)، نمونه های برگ از آخرین برگ گسترش یافته گیاه برداشت شده و سپس نمونه ها در فالكون های حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر غوطه ور و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان هدایت الکتریکی آن با استفاده از دستگاه EC متر اندازه گیری شد. پس از آن نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از کاهش دمای آن به دمای محیط، دوباره هدایت الکتریکی آن ها اندازه گیری شد. درصد نشت الکترولیت با استفاده از رابطه ی (۵) محاسبه گردید (Lutts et al., 1995).

رابطه (۵):

$$100 \times (\text{نشت ثانویه} / \text{نشت اولیه}) = \text{درصد نشت الکترولیت}$$

تجزیه و تحلیل آماری: داده های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه شد و میانگین ها با آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

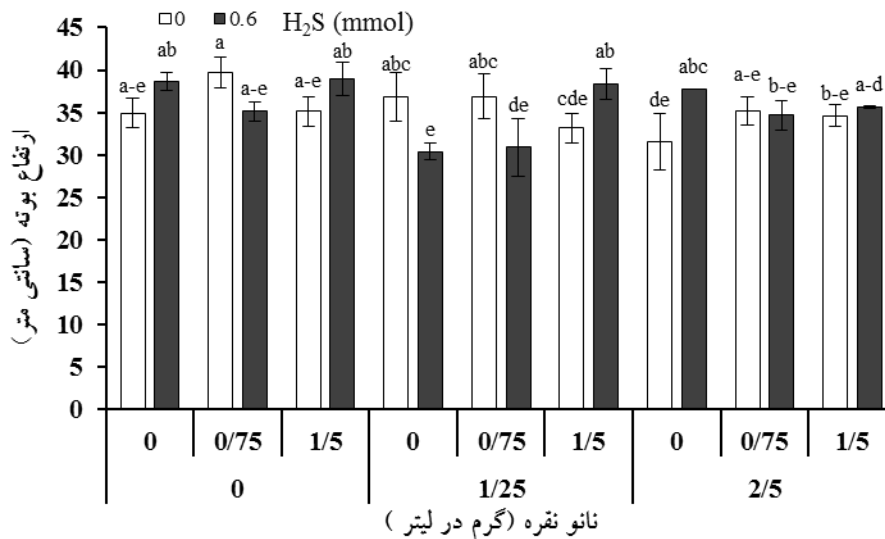
نتایج

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که سه تیمار نانو نقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن روی صفات شاخص سطح برگ، وزن خشک برگ و غلاف تأثیر معنی داری داشتند و صفت ارتفاع بوته فقط تحت اثر معنی دار نانو نقره قرار گرفت. اثر متقابل اسید سیتریک در نانوقره تنها بر وزن خشک غلاف در سطح پنج درصد معنی دار بود. اثر متقابل اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن برای همه صفات مورد ارزیابی معنی دار شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مورد بررسی بر ویژگی‌های رویشی گیاه لوبیا سبز

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	شاخص سطح برگ	وزن خشک برگ	وزن خشک غلاف
بلوک	۲	۵۱/۷۵	۴/۴۵	۱۳۴/۱۸	۳۳۸/۳۶
نانونقره (A)	۲	۳۶/۸۵*	۲/۳۸*	۱۷۸/۵۹**	۶۴۴/۹۸**
اسیدسیتریک (B)	۲	۴/۴۱ ^{ns}	۲/۱۸*	۴۸۰/۸۸**	۴۳۱/۴**
سولفید هیدروژن (C)	۱	۱/۲۴ ^{ns}	۲/۷۶*	۲۶۵/۳۴**	۲۸۶/۳۳*
B×A	۴	۲/۵۴ ^{ns}	۱/۱۴ ^{ns}	۷/۵۴ ^{ns}	۱۷۲/۹۶*
A×C	۲	۲۵/۲ ^{ns}	۰/۴۵ ^{ns}	۲۵/۷۴ ^{ns}	۲۰/۵۲ ^{ns}
B×C	۲	۵۸/۶**	۲/۰۴*	۱۳۸/۱۴*	۳۰۰/۲۸*
A×B×C	۴	۳۰/۰۸*	۱/۰۷ ^{ns}	۵۴/۴۲ ^{ns}	۱۱۱/۲ ^{ns}
خطای آزمایشی	۳۴	۸/۹۴	۰/۵۱۴	۳۳/۱۶	۶۰/۲۶
ضریب تغییرات (درصد)		۸/۴	۱۷/۴۸	۱۵/۸	۱۴/۶

ns، * و **: به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشند.



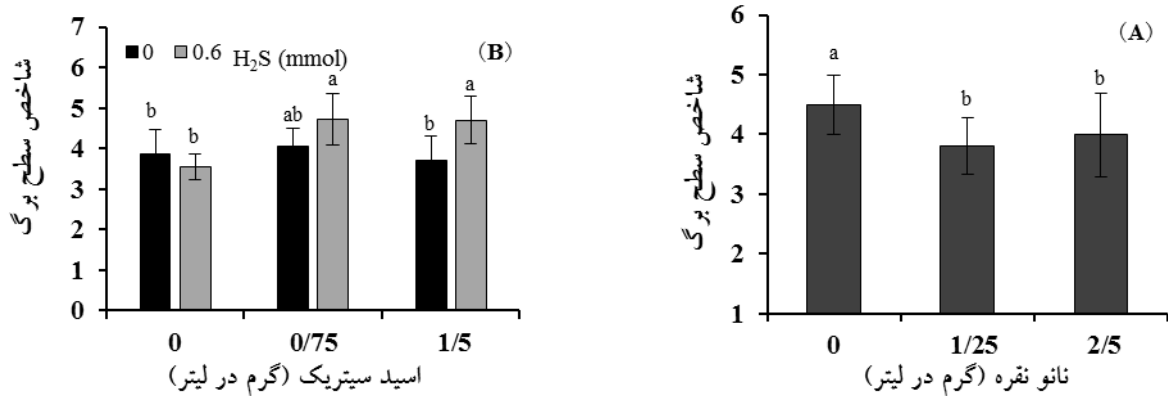
شکل ۱) مقایسه میانگین اثر متقابل نانونقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر ارتفاع بوته در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

میزان این صفت (۴۴/۵۲ گرم در مترمربع) در ترکیب تیماری ۱/۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک و ۰/۶ میلی مولار سولفید هیدروژن به دست آمد که البته اختلاف معنی‌داری با ۰/۷۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک و ۰/۶ میلی مولار سولفید هیدروژن نداشت (شکل ۳-B).
وزن خشک غلاف: در شکل ۴-A دیده می‌شود که تنش نانونقره در دو سطح ۰ و ۰/۷۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک

