

## پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris L.*) به تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم

عبدالکریم چهرگانی راد Ph.D.\*، فریبا محسن زاده Ph.D.، سمانه معتبرنیا M.Sc. Student، زهره شیرخانی Ph.D. Student

– دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، گروه زیست شناسی، همدان، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Chehregani@basu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۱۶

### چکیده

**هدف:** هدف از این پژوهش اثرات نانو ذرات اکسید آلومینیوم بر روی جوانه‌زنی، رشد ریشه، مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پروتئین کل، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و محتوای کربوهیدرات گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** آزمایش در شرایط کشت گلخانه، به‌صورت کاملاً تصادفی با ۴ تکرار طراحی شد. گیاهان در معرض غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۵ و ۱) گرم بر لیتر نانو اکسید آلومینیوم قرار گرفتند و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تحت تیمار با گیاهان شاهد مقایسه شد.

**نتایج:** بر اساس نتایج به‌دست آمده تیمار با نانو اکسید آلومینیوم اثر مثبتی بر درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، محتوای کلروفیل b و کل، محتوای قندهای محلول و نامحلول داشت. کاهش در محتوای کلروفیل a، محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در نمونه‌های تحت تیمارها در مقایسه با شاهد مشاهده شد. اثر نانو اکسید آلومینیوم بر سرعت جوانه‌زنی بذر و فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج بررسی حاضر تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم بر بیشتر ویژگی‌های تکوینی و فیزیولوژیکی در لوبیا اثر مثبت را نشان داد که بیانگر فقدان اثر مسمومیت نانو ذره مورد مطالعه در غلظت‌های به‌کار رفته است. در مورد برخی از ویژگی‌ها (محتوای کلروفیل a، محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم کاتالاز) اثر کاهشی مشاهده شد که می‌تواند مربوط به مکانیسم‌های مقاومت در گیاه مورد مطالعه باشد.

**واژگان کلیدی:** اکسید آلومینیوم، پاسخ‌های بیوشیمیایی، پاسخ‌های فیزیولوژیکی، لوبیا، نانو ذرات

## مقدمه

نانو ذرات مجموعه‌ای از اتم‌ها یا مولکول‌هایی با ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که می‌توانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوتی نسبت به درشت مولکول‌ها داشته باشند (۱ و ۲). خصوصیات متمایز این ذرات با اندازه کوچک، افزایش سطح ویژه و سطح انرژی آن‌ها مرتبط است. ویژگی‌های خاص نانو ذرات باعث بهره‌برداری از آن‌ها در دامنه گسترده‌ای از کاربرد در لوازم آرایشی، داروسازی، منسوجات، الکترونیته، حس‌گرهای زیستی تا کاتالیزورها شده است (۳).

استفاده از فناوری نانو در کشاورزی همگام با سایر عرصه‌ها در حال گسترش است. عرضه کودهای شیمیایی به صورت نانو ذرات به تازگی مورد توجه قرار گرفته است. نتایج تحقیقات نشان‌دهنده‌ی واکنش‌های مختلف گیاهان بوده است (۴). با بهره‌گیری از نانو کودها عناصر غذایی با سرعتی مناسب و به‌طور تدریجی در تمام فصول رشد گیاه آزاد می‌شوند. این روند آزادسازی تدریجی، آسویی عناصر را به شدت کاهش می‌دهد و بنابراین گیاهان قادر به جذب مواد غذایی بیشتری خواهند بود. تاکنون از فناوری نانو در کشاورزی، صنایع غذایی و علوم دامی استفاده‌های بسیاری شده است. از جمله ایجاد سیستم‌های هوشمند برای پیشگیری و درمان بیماری‌های گیاهی و بازیافت ضایعات حاصل از محصولات کشاورزی (۵).

امروزه استفاده صنعتی از نانو ذرات نیز به سرعت رو به افزایش است. نانو ذرات آزاد در طبیعت، در تماس مستقیم با بدن انسان هستند و به‌نوعی دارای خطر بالقوه برای سلامتی انسان می‌باشند. گیاهان در معرض محیط‌های خاکی، آبی و هوایی هستند. بنابراین نانو ذرات توسط سطوح گیاهی جذب شده، به‌دنبال آن به‌درون گیاه راه یافته و در آن جا باقی می‌مانند و بدین طریق وارد چرخه غذایی می‌شوند (۶).

شیوه‌ی در معرض قرارگیری با نانو ذرات مسیر ورود به گیاه را تعیین خواهد کرد. جذب اتمسفری نانو ذرات فلزی توسط برگ‌ها به اثبات رسیده و توسط فاکتورهای مورفولوژیکی همانند ساختار کرک‌ها، وجود هیپودرم و روزنه‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۷). همچنین تارهای کشنده نقش خود را در جذب ذرات از محیط‌های خاکی و آبی ایفا می‌کنند (۸). نتایج محدودی درباره‌ی پیامدهای زیستی در ارتباط با جذب نانو ذرات توسط گیاهان وجود دارد و سوالات بسیاری درباره‌ی سرنوشت و رفتار

نانو ذرات در گیاهان باقی مانده است (۹). سنجش سمیت نانو ذرات آلومینیوم و سایر اکسیدهای فلزی بر روی نوعی پلانکتون به نام‌های *Daphnia* (۱۰) و *Ceriodaphnia dubia* (۱۱) وابستگی شدید به غلظت را نشان داد. مطالعه‌ای که بر روی *Caenorhabditis elegans* برای بررسی سمیت نانو ذره آلومینیوم انجام شد، نشان داد که در معرض قرار گرفتن با نانو ذره آلومینیوم به‌طور قابل توجهی پاسخ‌های استرسی شدید، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آسیب‌های اکسیداتیو را القا می‌کند (۱۲). همچنین مطالعه بر روی لاین‌های سلولی پستانداران، اثر سمیت بر فعالیت‌های دهیدروژنازهای میتوکندریایی و لیزوزومی و تشکیل وزیکول‌های پیش هسته‌ای (perinuclear) در سلول‌های CHO-K1 بعد از تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم و اکسید تیتانیوم به مدت ۲۴ ساعت را نشان داد (۱۳). شیوه‌های متنوعی از عملکردهای درگیر در سمیت القا شده توسط نانو ذرات در جلبک‌ها پیشنهاد شده است از جمله: برهم‌کنش شیمیایی بین ذرات (۱۴ و ۱۵) و استرس‌های اکسیداتیو که باعث مرگ سلولی می‌شود (۱۶ و ۱۷) و سمیت یون‌ها (۱۸).

هوندریک و سیمون (۱۹) در مطالعه‌ای نشان دادند که اکسید تیتانیوم اثرات سمی و ممانعت‌کننده‌ی رشد بر جلبک سبز *Desmodesms sp.* دارد. در تحقیقات دیگر مشخص شد که نانو ذرات روی و اکسید روی مانع جوانه‌زنی دانه‌های *Lolium perenne* و *Zea mays* می‌شوند. در معرض قرارگرفتن دانه رسته‌های *Lactuca*, *Brassica napus*, *Rhaphanus sativus* و *Cucumis sativus* با نانو ذرات اکسید روی منجر به

از بین رفتن تقریباً کامل ریشه این گیاهان شد (۲۰).