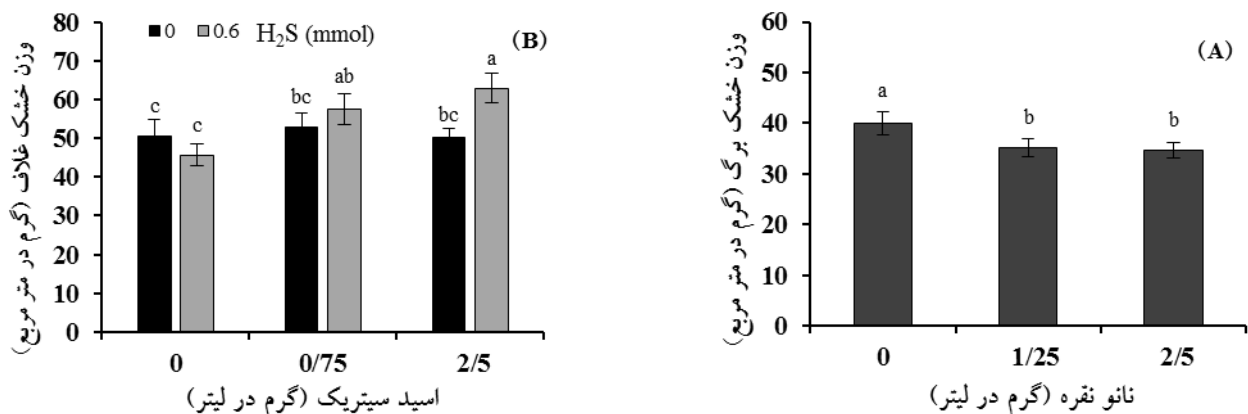
توانست وزن خشک غلاف را به طور قابل توجهی کاهش دهد. در حالی که بالاترین سطح اسیدسیتریک (۱/۵ گرم در لیتر) اثر منفی نانونقره را خنثی کرد و کاهش یا افزایش معنی‌داری رخ نداد. در بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه وزن خشک غلاف در گیاهانی که با نانونقره آلوده نشدند و اسیدسیتریک را با غلظت ۰/۷۵ دریافت کردند، ۱۵/۷ درصد بیشتر از شاهد بود. بررسی برهمکنش اسیدسیتریک و

توانست وزن خشک غلاف را به طور قابل توجهی کاهش دهد. در حالی که بالاترین سطح اسیدسیتریک (۱/۵ گرم در لیتر) اثر منفی نانونقره را خنثی کرد و کاهش یا افزایش معنی‌داری رخ نداد. در بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه وزن خشک غلاف در گیاهانی که با نانونقره آلوده نشدند و اسیدسیتریک را با غلظت ۰/۷۵ دریافت کردند، ۱۵/۷ درصد بیشتر از شاهد بود. بررسی برهمکنش اسیدسیتریک و

توانست وزن خشک غلاف را به طور قابل توجهی کاهش دهد. در حالی که بالاترین سطح اسیدسیتریک (۱/۵ گرم در لیتر) اثر منفی نانونقره را خنثی کرد و کاهش یا افزایش معنی‌داری رخ نداد. در بین ترکیبات تیماری مورد مطالعه وزن خشک غلاف در گیاهانی که با نانونقره آلوده نشدند و اسیدسیتریک را با غلظت ۰/۷۵ دریافت کردند، ۱۵/۷ درصد بیشتر از شاهد بود. بررسی برهمکنش اسیدسیتریک و



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر ساده نانونقره (A) و اثر متقابل اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن (B) بر شاخص سطح برگ گیاه لوبیاسبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ساده نانونقره (A) و اثر متقابل اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن (B) بر وزن خشک برگ در گیاه لوبیاسبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

آنزیم گلوکاتایون-اس ترانسفراز و محتوای مالون دی‌آلدئید، آنتوسیانین و فلاونوئید اثر معنی‌داری گذاشت. اثر متقابل اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن بر تمامی صفات به جز محتوای مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت معنی‌دار بود، همچنین برهمکنش سه گانه تیمارها بر تمامی صفات به جز نشت الکترولیت اثر معنی‌داری گذاشت (جدول ۲).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: اثر متقابل سه گانه تیمارهای آزمایش بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد محلول-پاشی نانونقره موجب افزایش فعالیت این آنزیم در گیاه گردید، به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در

سولفیدهیدروژن نشان داد که کاربرد سولفیدهیدروژن همراه با دو غلظت ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک به ترتیب سبب افزایش معنی‌دار و ۱۱/۷ و ۱۹/۴ درصدی در وزن خشک غلاف لوبیا سبز نسبت به شاهد شد. سایر ترکیبات تیماری اختلافی با شاهد نداشتند (شکل ۴-B).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده تیمارها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوای مالون دی‌آلدئید، آنتوسیانین و فلاونوئید معنی‌دار بود. اثر متقابل دوگانه نانونقره و اسیدسیتریک بر تمامی صفات به جز آنزیم‌ها معنی‌دار بود. برهمکنش نانونقره و سولفیدهیدروژن بر فعالیت



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل نانوقره و اسیدسیتریک (A) و اثر متقابل اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن (B) بر وزن خشک غلاف در گیاه لوبیاسبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مورد بررسی بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه لوبیا سبز

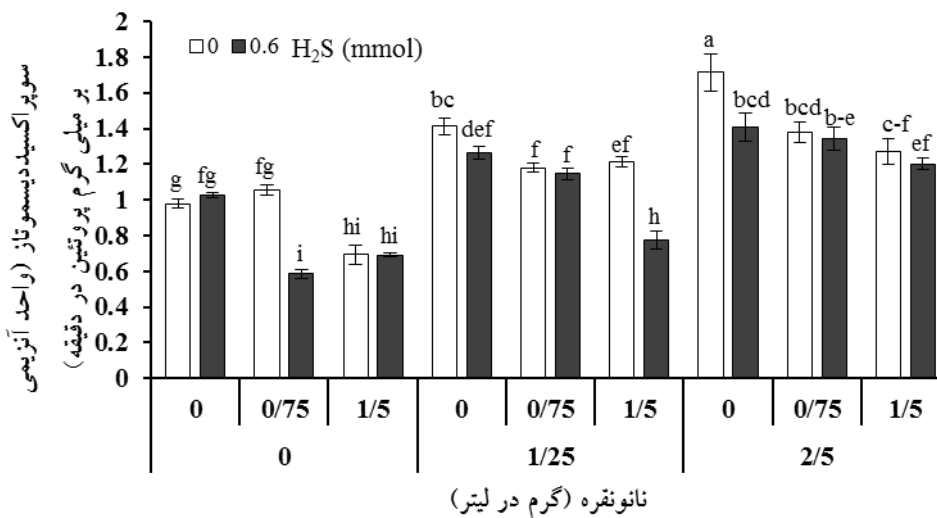
منابع تغییر	درجه آزادی	سوپراکسید دیسموتاز	گلوتاتیون-اس-ترانسفراز	مالون دی آلدهید	آنتوسیانین	فلاونوئید	نشست الکترولیت
بلوک	۲	۰/۰۰۷	۰/۰۱۸	۰/۱۸۴	۰/۰۱۷	۰/۰۱	۱۶/۴۷۴
نانوقره (A)	۲	۰/۸۱۹**	۰/۴۶۲**	۰/۱۹۲**	۴/۷۱۶**	۲/۷۱۶**	۲۴۴/۸۶**
اسید سیتریک (B)	۲	۰/۶۸۱**	۰/۲۱۳**	۰/۱۳۳**	۴/۵۵۱**	۱/۲۹۷**	۱۰/۸۰۲ ^{ns}
سولفید هیدروژن (C)	۱	۰/۳۵۸**	۰/۵۵۶**	۰/۷۰۶**	۶/۶۲۱**	۵/۱۳۷**	۳۷/۸۰۷**
B×A	۴	۰/۰۱۸ ^{ns}	۰/۰۰۸ ^{ns}	۰/۰۴۲*	۰/۷۸۹**	۰/۲۲۸**	۱۴/۳۳۶*
A×C	۲	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۴۵۴**	۰/۰۴۳*	۰/۶۹۲**	۰/۱۱۷*	۳/۰۲۷ ^{ns}
B×C	۲	۰/۰۹۵**	۰/۰۶۰**	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۰۳۶**	۰/۲۸۶**	۵/۵۷ ^{ns}
A×B×C	۴	۰/۰۳۰۶**	۰/۰۶۱**	۰/۰۳۲*	۰/۳۵۸**	۰/۵۶**	۴/۶۵۷ ^{ns}
خطای آزمایشی	۳۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸۸	۰/۰۱۱	۰/۰۰۶	۰/۰۲۹	۴/۸۶۱
ضریب تغییرات		۷/۵۴	۱۳/۰۶	۹/۷	۱/۵	۳/۸	۴/۱