همچنین در تحقیقاتی که بر روی ذرت، خیار و کلم انجام گرفت نانو ذره اکسید آلومینیوم مانع رشد ریشه این گیاهان شد. در مقابل نانو ذرات آلومینیوم سبب افزایش رشد ریشه ترپچه شد (۲۱ و ۲۲).

نانو ذرات آلومینیوم رشد، بیوماس و کارایی فتوسنتزی در گیاه *Lemna minor* را افزایش داد (۲۳). همچنین رضانی و همکاران (۲۴) هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه تیمار شده با نانو ذرات روی-مس از نظر فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسیددسموتاز و آسکوربات‌دسموتاز در گیاه یونجه مشاهده نکردند.

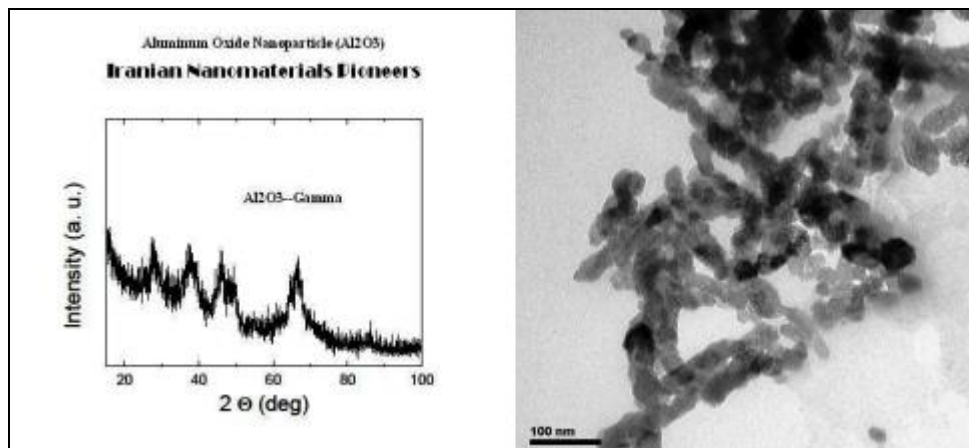
اکسید آلومینیوم بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و شاخص‌های رشد گیاه لوبیا که دارای ارزش غذایی ویژه‌ای است، طراحی و اجرا شد.

### مواد و روش‌ها

**کشت گیاه لوبیا:** بذر گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) رقم شکوفا، از مرکز تحقیقات کشاورزی همدان، در شهریور ماه سال ۱۳۹۳ تهیه و در گلخانه پژوهشی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان، به صورت کشت گلدانی در چهار گروه دوازده تایی کاشته شد. طراحی آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی طرح ریزی شد. گیاهان گروه تیماری با سه غلظت از نانو اکسید آلومینیوم شامل ۰/۱، ۰/۵، و ۱ گرم بر لیتر مورد تیمار قرار گرفت. یک گروه هم به عنوان شاهد انتخاب شد. بعد از گذشت یک ماه، محلول پاشی شروع و تا بعد از گلدهی ادامه پیدا کرد. نانو ذرات مورد استفاده در این پژوهش از شرکت پیشگامان مشهد تهیه شد. نانو اکسید آلومینیوم کاربردی در این پژوهش از نوع گاما، با ۹۹/۹ درصد خلوص و ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر بود (شکل ۱).

گیاه مورد استفاده در این پژوهش، لوبیا (رقم شکوفا) با نام علمی *Phaseolus vulgaris* از تیره Fabaceae بود. تیره حبوبات بعد از تیره کاسنی، تقریباً دومین تیره مهم گیاهان گلدار است که نزدیک به ۴۳۰ جنس و ۱۳۰۰۰ گونه دارد (۲۵). این گیاه بومی آمریکاست. گیاهی یک‌ساله، قد کوتاه، راست یا پیچنده که گل‌های کوچک، سفیدرنگ، برگ‌های سه برگچه‌ای و نیام باریک دارند. لگوم‌ها ارزش غذایی بسیار بالایی دارند. آن‌ها مواد پروتئینی بسیار بیشتری را نسبت به سایر محصولات گیاهی دارا هستند. کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها نیز در لگوم‌ها وجود دارند. پروتئین‌ها به صورت دانه‌های آلرون در سلول‌های مشابه سلول‌های واجد دانه‌های نشاسته دیده می‌شوند. محتوای بالای پروتئین در ارتباط با حضور گرهک‌های واجد باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در ریشه‌های لگوم‌ها می‌باشد. بقولات همچنین به عنوان منبع تغذیه‌ای برای حیوانات اهمیت دارند که در این مورد دانه‌ها، پوسته میوه‌ها و بخش‌های سبز آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. لگوم‌ها در سراسر دنیا کاشته می‌شوند و به عنوان غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۶).

با توجه به اینکه در سال‌های اخیر استفاده از نانو ذرات اکسید آلومینیوم استفاده و کاربرد فراوانی در صنایع مختلف پیدا کرده است و آلودگی‌های زیست محیطی احتمالی قابل پیش بینی است، پژوهش حاضر، با هدف بررسی تاثیر محلول پاشی نانو ذره



شکل ۱: تصویر ذرات نانو اکسید آلومینیوم (سمت راست) توسط میکروسکوپ SEM و طیف اشعه X نانو ذرات اکسید آلومینیوم

**سنجش کمی پروتئین‌ها و فعالیت آنزیمی**

**تهیه محلول عصاره‌گیری:** بدین‌منظور، ۱/۲ گرم تریس، ۰/۱ گرم اسیدآسکوربیک، ۱۷/۲ گرم ساکارز، ۰/۱ گرم سیستئین کلراید و ۲۶/۸ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال را مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر با pH:۷/۵ رسانده شد.

**تهیه عصاره:** یک گرم از بافت تر گیاه را وزن کرده، ۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌گیری را بر روی آن تزریق و محلول حاصل تا مرحله همگن‌سازی سائیده شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌حالت سکون باقی ماند و با دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شد. تمامی مراحل استخراج در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد انجام شد و محلول حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

**سنجش مقدار پروتئین کل:** سنجش کمی پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد (۲۹) انجام گرفت. ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده را در لوله آزمایش ریخته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه کرده و به سرعت ورتکس شد. جذب نمونه‌ها پس از ۲۵ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. محتوای پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) گزارش شد.

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده را در لوله‌آزمایش ریخته و به آن ۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با pH:۴/۸، ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین (۰/۲ مولار در متانول ۵۰ درصد) اضافه کرده و جذب نوری محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت فعالیت آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر محاسبه شد (۳۰).