ns، * و **: به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشند.

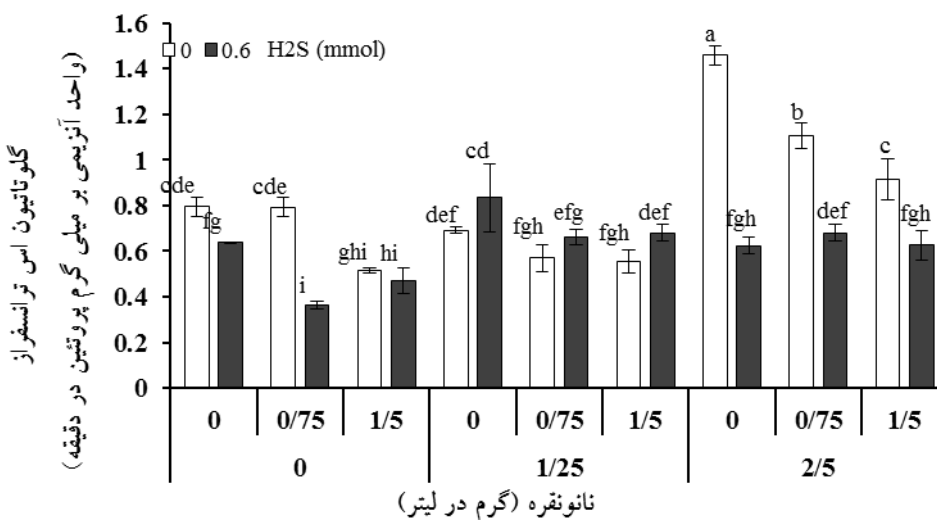
داده شده است. طبق نتایج با افزایش غلظت نانوقره میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت. کاربرد تیمار اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن موجب کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس-ترانسفراز در سطح ۲/۵ گرم در لیتر نانوقره نسبت به سطح شاهد شد. بیشترین فعالیت این آنزیم در غلظت ۲/۵ نانوقره و عدم کاربرد اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن با ۸۳/۵ درصد افزایش نسبت به سطح شاهد (عدم کاربرد هر سه تیمار) بود در حالی که کمترین فعالیت آنزیم گلوتاتیون-اس ترانسفراز با

سطح ۲/۵ گرم در لیتر و عدم کاربرد اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن با ۴۲/۹ درصد افزایش نسبت به سطح شاهد مشاهده شد. در سطح صفر نانوقره کمترین میزان فعالیت آنزیمی با کاربرد غلظت ۰/۷۵ گرم بر لیتر اسیدسیتریک و ۰/۶ میلی مولار سولفید هیدروژن بود (شکل ۵)

آنزیم گلوتاتیون-اس ترانسفراز: نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سه‌گانه نانوقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن برای فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز در شکل ۶ نشان



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نانو نقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

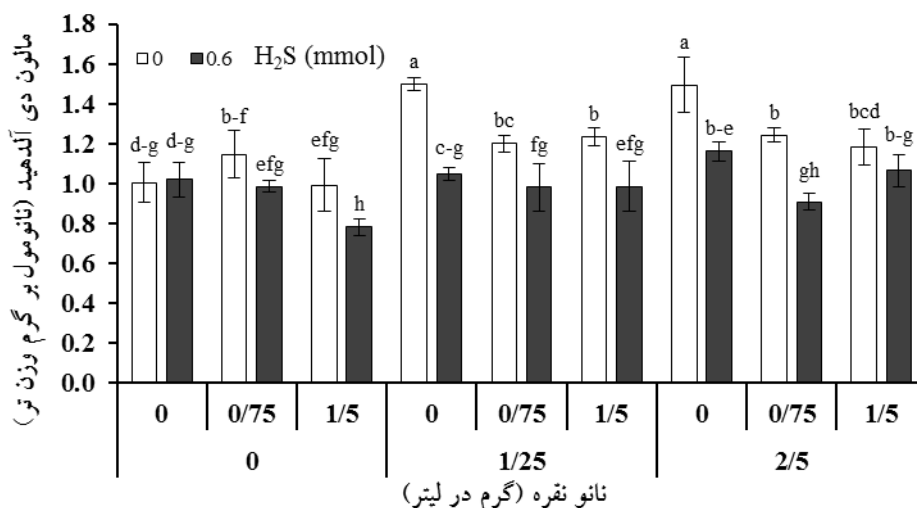


شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل نانو نقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر فعالیت آنزیم گلوکوتایون- اس ترانسفراز در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