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز:** بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان کاهش  $H_2O_2$  با مطالعه تغییرات جذب در ۵۳۰ نانومتر انجام شد. ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره‌ی آنزیمی به ۲/۵ میلی‌لیتر تامپون فسفات با pH=۷ و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد افزوده شد. و پس از مخلوط شدن کامل آن‌ها تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر محاسبه شد (۳۱).

**سرعت و درصد جوانه‌زنی:** ابتدا بذره‌های سالم و یکنواخت انتخاب و به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد قرار داده و ضد عفونی سطحی شدند. سپس بذرها چندین بار با آب مقطر شستشو داده و به‌منظور کشت در پتری دیش‌های استریل دارای پنبه و کاغذ صافی قرار گرفتند. به‌منظور انجام مطالعات آماری برای هر گروه تیماری و گروه شاهد ۵۰ بذر در نظر گرفته شد. درصد و سرعت جوانه‌زنی در هر یک از گیاهان مورد تیمار و گروه شاهد طی ۷ روز محاسبه و مقایسه شد. خروج ریشه اصلی از بذر به‌عنوان زمان شروع جوانه‌زنی در نظر گرفته (۲۳) و سپس در صد جوانه زنی بذرها Germination Percentage (GP) از رابطه زیر به‌دست آمد:

$$PG=100(N'/N) \text{ (در صد)}$$

N: تعداد کل بذرها، N': تعداد بذره‌های جوانه زده می‌باشد.

فرمول سرعت جوانه‌زنی (۲۷):

$$ni/Di \text{ GS} = \sum I$$

ni تعداد بذره‌های جوانه‌زده در روزهای شمارش و Di تعداد روز پس از شروع آزمایش.

بذره‌هایی که طبق روش ذکرشده کشت داده شدند، بعد از ۷۲ ساعت مورد اندازه‌گیری طول ریشه قرار گرفتند. طول ریشه در هر ۴ گروه، نسبت به یکدیگر مقایسه شد.

**سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: سنجش رنگیزه‌های**

فتوسنتزی با روش آرنون (۲۸) انجام شد. ۰/۱ گرم برگ تازه گیاه لوبیا را وزن کرده و با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد سائیده شد. بعد از یکنواخت شدن، محلول حاصل را به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۸۰۰ دور در دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ مدل 5417R سانتریفیوژ گردید. درگام بعدی، مجدداً ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به محلول شفاف رویی اضافه کرده، جذب محلول‌ها در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Biowave II ساخت کشور انگلستان) خوانده شد. میزان کلروفیل a، b و کل در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد:

$$a = 12.7 \times A_{663} - 8.26 \times A_{645}$$

$$b = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$(a+b) = 2.02 \times A_{645} + 0.08 \times A_{663}$$

$$A_{645} = \text{میزان جذب در طول موج ۶۴۵}$$

$$A_{663} = \text{میزان جذب در طول موج ۶۶۳}$$

## سنجش کربوهیدرات‌ها (۳۲)

**قندهای محلول:** سنجش قندهای محلول و نامحلول با استفاده از روش فنل-اسیدسولفوریک انجام گرفت. ۰/۱ گرم از ماده خشک اندام گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته شد و پس از یک هفته، ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش رویی محلول برداشته و با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه و بعد از آنکه خوب به هم زده شد به آن ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ اضافه شد، حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار قند از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده شد.

**قندهای نامحلول:** محلول اتانولی حاصل از قندهای محلول را صاف کرده و رسوب حاصل خشک و وزن شد. ۱۰ میلی‌لیتر آب بر روی رسوب ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری در حال جوش قرار گرفت. سپس محلول رویی را صاف کرده و با آب به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول را برداشته و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول فنل ۵ درصد به علاوه ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه و به منظور همگن‌سازی هم‌زده شد. با گذشت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه، میزان جذب محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد.

## آنالیز آماری

در این پژوهش، تمام محاسبات آماری با حداقل ۳ تا ۵ تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1) توسط آزمون دانکن بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excell 2007 رسم شد.

## نتایج

## سرعت و درصد جوانه‌زنی

جدول ۱ اثر تیمار نانو ذرات اکسید آلومینیوم بر درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت نانو ذرات اکسید آلومینیوم در محیط درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه افزایش یافت. از نظر آماری افزایش در درصد جوانه‌زنی در سطح (p ۰/۰۵) و افزایش در طول ریشه در سطح (p ۰/۰۱) معنی‌دار بود. تیمار با نانو ذرات بر سرعت جوانه‌زنی فاقد تاثیر آماری معنی‌دار بود. درصد جوانه‌زنی از ۷۲/۳۳ درصد در نمونه شاهد به ۹۰/۳۳ درصد در تیمار ۱ گرم بر لیتر رسید. اختلاف معنی‌دار در درصد جوانه‌زنی بین تیمار شاهد و غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۵ مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید آلومینیوم (۰، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) بر برخی پارامترهای رشد در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار است.

تیمار	جوانه‌زنی (%)	سرعت جوانه‌زنی (n/d)	طول ریشه (mm)**
شاهد	b1۲/۰۵±۷۲/۳۳	۸/۳۵±۴۹/۴۳	b۳/۲۷±۱۱/۴۶
نانو اکسید آلومینیوم ۰/۰۱ (g/l)	ab۱۳/۳۱±۷۵/۳۳	۷/۴۲±۳۸/۳۳	b۷/۴۵±۱۲/۳۸
نانو اکسید آلومینیوم ۰/۵ (g/l)	ab۷/۲۱±۹۰	۹/۰۹±۵۳/۲۳	a۹/۱۸±۱۸/۶۹
نانو اکسید آلومینیوم ۱ (g/l)	a۶/۵۰±۹۰/۳۳	۵/۷۷±۵۳/۹۳	b۵/۶۳±۱۲/۲

\* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد در سطح p ۰/۰۵

\*\* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد در سطح p ۰/۰۱

NS نتایج فاقد اختلاف آماری معنادار هستند.

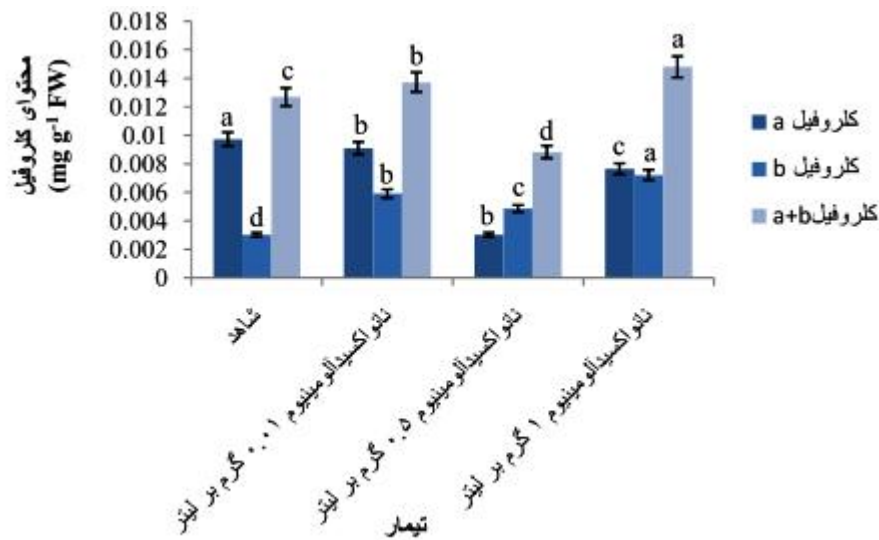
## سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

آنالیز داده‌ها مشخص کرد که اثرات تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم در غلظت‌های مختلف بر روی میزان کلروفیل a، b و  $a \pm b$  از نظر آماری معنی‌دار بوده است (p ۰/۰۱). با افزایش غلظت نانو ذره اکسید آلومینیوم در محیط، میزان کلروفیل a، از

نتایج نشان داد که طول ریشه به میزان ۷/۲۳ میلی‌متر در تیمار ۰/۵ نسبت به شاهد افزایش یافته است. نتایج حاکی از این است که سرعت جوانه‌زنی با افزایش غلظت نانو ذرات افزایش نسبی نشان داد اما از نظر آزمون مقایسه‌ای دانکن این افزایش معنی‌دار نیست.

میلی‌گرم در هر لیتر در هر گرم بافت تازه گیاه کمترین میزان کلروفیل b را دارا بودند. در گروه‌های تیمار شده با نانو ذره اکسید آلومینیوم تغییر محتوای کلروفیل کل افزایش معنی‌داری را نشان داد، بدین‌صورت که میزان کلروفیل کل در نمونه‌های شاهد و گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر نانو ذره اکسید آلومینیوم به‌ترتیب ۰/۰۱۳۷، ۰/۰۰۸۸ و ۰/۰۱۴۸ میلی‌گرم بر لیتر در هر گرم بافت تازه گیاه بود (شکل ۲).

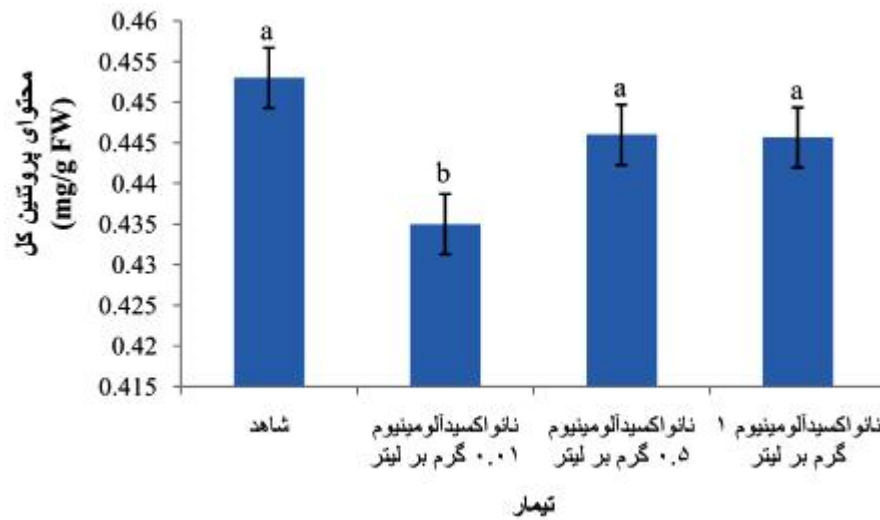
۰/۰۰۹۷ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در گیاهان شاهد، به ۰/۰۰۷۶ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در محیط حاوی ۱ گرم بر لیتر نانو ذره اکسید آلومینیوم کاهش یافت. در این گیاه هم‌زمان با افزایش غلظت نانو ذره اکسید آلومینیوم، میانگین کلروفیل b افزایش یافت. براساس آزمون دانکن میزان کلروفیل b در هریک از تیمارها با میزان کلروفیل b در نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌دار داشت (p = ۰/۰۱)، به‌طوری‌که نمونه‌های با تیمار ۱ گرم بر لیتر، دارای ۰/۰۰۷۲ میلی‌گرم بر لیتر در هر گرم بافت تازه گیاه بیشترین میزان کلروفیل b و گیاهان شاهد با ۰/۰۰۳



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (۰، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) بر محتوای انواع کلروفیل در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

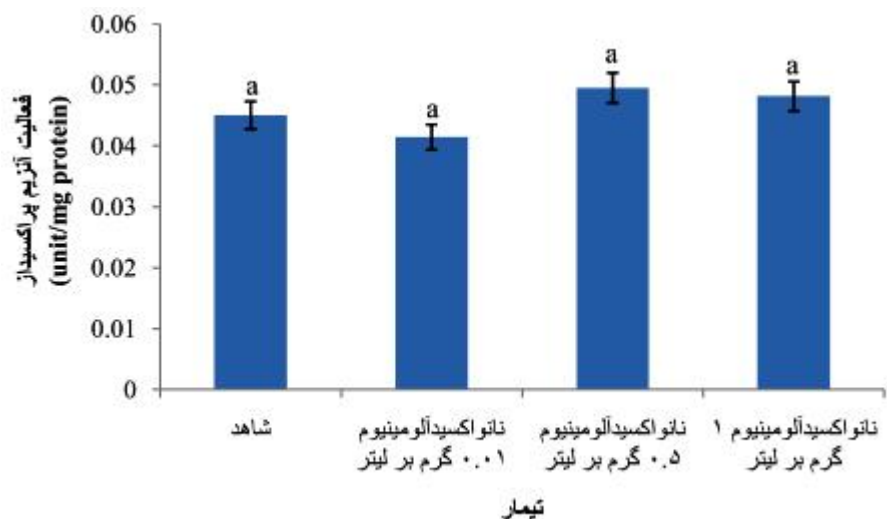
### سنجش کمی پروتئین‌ها و فعالیت آنزیمی

تیمار با نانو ذره اکسید آلومینیوم موجب کاهش در محتوای پروتئین کل شد (شکل ۳). اما کاهش در مقدار پروتئین کل تنها در غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر دارای اختلاف معنی‌دار (p = ۰/۰۵) با گروه شاهد بود.