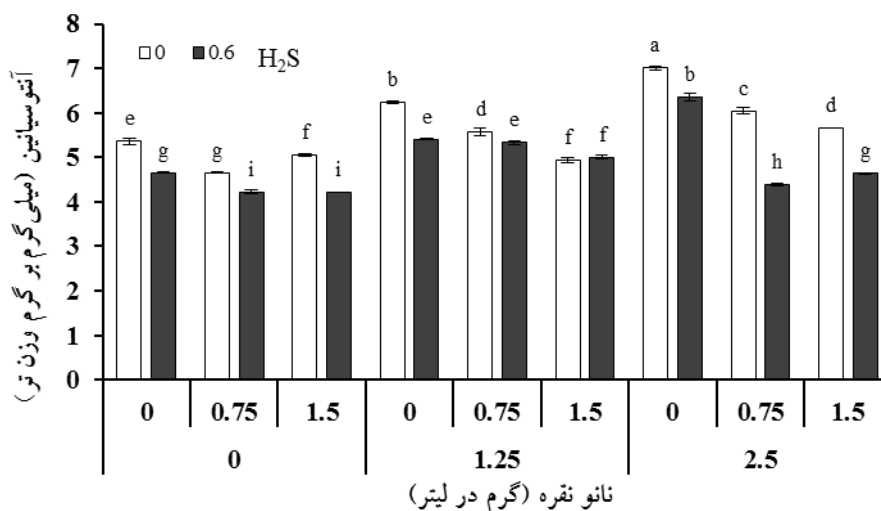
مقادیر این ماده به‌عنوان معیار پراکسیداسیون لیپیدها در برگ گیاهانی ثبت شد که فقط تیمار ۱/۲۵ و ۲/۵ گرم در لیتر نانو نقره را دریافت کرده بودند. مقدار این صفت در این تیمارها حدود ۳۳ درصد بیشتر از شاهد بود که با مصرف اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت طوری‌که در اکثر تیمارها اختلافی با شاهد نداشت. کمترین مقدار دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد (۰/۷۸ نانومول در گرم وزن تر) در

۵۴/۵ درصد کاهش نسبت به سطح شاهد در سطح صفر نانونقره، ۰/۷۵ گرم بر لیتر اسیدسیتریک و ۰/۶ میلی-مولار سولفید هیدروژن مشاهده شد (شکل ۶).

فعالیت مالون دی‌آلدئید: بررسی برهمکنش سه گانه نانونقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر میزان تولید مالون دی‌آلدئید تأیید کننده اثر منفی نانونقره و بروز تنش اکسیداتیو و اثر مثبت سایر تیمارهای آزمایش بود. به‌طوری‌که بالاترین



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل نانو نقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر میزان مالون دی آلدئید در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



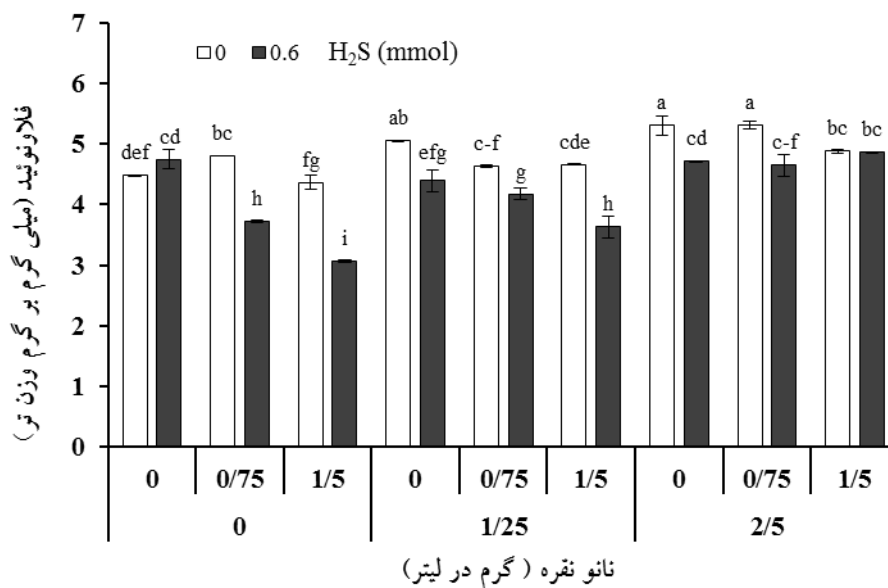
شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل نانو نقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر میزان آنتوسیانین در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

محتوای آنتوسیانین نسبت به سطح شاهد گردید. بیشترین محتوای آنتوسیانین برگ نیز با میزان ۷/۰۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در گیاهان تیمار شده با غلظت ۲/۵ گرم در لیتر نانوقره و عدم کاربرد اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بود (شکل ۸).

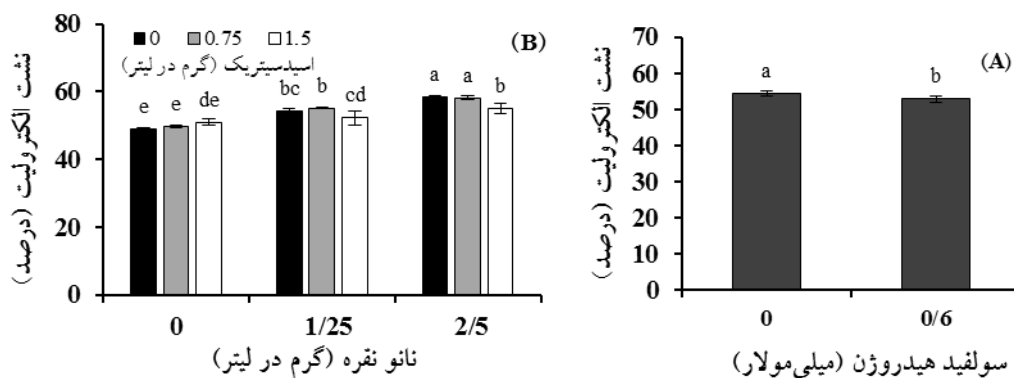
محتوای فلاونوئید کل: اثرات متقابل سه گانه نانوقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر میزان تولید فلاونوئید نشان

شرایط عدم استفاده از نانوقره، ۱/۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک و ۰/۶ میلی‌مولار سولفید هیدروژن به دست آمد (شکل ۷).

محتوای آنتوسیانین: مقایسه ترکیبات تیماری حاصل از برهمکنش سه گانه تیمارها نشان داد که مقدار آنتوسیانین برگ با افزایش تنش نانوقره افزایش یافت اما در هر سطح تیمار نانوقره کاربرد اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن موجب کاهش



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل نانو نقره، اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن بر میزان فلاونوئید در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر ساده سولفید هیدروژن (A) و اثر متقابل نانو نقره و اسیدسیتریک (B) بر درصد نشت الکترولیت در گیاه لوبیا سبز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. بارها در هر ستون نمودار نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

نشت الکترولیت: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد کاربرد سولفید هیدروژن میزان نشت الکترولیت را نسبت به سطح شاهد ۳/۱ درصد کاهش داد (شکل ۱۰-A). در شکل ۱۰-B مشاهده می‌شود که میزان نشت الکترولیت‌ها از غشاء در هر ۶ ترکیب تیماری حاصل از مصرف نانو نقره و اسید سیتریک به‌طور معنی‌دار و بین ۳/۳۳ تا ۹/۳۵ درصد بیشتر از شاهد بود. تنها غلظت بالای اسید سیتریک در شرایط ۲/۵ گرم در لیتر

داد که نانو نقره موجب افزایش محتوای فلاونوئید کل گیاه شده است ولی کاربرد هر دو ترکیب دیگر فلاونوئید را در بیشتر سطوح نانو نقره کاهش داده است، به‌طوری‌که حداکثر مقادیر این ماده در تیمار ۱/۲۵ و ۲/۵ گرم در لیتر نانو نقره، عدم مصرف اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن و نیز تیمار نانو نقره ۲/۵ گرم در لیتر و سولفید هیدروژن و مصرف ۰/۷۵ گرم در لیتر اسیدسیتریک به‌دست آمد (شکل ۹).