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (۰، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) بر محتوای پروتئین کل در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

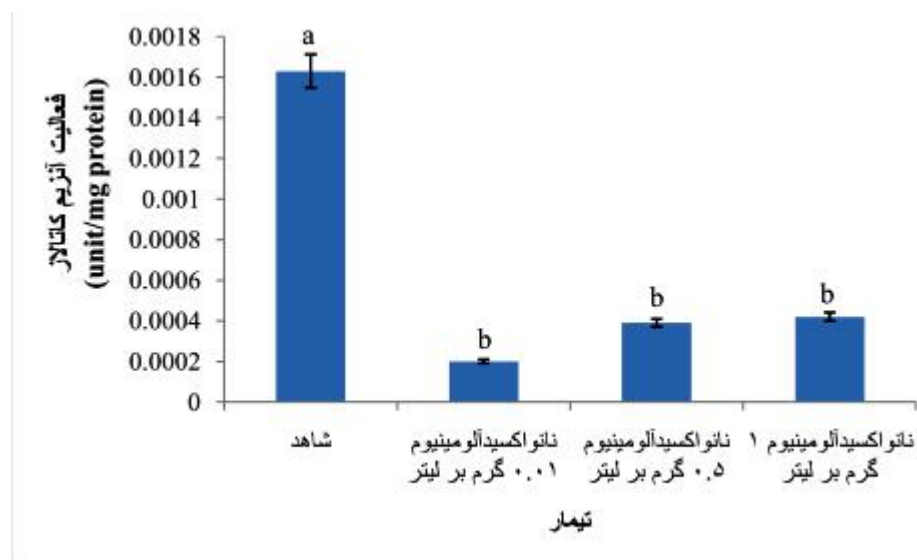
نتایج آزمون مقایسه‌ای دانکن نشان داد که نانو ذره اکسید آلومینیوم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز اثر معنی‌داری نداشته است (شکل ۴).



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (۰، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

پروتئین گزارش شد. این مقدار در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر نانو ذره اکسید آلومینیوم به مقدار ۰/۰۰۰۲، ۰/۰۰۰۳ و ۰/۰۰۰۴ واحد جذب در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین رسید.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز در شکل ۵ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تحت تیمار نانو ذره اکسید آلومینیوم کاهش نشان داد که این کاهش در همه غلظت‌ها معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان شاهد به‌میزان ۰/۰۰۱۶ واحد جذب در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم



شکل ۵: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (۰، ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر لیتر) بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۵ و ۱ گرم در لیتر نانو ذره

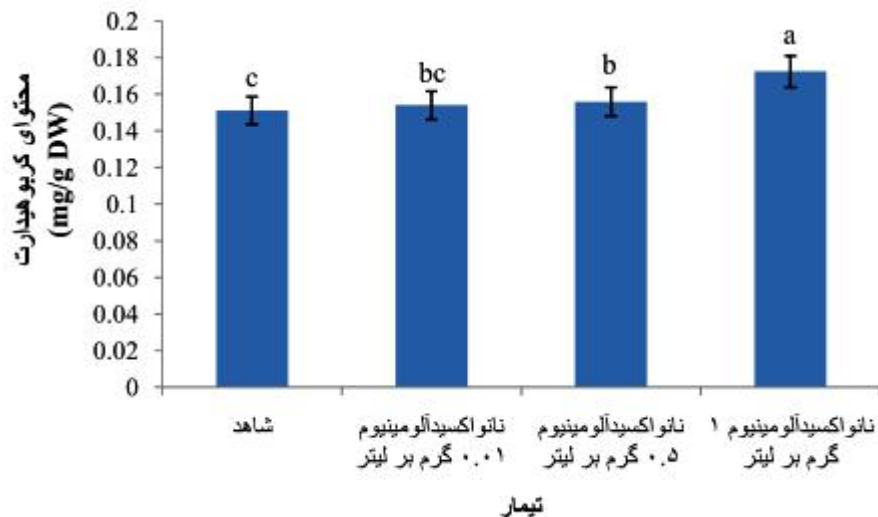
به‌ترتیب دارای ۰/۱۵۴، ۰/۱۵۴ و ۰/۱۷۲ میلی‌گرم قند محلول

در هر گرم بافت خشک گیاهی بودند (شکل ۶).

#### سنجش کربوهیدرات‌ها

بررسی آنالیز داده‌ها نشان داد که اثرات نانو ذره اکسید آلومینیوم بر قندهای محلول معنی‌دار بوده (p < ۰/۰۱) و با افزایش غلظت نانو ذره محیط، به‌تدریج مقدار قند محلول افزایش یافته است. کمترین میزان قندهای محلول ۰/۱۵۱ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی به‌مربوط به گیاهان شاهد بود. در حالی که گیاهان



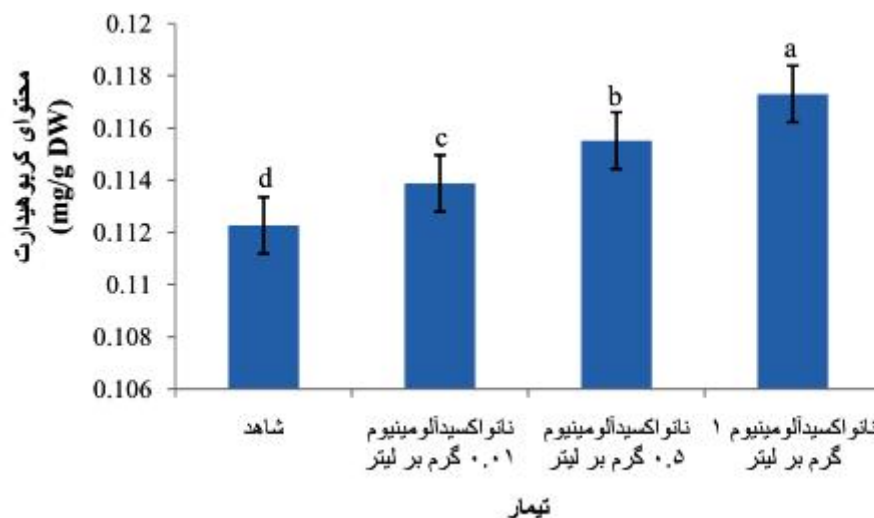


شکل ۶: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (0، 0.01، 0.05 و 0.1 گرم بر لیتر) بر محتوای قندهای محلول در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

(P < 0.01) معنی‌دار بود. میزان قند تامحلول در گیاهان شاهد

0.1122 میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی بود که این میزان در غلظت 0.1 گرم بر لیتر نانو ذره اکسید آلومینیوم به 0.1173 میلی‌گرم افزایش یافت (شکل ۷).

آنالیز داده‌های مربوط به میزان قندهای نامحلول تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نانو ذرات را نشان داد. تاثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم بر میزان قندهای نامحلول در سطح یک درصد



شکل ۷: اثر غلظت‌های مختلف نانو ذره اکسید آلومینیوم (0، 0.01، 0.05 و 0.1 گرم بر لیتر) بر محتوای قندهای نامحلول در گیاه لوبیا. هر ستون معرف میانگین چهار تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند. بیولوژیکی بالقوه این ذرات شده است. گیاهان عالی به شدت با

محیط جوی و زمینی خود در تعامل هستند و انتظار می‌رود با نانو ذرات تحت تاثیر قرار گیرند (۳۳ و ۳۴).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانو ذره اکسید آلومینیوم درصد

## بحث

استفاده صنعتی از نانو ذرات به سرعت در حال افزایش است و این باعث نگرانی در مورد سرنوشت زیست محیطی و اثرات

جوانه‌زنی و طول ریشه گیاه لوبیا را افزایش داده است. افزایش سرعت جوانه‌زنی تحت تاثیر این ذرات از نظر آماری معنی‌دار نبود. علومی و همکاران (۳۵) در مطالعات خود نشان دادند که درصد جوانه‌زنی گیاه شیرین‌بیان در تیمار با نانو اکسید مس کاهش یافته است. در مطالعه‌ی دیگر افزایش جوانه‌زنی ذرت در تیمار با نانو ذره روی گزارش شده است (۲۰) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. دلیل افزایش جوانه‌زنی را می‌توان به نفوذپذیری بالای نانو ذرات به‌درون پوسته بذر و در نتیجه افزایش جذب آب و افزایش جذب نور و فعالیت آنزیم روبیسکو نسبت داد (۳۴ و ۳۶).

در گروه‌های تیماری با نانو اکسید آلومینیوم، طول ریشه نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد. به‌نظر می‌رسد دلیل این افزایش، افزایش قدرت جذب آب در حضور نانو ذرات باشد. قبلا اثر نانو آلومینیوم به‌عنوان تشدیدکننده طول ریشه دانه رسته‌های *Arabidopsis thaliana* نشان داده شده است (۳۷). جاهل و همکاران (۲۲) نشان دادند که نانو ذرات آلومینیوم رشد ریشه *Lemna minor* را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد. افزایش در جوانه‌زنی و رشد گیاهان گوجه‌فرنگی تحت تیمار نانو لوله‌های کربنی از طریق افزایش قدرت جذب آب (۳۸) و همچنین افزایش تحریک رشد اسفناج تحت تیمار نانو اکسید تیتانیوم گزارش شده است (۳۴). نتایج گزارش‌های فوق با نتایج پژوهش حاضر هم‌سو است. در غلظت ۱ گرم بر لیتر روند افزایش متوقف و رشد ریشه کاهش یافت به‌نظر می‌رسد همانگونه که در مطالعات قبلی گزارش شده نانو ذرات آلومینیوم در غلظت‌های بالا اثر مهارکنندگی بر رشد تعدادی از گونه‌های گیاهان دارد (۲۱، ۲۰).

سرعت جوانه‌زنی بذر گیاه لوبیا، تحت تیمار با نانو ذرات آلومینیوم افزایش یافت. اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. تیمار با نانو ذرات در سرعت جوانه‌زنی موثر بوده و رشد گیاه را افزایش می‌دهند. کلید افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر در گروه‌های تحت تیمار یا نانو ذرات، در نفوذ این ذرات به داخل بذرهاست (۳۹). صابر و همکاران (۴۰) اثر دو نوع نانو ماده شامل: نانو رس و نانو نقره بر جوانه‌زنی و رشد بذور کلم‌گل مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داد نانو رس تاثیر مثبت بر درصد و سرعت جوانه‌زنی داشت در حالی‌که نانو نقره به‌طور کامل از جوانه‌زنی

بذور کلم گل ممانعت کرد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که تیمار با ذرات نانو آلومینیوم محتوای کلروفیل *a* را کاهش، کلروفیل *b* و  $a \pm b$  را افزایش داده است. افزایش میزان کلروفیل در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است. ترابیان و همکاران (۴۱) گزارش کردند که محتوای کلروفیل *a* و کلروفیل کل آفتاب‌گردان تحت تیمار کود نانو سولفات آهن به‌ترتیب به میزان ۳۰ و ۱۳ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافته است. در تحقیقی که روی *Pelargonium zonale* انجام گرفت مقدار کلروفیل *a*، *b* و کل در گروه تیمار شده با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره افزایش و سپس در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت (۴۲).

هیچگونه تغییر معنی‌داری برای کلروفیل *a* در *Chlamydomonas reinhardtii* در سطوح مختلف نانو اکسید تیتانیوم مشاهده نشد در حالی‌که محتوای کلروفیل *b* و کارتنوئیدها در گروه‌های تحت تیمار بعد از ۳ و ۴ روز در معرض نانو ذرات قرار گرفتن افزایش یافت (۴۳). طبق نظر آندرسون و همکاران (۴۴) افزایش میزان کلروفیل دلیلی بر فعال بودن سلول‌ها و افزایش تولید مواد قندی آن‌ها است و افزایش مواد قندی از طریق تنظیم تنفس و فشار اسمزی موجب کاهش پیری گل‌ها می‌شود. به‌نظر می‌رسد افزایش میزان کلروفیل با مصرف نانو آلومینیوم از طریق افزایش فعالیت سلولی بوده است.

نتایج نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گروه‌های تیماری با گروه شاهد و کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های تحت تیمار بود. ساز و کار دفاعی گیاهان برای مقابله با خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو و حذف گونه‌های فعال اکسیژن شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و ترکیبات آنتی‌اکسیدانت‌ها است. ساز و کارهای آنزیمی، شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوکاتیون ردوکتاز، دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و غیره، غلظت سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهند. آنتی‌اکسیدانت‌های تولید شده توسط ساز و کارهای غیر آنزیمی در گیاهان نیز شامل ویتامین E، آسکوربات، گلوکاتیون، ترکیبات فلاوونوئیدی، کارتنوئیدها و غیره هستند (۴۵).

عدم اختلاف معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاهش میزان فعالیت کاتالاز ممکن است نشان‌دهنده یک مکانیسم

هستند. در بررسی اثر نانو ذرات نقره بر محتوای پروتئین کل دو رقم Foxi و Flowerfairy گیاه *Pelargonium zonale* مشخص شد که محتوای پروتئین کل در هر دو رقم ابتدا افزایش و سپس به سرعت کاهش یافته است (۴۲). بهبودی و همکاران (۵۱) نشان دادند که با افزایش میزان نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی مقدار پروتئین دانه لوبیا چیتی کاهش یافت که با نتایج مطالعه حاضر همسو است. محتوای پروتئین برگ *Abelmoschus esculantus* در همه‌ی تیمارهای نانو روی به جز ۲۰۰ ppm افزایش یافت (۵۲). به‌طور مشابه پروتئین کل در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ppm تیمار لوبیا و ذرت با نانو ذرات نقره افزایش یافت اما در تیمار ۸۰ و ۱۰۰ ppm کاهش نشان داد (۵۳). نتایج آزمون مقایسه‌ای دانکن نشان داد که با افزایش غلظت نانو اکسید آلومینیوم محیط، مقدار قندهای محلول و نامحلول افزایش یافته است. برخی از تحقیقات نشان داده است که با افزایش غلظت فلزات سنگین، میزان تعادل آب درون سلولی دچار اختلال شده و سبب تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلولی و آنزیم‌های مسیر متابولیسم قندها می‌شود و با افزایش غلظت فلزات سنگین میزان فعالیت آنزیم اینورتاز کاهش می‌یابد. به‌دنبال کاهش میزان انتقال آب به برگ‌ها و تجمع این عناصر سنگین در سلول، میزان کربوهیدرات‌ها در برگ‌ها افزایش می‌یابد. در واقع افزایش قندها یک نوع مکانیسم تطابقی و سازگار یافته برای حفظ و نگهداری پتانسیل اسمزی تحت تنش آلومینیوم است. تجمع کربوهیدرات‌ها در حفظ غشای سلولی و تنظیم اسمزی موثر است (۵۴ و ۵۵).