نانونقره کاهش معنی‌داری ایجاد کرد که البته نتوانست خیلی اثر منفی نانونقره را جبران کند.

بحث

آلودگی خاک با فلزات سنگین به دلیل فعالیت‌های صنعتی روز به روز در حال افزایش است و به‌عنوان یک خطر عمده زیست‌محیطی برای گیاهان محسوب می‌شود. تنش فلزات سنگین در درجه اول باعث ایجاد اختلال در جذب املاح معدنی و آب توسط ریشه گیاهان و در نهایت موجب کاهش رشد و نمو گیاهان می‌شود (Gul et al., 2019). همان‌گونه که انتظار می‌رفت در این تحقیق تنش نانونقره سبب کاهش سطح برگ، ارتفاع بوته، وزن خشک برگ و وزن خشک غلاف گردید. کاهش توانایی ریشه در جذب مواد غذایی و آب از خاک در شرایط سمیت فلزات سنگین احتمالاً می‌تواند به دلیل تجمع یون‌های فلزی در این اندام و یا آسیب ایجاد شده در سلول‌های نوک ریشه باشد (Ali et al., 2013). Dimkpa و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که نانونقره به سلول‌های ریشه گیاه گندم آسیب می‌زند و در نتیجه رشد و عملکرد گیاه را کاهش می‌دهد. دلیل اصلی کاهش سطح برگ و ارتفاع بوته در شرایط تنش فلز سنگین، کند شدن رشد طولی ریشه و در نتیجه کاهش انتقال آب و مواد غذایی به بخش‌های هوایی گیاه می‌باشد. علاوه بر این تأثیر منفی فلز سنگین بر متابولیسم سلولی اندام‌های هوایی می‌تواند باعث کاهش رشد ساقه و برگ شود (Shanker et al., 2005). Tomislav و همکاران (۲۰۱۷) گزارش دادند که تنش نانونقره با اختلال در رشد و نمو گیاه فلفل، سطح برگ و ارتفاع گیاه را به شدت کاهش می‌دهد. همچنین گزارش شده است که تنش فلزات سنگین فتوسنتز را مختل می‌کند و اثر منفی بر تجمع و انتقال عناصر ضروری در گیاه دارد و از این طریق باعث کاهش رشد و میزان بیوماس گیاهان می‌گردد (Adrees et al., 2015).

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان دادند که تیمار گیاه لوبیا سبز تحت شرایط تنش نانونقره با اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن سبب بهبود فاکتورهای رشدی ذکر شده می‌

شود. اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک، اسیدمالیک و اسیدگزالیک می‌توانند به عنوان کلات‌کننده فلزات عمل کنند و با تشکیل لیگاند با فلز سنگین میزان سمیت آن را برای گیاه کاهش دهند (Nigam et al., 2001). همچنین اسید سیتریک می‌تواند سبب بهبود فرآیندهای متابولیکی مانند افزایش حلالیت و جذب عناصر غذایی شود و از این طریق رشد گیاهان را تقویت کند (Shakoor et al., 2014). همچنین در مطالعه‌ای روی گیاه آفتابگردان، نتایج حاصل نشان داد که مصرف اسیدسیتریک با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار موجب افزایش معنی‌دار سطح برگ و بیوماس گیاه در مقایسه با گیاه شاهد تحت شرایط تنش فلز سنگین کروم می‌شود (Farid et al., 2017). اثرات مثبت اسیدسیتریک در بهبود رشد و نمو و افزایش بیوماس گیاه تحت شرایط تنش فلزات سنگین در گیاهانی مانند ذرت (Wuana et al., 2010) و عدسک آبی (Sallah-Ud-Din et al., 2017) گزارش شده است. سولفیدهیدروژن در شرایط تنش به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل می‌کند و می‌تواند در فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین‌های سیگنالینگ سلولی مانند پروتئین کینازهای فعال شده با میتوزن (MAPK) و همچنین میزان بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش تغییر ایجاد کند و از این طریق رشد و بازده گیاهان زراعی را افزایش می‌دهد (Hancock, 2019). با توجه به مشاهدات Fu و همکاران (۲۰۱۹) تیمار گیاه جو با سولفید هیدروژن موجب افزایش بیوماس گیاهی تحت شرایط تنش کادمیوم می‌شود. همچنین در یک مطالعه استفاده از سولفیدهیدروژن با کاهش میزان سمیت کادمیوم و افزایش جذب عناصر معدنی سبب بهبود رشد و عملکرد گندم شده است (Kaya et al., 2020).

در مطالعه حاضر، میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون-اس ترانسفراز در گیاه لوبیا سبز به‌طور معنی‌داری توسط تنش نانونقره افزایش یافت. از آنجایی که تولید رادیکال‌های آزاد در شرایط طبیعی و بدون حضور تنش‌های زیستی و غیر زیستی نیز در گیاهان صورت می‌گیرد، به نظر می‌رسد کاربرد اسید سیتریک و سولفید هیدروژن توانسته است

سلولی هستند که مقدار آن‌ها در اثر آسیب اکسیداتیو افزایش می‌یابد. فلزات سنگین قادرند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند و سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان شوند (Cuyppers *et al.*, 2016). ROS ناشی از فلزات سنگین می‌تواند به ماکرومولکول‌هایی مانند لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها آسیب برساند و در نهایت منجر به پیری و مرگ محصولات کشاورزی شود (Elbaz *et al.*, 2010). گزارش شده است که ROS حاصل از تنش نانو نقره باعث پراکسیداسیون لیپید دیواره سلولی و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید در گیاهان شمعدانی (Hatami and Ghorbanpour., 2014)، گندم (Anna *et al.*, 2018) و ارزن (Khan *et al.*, 2019) می‌شود. مطالعات انجام شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد که سمیت نانوذره نقره موجب تنش اکسیداتیو و تخریب دیواره سلولی در خیار گردید و نفوذپذیری غشاء را افزایش داد. در حالی که، استفاده از اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن موجب کاهش قابل توجهی در میزان مالون‌دی‌آلدهید و میزان نشت الکترولیت گیاه لوبیای تحت تنش نانونقره در مقایسه با گیاه شاهد شد، این نتیجه نشان دهنده القاء مکانیسم محافظتی توسط اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن می‌باشد که با از بین بردن ROS اضافی باعث کاهش سمیت نیترات نقره می‌شوند. گزارش شده است که اسیدسیتریک و سولفیدهیدروژن از طریق افزایش فعالیت و تولید آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، پاسخ دفاعی گیاه به تنش اکسیداتیو را بهبود می‌بخشد (Zaheer *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2020). طی مطالعات متعدد محققان نشان دادند که کاربرد اسیدسیتریک موجب کاهش آنزیم‌های آنتی-اکسیدان و مالون‌دی‌آلدهید گردید (Shakoore *et al.*, 2014; Afshan *et al.*, 2015; Ehsan *et al.*, 2014). به گزارش Shakoore و همکاران (۲۰۱۴) تیمار اسیدسیتریک با کاهش نفوذپذیری غشاء و پراکسیداسیون لیپیدها به حفظ یکپارچگی، ثبات و فعالیت غشای سلولی گیاه کلزا تحت تنش سرب کمک می‌کند. نتایج مشابه در مورد اثر اسیدسیتریک در کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید در شرایط تنش فلز سنگین در گیاه نعنای