در تیمار *Abelmoschus esculantus* (L.) Moench با نانو ذره نقره محتوای کربوهیدرات‌ها در تمام غلظت‌ها کاهش یافت (۵۲). محتوای کربوهیدرات‌ها در گیاهان لوبیا و ذرت تیمار شده با غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ppm نانو ذرات نقره افزایش یافت اما در تیمار ۸۰ و ۱۰۰ ppm کاهش نشان داد (۵۳). در تیمار *Ocimum basilicum* با نانو ذرات آهن (Fe3O4) با افزایش غلظت ذرات سطح کربوهیدرات کل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۵۶) که با نتایج پژوهش حاضر همسو است.

### نتیجه گیری

مطالعه‌ی حاضر به‌منظور ارزیابی پاسخ‌های تکوینی و بیوشیمیایی لوبیا به تیمار نانو اکسید آلومینیوم انجام گرفت. نتایج مطالعه

محافظتی بهتر در این گیاه باشد. احتمال می‌رود تنش حاصل از تیمار با نانو ذرات آلومینیوم سبب از بین رفتن سیستم دفاعی شده باشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی را کاهش داده است. بهتر است دیگر آنزیم‌های دخیل در سیستم دفاعی نیز بررسی شود.

حاتمی و همکاران (۴۶) در تحقیقات خود نشان دادند که در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره، تغییر فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در دو رقم شمعدانی (آنتونی و بلوواندر) بعد از پنج روز در شرایط تاریکی از نظر آماری تفاوت معنی‌دار داشت. در تیمار ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات، فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در دو رقم افزایش یافت و سپس با افزایش غلظت نانو ذرات در سطح ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش نشان داد. همچنین افزایش فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز با افزایش غلظت نانو نقره و سپس کاهش فعالیت این دو آنزیم در شمعدانی‌های تحت تیمار مشاهده شده است (۴۲).

در گیاه پرپوش میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در غلظت صفر میکرومول نانو اکسید روی کاهش و سپس در غلظت‌های ۲، ۴ و ۱۰ میکرومول افزایش یافت. (۵).

در گیاهان آفتاب‌گردان که با محلولی از آهن، مس و کادمیوم تیمار شده بودند فعالیت لیپوکسیژناز و پراکسیداسیون بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. برخلاف یون‌های آهن و کادمیوم که سبب کاهش فعالیت سوپراکسید دسموتاز شدند یون مس آن را افزایش داد. البته هر سه یون به کاهش دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتیون‌ردوکتاز و دهیدروآسکوربات) منجر شدند (۴۷). که همسو با نتایج پژوهش حاضر است. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که واکنش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی به فلزات مبهم است و می‌تواند بین گونه‌های گیاهی و حتی بین بافت‌های مختلف یک گیاه متفاوت باشد (۴۸).

نتایج سنجش محتوای پروتئین نشان داد که هم‌زمان با افزایش غلظت آلومینیوم، محتوای پروتئین کل کاهش یافت (کاهش پروتئین تنها در غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر معنی‌دار بود). برخی شواهد وجود دارد که کاهش سنتز پروتئین و افزایش پروتئولیز دلایلی برای کاهش پروتئین در طول تنش هستند (۴۹ و ۵۰). به‌نظر می‌رسد در اینجا نیز کاهش سنتز پروتئین و افزایش پروتئولیز عوامل کاهش دهنده پروتئین در شرایط تیماری

energy budget distribution. *Journal of Hazardous Materials*. 2011; 187(1): 502-8.

12. Yu S, Rui Q, Cai T, Wu Q. et al. Close association of intestinal autofluorescence with the formation of severe oxidative damage in intestine of nematodes chronically exposed to Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-particle. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2011; 32(2): 233-41.

13. Di Virgilio A, Reigosa M, Arnal P, De Mele MFL. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nano-particles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 177(1): 711-8.

14. Dabrunz A, Duyster L, Prasse C, Seitz F, et al. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO<sub>2</sub> nano-particle toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20112.

15. Sadiq IM, Pakrashi S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nano-particles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nano-particle Research*. 2011; 13(8): 3287-99.

16. Armelao L, Barreca D, Bottaro G, Gasparotto A, et al. Photocatalytic and antibacterial activity of TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> nanosystems. *Nanotechnology*. 2007; 18(37):375709.

17. Aruoja V, Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nano-particles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*. 2009; 407(4): 1461-8.

18. Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, et al. Comparative toxicity of nano-particulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*. 2007; 41(24): 8484-90.

19. Hund-Rinke K, Simon M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nano-particles (TiO<sub>2</sub>) on algae and daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research*. 2006; 13(4): 225-32.

20. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nano-particles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*. 2007; 150(2): 243-50.

21. Yang L, Watts DJ. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nano-particles. *Toxicology Letters*. 2005; 158(2): 122-32.

22. Juhel G, Batisse E, Hugues Q, Daly D, et al. Alumina nano-particles enhance growth of *Lemna*

حاضر موثر بودن تیمار با نانو ذرات اکسید آلومینیوم بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک لوبیا را اثبات کرد. نانو ذرات اکسید آلومینیوم سبب افزایش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه، محتوای کلروفیل b و کل، محتوای قندهای محلول و نامحلول و کاهش محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های تحت تیمار با نانو ذرات آلومینیوم در مقایسه با گروه شاهد شد. اثر نانو ذرات اکسید آلومینیوم بر سرعت جوانه‌زنی بذر و فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نبود.

### منابع

1. Ball P. Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology*. 2002; 13(5): R15.
2. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006; 311(5): 622-7.
3. Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E. The ecotoxicology of nano-particles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*. 2008; 17(5): 315-25.
4. Zhu H, Han J, Xiao JQ, Jin Y. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nano-particles by pumpkin plants. *J Environ Monit*. 2008; 10(6): 713-7.
5. Amirjani MR, Askari M, Askari F. Effect of nano zinc oxide on alkaloids, enzymatic and antienzymatic antioxidant contents and some physiological parameters of *catharantus roseus*. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*. 2014; 5(2): 173-83.
6. Dietz K-J, Herth S. Plant nanotoxicology. *Trends in plant science*. 2011; 16(11): 582-9.
7. Da Silva LC, Oliva MA, Azevedo AA, De Araújo JM. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2006; 175(1-4): 241-56.
8. Ove ka M, Lang I, Baluška F, Ismail A, et al. Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma*. 2005; 226(1-2): 39-54.
9. Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A. Interactions between engineered nano-particles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment*. 2010; 408(16): 3053-61.
10. Zhu X, Zhu L, Duan Z, Qi R, et al. Comparative toxicity of several metal oxide nano-particle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2008; 43(3): 278-84.
11. Li M, Czymmek KJ, Huang C. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-particles: a dynamic nano-toxicity assessment of