با القاء تأثیر مثبت بر فرایندهای فیزیولوژیکی موجب کاهش تولید رادیکال‌های آزاد گردد و در نتیجه از میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و گلوکاتایون‌اس‌ترانسفراز کاسته شد. سمیت فلزات سنگین سبب افزایش میزان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در گیاهان شده و در نتیجه تنش اکسیداتیو ایجاد می‌شود. گیاهان دارای یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کارآمد متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی هستند که برای از بین بردن ROS استفاده می‌شود. سوپر اکسید دیسموتاز اولین آنزیمی است که در فرآیند سمیت زدایی و تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی در سیتوسول، میتوکندری و کلروپلاست شرکت می‌کند. این آنزیم نقش مهمی در مکانیسم دفاعی گیاه بازی می‌کند (Liu *et al.*, 2009). و با حذف سوپراکسید نقش حیاتی‌تری در سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه نسبت به آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز دارد و سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود. همچنین یکی دیگر از سیستم‌های دفاعی آنزیمی در برابر آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو در گیاهان آنزیم گلوکاتایون-اس‌ترانسفراز است. نقش این آنزیم در شرایط تنش‌های مختلف در گیاهان گزارش شده است (Valentovicova *et al.*, 2009). گلوکاتایون‌اس‌ترانسفراز آنزیمی است که در سمیت زدایی مواد داخلی (متابولیت‌های درون سلول) و خارجی (داروها، حشره‌کش‌ها و فلزات سنگین) دخالت دارد (Hayes and Pulford, 1995). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اثر تنش نانوذرات نقره در گیاهان کرچک (Yasur and Rani, 2013) و گندم (Anna *et al.*, 2018) گزارش شده است. در پژوهشی Gajewska و همکاران (۲۰۰۶) افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گلوکاتایون‌اس‌ترانسفراز را در اندام‌های هوایی گندم تحت تنش نیکل گزارش کردند. در مطالعه حاضر، محتوای مالون‌دی‌آلدهید و میزان نشت الکترولیت گیاه لوبیا سبز به‌طور معنی‌داری توسط تنش نانونقره افزایش یافت. مالون‌دی‌آلدهید و نشت الکترولیت یک شاخص فیزیولوژیکی ارزشمند برای تعیین ثبات و نفوذپذیری غشاء

کردن مکانیسم دفاعی گیاه سمیت نانوقره و در نتیجه میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده نشان دادند که سمیت نانوقره بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه لوبیا سبز اثر منفی دارد. تنش نانوقره با ایجاد اختلال در رشد و نمو طبیعی گیاه لوبیا سبز سبب کاهش بیوماس گیاه می‌گردد. در حالی‌که، استفاده از اسید سیتریک و سولفید هیدروژن با کاهش سمیت نانوقره موجب بهبود رشد و در نهایت افزایش بیوماس گیاه لوبیا سبز می‌شود. همچنین تنش نانوقره سبب افزایش میزان نشتر الکترولیت و مالون‌دی‌آلدهید گردید که گیاه در پاسخ به این تنش میزان آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی از جمله فلاونوئید کل و آنتوسیانین را افزایش داد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون-اس‌ترانسفراز نیز در شرایط تنش نانوقره افزایش یافت. در حالی‌که مصرف اسید سیتریک و سولفید هیدروژن با کم کردن اثرات تنش و کاهش میزان گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، محتوای فلاونوئید کل و آنتوسیانین و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را کاهش داد. در مجموع نتایج بیانگر نقش مثبت اسید سیتریک و سولفید هیدروژن در بهبود و تعدیل شرایط ناشی از تنش نانوذرات نقره در گیاه لوبیا سبز بود که در نهایت میزان رشد و نمو گیاه بهبود یافت.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی و همچنین استفاده از تجهیزات پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد که بدین وسیله سپاسگزاری می‌گردد.

فلغلی نیز گزارش شده است (Kaya, (Khair et al., 2020). Afshar (۲۰۱۹) نتیجه گرفتند که استفاده از سولفید هیدروژن نیز سبب کاهش معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدهید و نشتر الکترولیت در گیاه توت‌فرنگی تنش دیده نسبت به گیاه شاهد می‌شود.

متابولیت‌های ثانویه مواد فعال زیستی با وزن مولکولی کم و یا زیاد هستند که در پاسخ به شرایط نامطلوب محیطی در سلول‌های گیاهی سنتز و تجمع می‌یابند و در محافظت از گیاهان در برابر فشارهای محیطی نقش دارند (Akula and Ravishankar, 2011). در این مطالعه میزان فلاونوئید کل و آنتوسیانین برگ گیاه لوبیا سبز در پاسخ به تنش نانوقره افزایش قابل‌توجهی داشتند. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که شرایط نامطلوب محیطی مانند تنش فلزات سنگین تولید متابولیت‌های ثانویه را تحریک می‌کند، این موضوع بیانگر این است که متابولیت‌های ثانویه گیاهی در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش مشارکت دارند. برخی از متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تنش اکسیداتیو شرکت می‌کنند. ترکیبات فلاونوئیدی می‌توانند با اهدای الکترون یا هیدروژن رادیکال‌های آزاد را از بین ببرند و آسیب‌های حاصل از تنش اکسیداتیو را کاهش دهند (Ashraf et al., 2019). اثر مشابه نانوقره در افزایش میزان فلاونوئید کل در گیاهان *Pennisetum glaucum* (Khan et al., 2019) و *Bacopa monnieri* (Krishnaraj et al., 2012) گزارش شده است. همچنین افزایش تولید آنتوسیانین در گیاه خردل به‌عنوان یک مکانیسم سازگاری با تنش فلزات سنگین در نظر گرفته شده است (Imtiaz et al., 2018). نتایج ما نشان داد که با مصرف اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن میزان فلاونوئید کل و آنتوسیانین در گیاه لوبیا سبز تحت تنش نانو نقره کاهش می‌یابد. چون تولید متابولیت‌های ثانویه تحت شرایط تنش بیشتر می‌شود احتمال دارد که اسیدسیتریک و سولفید هیدروژن با فعال

منابع

- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., and Irshad, M. K. (2015) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 186-197.

- Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F. and Abbasi, G. H. (2015) Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. Environmental Science and Pollution Research 22(15): 11679-11689.
- Ahmad, R., Ali, S., Rizwan, M., Dawood, M., Farid, M., Hussain, A., and Ahmad, P. (2020) Hydrogen sulfide alleviates chromium stress on cauliflower by restricting its uptake and enhancing antioxidative system. Physiologia Plantarum 168(2): 289-300.
- Akula, R., and Ravishankar, G. A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior 6(11): 1720-1731.
- Ali, S., Farooq, M. A., Yasmeen, T., Hussain, S., Arif, M. S., Abbas, F., and Zhang, G. (2013) The influence of silicon on barley growth, photosynthesis and ultra-structure under chromium stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 89: 66-72.
- Anna, B., Barbara, K. and Magdalena, O. (2018) How the surface properties affect the Nanocytotoxicity of silver? Study of the influence of three types of nanosilver on two wheat varieties. Acta Physiologiae Plantarum 40(2): 31.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Mubarik, M. S., Arif, M. S., and Riaz, M. (2019) Abiotic stress-induced oxidative stress in rice. in advances in rice. Research for Abiotic Stress Tolerance: 489-504.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44(1): 276-287.
- Cuypers, A., Hendrix, S., Amaral dos Reis, R., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., and Keunen, E. (2016) Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. Frontiers in Plant Science 7: 470.
- Darkwa, K., Ambachew, D., Mohammed, H., Asfaw, A., and Blair, M. W. (2016) Evaluation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for drought stress adaptation in Ethiopia. The Crop Journal 4(5): 367-376.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 32(1): 93-101.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Martineau, N., Britt, D. W., Haverkamp, R., & Anderson, A. J. (2013) Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. Environmental Science and Technology 47(2): 1082-1090.
- Dinh, Q. T., Li, Z., Tran, T. A. T., Wang, D., & Liang, D. (2017) Role of organic acids on the bioavailability of selenium in soil: A review. Chemosphere 184: 618-635.
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W. and Rizwan, M. (2014) Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 106: 164-172.
- Elbaz, A., Wei, Y. Y., Meng, Q., Zheng, Q., and Yang, Z. M. (2010) Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Ecotoxicology 19(7): 1285-1293.
- Etesami, H. (2018) Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. Ecotoxicology and Environmental Safety 147: 175-191.
- Faraz, A., Faizan, M., Sami, F., Siddiqui, H., and Hayat, S. (2020) Supplementation of salicylic acid and citric acid for alleviation of cadmium toxicity to *Brassica juncea*. Journal of Plant Growth Regulation 39(2): 641-655.
- Farid, M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Abbas, F., Bukhari, S. A. H., and Wu, L. (2017) Citric acid assisted phytoextraction of chromium by sunflower; morpho-physiological and biochemical alterations in plants. Ecotoxicology and Environmental Safety 145: 90-102.
- Farid, M., Ali, S., Saeed, R., Rizwan, M., Bukhari, S. A. H., Abbasi, G. H., & Ahmad, I. (2019) Combined application of citric acid and 5-aminolevulinic acid improved biomass, photosynthesis and gas exchange attributes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on chromium contaminated soil. International Journal of Phytoremediation 21(8): 760-767.
- Farkas, J., Peter, H., Christian, P., Gellego Urrarrego, J.A., Hesselov, M., Tuoriniemi, J., Gustafsson, S., Olsson, E., Hylland, K., Thomas, K. V. (2011) Characterization on the effluent from a nanosilver producing washing machine. Environment International 37(6): 1057-1062.
- Fu, M. M., Dawood, M., Wang, N. H., and Wu, F. (2019) Exogenous hydrogen sulfide reduces cadmium uptake and alleviates cadmium toxicity in barley. Plant Growth Regulation 89(2): 227-237.
- Gajewska, E., Sklodowska, M., Slaba, M. and Mazur, J. (2006) Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, prolin and chlorophyll contents in wheat shoots. Biologia Plantarum 50: 653-659.
- Gul, I., Manzoor, M., Hashmi, I., Bhatti, M. F., Kallerhoff, J., and Arshad, M. (2019) Plant uptake and leaching potential upon application of amendments in soils spiked with heavy metals (Cd and Pb). Journal of Environmental Management 249: 109408.
- Hancock, J. T. (2019). Hydrogen sulfide and environmental stresses. Environmental and Experimental Botany 161: 50-56.
- Hatami, M., and 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.

- Hayes, J. D. Pulford, D., J. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II. *Critical Reviews in Biochemistry and molecular Biology* 30(6):521-600.
- Homaei, M. B., and Ehsanpour, A. A. (2016) Silver nanoparticles and silver ions: oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in vitro. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 57(6): 544-553.
- Imtiaz, M., Mushtaq, M. A., Nawaz, M. A., Ashraf, M., Rizwan, M. S., Mehmood, S., and Ijaz, R. (2018) Physiological and anthocyanin biosynthesis genes response induced by vanadium stress in mustard genotypes with distinct photosynthetic activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 62: 20-29.
- Kaya, C., and Ashraf, M. (2019) The mechanism of hydrogen sulfide mitigation of iron deficiency-induced chlorosis in strawberry (*Fragaria× ananassa*) plants. *Protoplasma* 256(2): 371-382.
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., and Ahmad, P. (2020) Responses of nitric oxide and hydrogen sulfide in regulating oxidative defence system in wheat plants grown under cadmium stress. *Physiologia Plantarum* 168(2): 345-360.
- Khair, K. U., Farid, M., Ashraf, U., Zubair, M., Rizwan, M., Farid, S., and Ali, S. (2020) Citric acid enhanced phytoextraction of nickel (Ni) and alleviate (*Mentha piperita* L.) from Ni-induced physiological and biochemical damages. *Environmental Science and Pollution Research International*:27010-27022.
- Khan, I., Raza, M. A., Khalid, M. H. B., Awan, S. A., Raja, N. I., Zhang, X., and Huang, L. (2019) Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(13):2261.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Ramachandran, R., Abirami, S. M., Mohan, N., and Kalaichelvan, P. T. (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on (*Bacopa monnieri* Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. *Process Biochemistry* 47(4): 651-658.
- Krizek, D. T., Britz, S. J., and Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103(1): 1-7.
- Li, Z. G. (2013). Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 60(6): 733-740.
- Li, Z. G., Ding, X. J., and Du, P. F. (2013) Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-improved heat tolerance in maize and involvement of proline. *Journal of Plant Physiology* 170(8): 741-747.
- Loko, L. E. Y., Toffa, J., Adjatin, A., Akpo, A. J., Orobisi, A., and Dansi, A. (2018) Folk taxonomy and traditional uses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by the sociolinguistic groups in the central region of the Republic of Benin. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 14(1): 52.
- Lutts S. Kinet J.M. and Bouharmont J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 4 (12): 1843–1852.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A. (2010) Interaction between engineered nanoparticles (ENPS) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment* 408: 3053-3061.
- Mehrian, S. K., Heidari, R., and Rahmani, F. (2015) Effect of silver nanoparticles on free amino acids content and antioxidant defense system of tomato plants. *Indian Journal of Plant Physiology* 20(3): 257-263.
- Mostofa, M. G., Saegusa, D., Fujita, M., and Tran, L. S. P. (2015) Hydrogen sulfide regulates salt tolerance in rice by maintaining Na⁺/K⁺ balance, mineral homeostasis and oxidative metabolism under excessive salt stress. *Frontiers in Plant Science* 6: 1055.
- Naliwajski, M.R., Sklodowska, M. (2014). The oxidative stress antioxidant system in cucumber cells during acclimation to salinity. *Biologia Plantarum* 58 (1):47-54.
- Nigam, R., Srivastava, S., Prakash, S., and Srivastava, M. M. (2001) Cadmium mobilisation and plant availability—the impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant and Soil*. 230(1): 107-113.
- OConnor, D., Peng, T., Zhang, J., Tsang, D. C., Alessi, D. S., Shen, Z., and Hou, D. (2018) Biochar application for the remediation of heavy metal polluted land: a review of in situ field trials. *Science of the Total Environment* 619: 815-826.
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V., and Senthil-Kumar, M. (2017) Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in Plant Science* 8: 537.
- Pitura, K., and Arntfield, S. D. (2019) Characteristics of flavonol glycosides in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. *Food Chemistry* 272: 26-32.
- Saffari, V. R., and Saffari, M. (2020) Effects of EDTA, citric acid, and tartaric acid application on growth, phytoremediation potential, and antioxidant response of *Calendula officinalis* L. in a cadmium-spiked calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*: 1-11.

- Sairam R.K. Veerabhadra Rao K. and Srivastava G.C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration J. Plant Science 163(5): 1037-1046.
- Sallah-Ud-Din, R., Farid, M., Saeed, R., Ali, S., Rizwan, M., Tauqeer, H. M., and Bukhari, S. A. H. (2017) Citric acid enhanced the antioxidant defense system and chromium uptake by *Lemna minor* L. grown in hydroponics under Cr stress. Environmental Science and Pollution Research 24(21): 17669-17678.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., and Niazi, N. K. (2017) Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. Journal of Hazardous materials 325: 36-58.
- Shakoor, M. B., Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T. and Abbasi, G. H. (2014) Citric acid improves lead (Pb) phytoextraction in *Brassic napus* L. by mitigating Pb-induced morphological and biochemical damages. Ecotoxicology and Environmental Safety 109: 38-47.
- Shams, G., Ranjbar, M., and Amiri, A. (2013) Effect of silver nanoparticles on concentration of silver heavy element and growth indexes in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Negeen). Journal of Nanoparticle Research 15(5): 1630.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., and Avudainayagam, S. (2005) Chromium toxicity in plants. Environment International 31(5): 739-753.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P. K., Singh, V. P., Singh, S., & Chauhan, D. K. (2017) Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 110: 167-177.
- Valentovicova, k., Huttova, J., Mistrik, I. and Tamas, L. (2009) Effect of biotic stresses on glutathione peroxidase and glutation S-transferase activity in barley root tips. Plant Physiology and Biochemistry 47: 1069-1074.
- Vinković, T., Novák, O., Strnad, M., Goessler, W., Jurašin, D. D., Paradikovic, N., and Vrcek, I. V. (2017) Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annum* L.) exposed to silver nanoparticles. Environmental Research 156: 10-18.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., and Sharma, S. (2017) Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on Brassica sp. Frontiers in Plant Science 8: 1501.
- Vodyanitskii, Y. N. (2013) Contamination of soils with heavy metals and metalloids and its ecological hazard (analytic review). Eurasian Soil Science. 46(7): 793-801.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology 64(1): 88-93.
- Wuana, R. A., Okieimen, F. E., and Imborvungu, J. A. (2010) Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids. International Journal of Environmental Science and Technology 7(3): 485-496.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. South African Journal of Botany 76(2): 167-179.
- Yasur, J. and Rani, P. U. (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. Environmental Science and Pollution Research 20(12) 8636-8648.
- Zaheer, I. E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoor, M. B., Gill, R. A., & Ahmad, R. (2015). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 120: 310-317.
- Zhang, H., Du, W., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., White, J. C., Keller, A., and Zhao, L. (2018) Metabolomics reveals how cucumber (*Cucumis sativus* L.) reprograms metabolites to cope with silver ions and silver nanoparticle-induced oxidative stress. Environmental Science and Technology 52(14): 8016-8026.
- Zhang, H., Jiao, H., Jiang, C. X., Wang, S. H., Wei, Z. J., Luo, J. P., and Jones, R. L. (2010) Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. Acta Physiologiae Plantarum 32(5): 849-857.

Morphological and physiological response of green bean plant to foliar application of citric acid and hydrogen sulfide under nanosilver stress

Mahsa Rafat Alashti¹, Mehdi Baradaran Firouzabadi^{*1}, Ali Dehestani², Ahmad Gholami¹,
Mahdiah Parsaeian¹

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Semnan, Iran

² Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, Iran.

(Received: 29/12/2020, Accepted: 08/03/2021)

Abstract

Increasing use of silver nanoparticles in agriculture and industry attracted more attention to the negative effects of their accumulation in environment. Green bean is one of the most consumed legumes in the world which is cultivated in all regions of the world. In this study, the effect of citric acid and hydrogen sulfide treatment on the morphological and physiological responses of green bean plants under silver nanoparticles stress was investigated. The experiments were performed as factorial based on randomized complete block design with 3 replications in research field of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University in 2018. The results showed that nanosilver stress significantly reduced leaf area, plant height, leaf and pod dry weights and made a significant increase in total flavonoids and anthocyanins content and superoxide dismutase and glutathione-S transferase activities. Nanosilver stress increased malondialdehyde content and electrolyte leakage 33 and 28%, respectively, indicating a high oxidative and cell membrane damage, whereas these values were lower in plants treated with citric acid and hydrogen sulfide. Furthermore, the highest growth indices were observed in control plants, plants treated with inducers and plants under stress, respectively, which indicates the effective role of inducers in stress relief. These results showed that citric acid and hydrogen sulfide mitigated the damage caused by nanosilver stress in green bean plants by reducing free oxygen species accumulation and preventing lipid peroxidation leading to increased growth rate in stressed plants. These findings can be used to reduce crop damages in regions contaminated with nanoparticles.

Keyword: Biomass, electrolyte leakage, heavy metal stress, lipid peroxidation.

Corresponding author, Email: m.baradaran.f@gmail.com