- minor. *Aquatic toxicology*. 2011; 105 (3): 328-36.
23. Pandey BP. *Textbook of Botany Angiosperms : Taxonomy, Anatomy, Embryology (including tissue culture) and Economic Botany*. Publisher: New Delhi : S. Chand & Co. 2004; 990p.
24. Ramezani F, Shayanfar A, Tavakkol Afshari R, Rezaee K. Effects of silver, nickel, zinc and zinc-copper nano-particles on germination, seedling establishment and enzyme activity of alfalfa (*Medicago sativa*) seed. *Iranian Journal of Field Crop Science*. 2014; 45(1); 107-118.
25. Ghahraman A. *Iranian's Chromophytes (Plant systematic)* Tehran: University Publishing Center; 1993; 504-505.
26. Shakirova FM, Sakhabutdinova AR, Bezrukova MV, Fatkhutdinova RA, et al. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*. 2003; 164(3): 317-22.
27. Agrawal RL. *Seed technology*. India: Oxford & IBH Publishing Co.; 1980. 685 p.
28. Arnon DI. Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Polyphenoloxidase in Beta vulgaris*. *Plant physiology*. 1949; 24(1): 1-15 .
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1): 248-54.
30. Koroi SAA. Gelektrophers tissue and spectral photometris chon under change Zomeinfussdr temperature and structure Peroxidase isoenzyme. *Physiology Vegetation*. 1989; 20:15-23.
31. Chance B, Maehly A. Assay of catalases and peroxidases, *Method enzymology*. 1995; 11:746-775.
32. Kochert G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In: J.A. Hellebust and J.S. Craigie (Editors), *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*. . London: Cambridge University Press; 1978.
33. Monica RC, Cremonini R. Nano-particles and higher plants. *Caryologia*. 2009; 62(2): 161-5.
34. Gao F, Hong F, Liu C, Zheng L, et al. Mechanism of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach. *Biological Trace Element Research*. 2006; 111(1-3): 239-53.
35. Olomi H, Solatani Nezhad R. Effect of Nano-particles of zinc oxide and copper oxide on germination and morphological characteristics *Glycrrhiza glabra* L. seedlings. 1st national conference on plant stresses (abiotic). 2012. University of Esfahan.
36. Boonyanitipong P, Kositsup B, Kumar P, Baruah S, Dutta J. Toxicity of ZnO and TiO<sub>2</sub> Nano-particles on Germinating Rice Seed. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2011; 1: 282-5.
37. Lee CW, Mahendra S, Zodrow K, Li D, et al. Developmental phytotoxicity of metal oxide nano-particles to *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010; 29(3): 669-75.
38. Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M, Xu Y, et al. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano*. 2009; 3(10): 3221-7.
39. Khot LR, Sankaran S, Maja JM, Ehsani R, et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop Protection*. 2012; 35: 64-70.
40. Saber S, Ghasimi Hagh Z, mostafavi Sh. Effects of nano materials on the germination and seedling growth of brassica seeds. 1st NANO Technology and It's Application in Agriculture and Natural Resources conference. 2012. University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran- Karaj.
41. Torabian sh. Zahedi M. Effects of Foliar Application of Common and Nano-sized of Iron Sulphate on the Growth of Sunflower Cultivars under Salinity. *Iranian Journal of Field Crop Science*. 2013; 44(1): 109-118.
42. Hatami M, Ghorbanpour M. Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biology*. 2014; 38(1): 130-9.
43. Chen L, Zhou L, Liu Y, Deng S, et al. Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO<sub>2</sub>) on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012; 84: 155-62.
44. Andersen L, Williams MH, Serek M. Reduced water availability improves drought tolerance of potted miniature roses: Is the ethylene pathway involved?. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 2004; 79(1): 1-13.
45. Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*. 1998; 49(1): 249-79.
46. Hatami M, Hhatamzadeh A, Ghasemnezhad M, Hasan sajadi R, et al. Changes in antioxidant enzymes activity in two *Pelargonium zonale* cultivars by nanosilver particles during dark storage.

- Plant Production Technology. 2014; 13(2): 99-108.
47. Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science. 1996; 121(2): 151-9.
48. Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, El Ferjani E. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). Plant Science. 1997; 127(2): 129-37.
49. Winterbourn CC. Superoxide-dependent production of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Biochemical Journal. 1982; 205(2): 463.
50. Droillard MJ, Bate NJ, Rothstein SJ, Thompson JE. Active translation of the D-1 protein of photosystem II in senescing leaves. Plant Physiology. 1992; 9(2): 589-94.
51. Behboudi F, Allahdadi E, Mohamadi Goltape E. The effect of vermicompost containing copper oxide (CuO) and zinc oxide (ZnO) nano-particles on some characteristics of the wax bean. EJCP. 2013; 6 (2): 33-49.
52. Gokak I, Taranath T. Morphological and biochemical responses of *Abelmoschus esculantus* (L.) Moench to zinc nano-particles. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. 2015; 6(2): 025017.
53. Salama H. Effects of silver nano-particles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). Int Res J Biotech. 2012; 3(10): 190-7.
54. Prasad M. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. Environmental and Experimental Botany. 1995; 35(4): 525-45.
55. Sato F, Yoshioka H, Fujiwara T, Higashio H, et al. Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. Scientia Horticulturae. 2004; 101(4): 349-57.
56. Elfeky AS, Mohammed MA, Khater MS, Osman YAH, et al. Effect of magnetite nano-fertilizer on growth and yield of *Ocimum basilicum* L. International Journal of Indigenous Medical Plants. 2013; 46(3): 1286-1293.

## Developmental and biochemical responses of *Phaseolus vulgaris* L. to Aluminum oxide nano-particles treatment

Chehregani Rad A, Ph.D., Mohsenzadeh F, Ph.D., Motabarnia S, M.Sc. Student, Shirkhani Z, Ph.D. Student

Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

\* Email corresponding author: Chehregani@basu.ac.ir

Received: 6 Jun. 2015

Accepted: 10 Nov. 2015

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the effect of different concentrations of Aluminum oxide nano-particles on seed germination, root length, and the amounts of photosynthetic pigments, total protein content, and changes in activity of some antioxidant enzymes and carbohydrates content in *Phaseolus vulgaris*.

**Material and methods:** Experiment was performed under greenhouse conditions and completely randomized designed with four replications. Plants were exposed to different concentrations (0.01, 0.5 and 1 g/L) of nano-Aluminum oxide and the physiological and biochemical characteristics of treated plants were compared with control ones.

**Results:** The results showed that treatment by Aluminium oxide nano-particles had a positive impact on the seed germination, root length, total chlorophyll and chlorophyll b content and also sugar content. Decrease in the content of chlorophyll a, protein and catalase activity was observed in the treated plants in comparison to control. Aluminium oxide nano-particle didn't have a significant effect on seed germination speed and peroxidase activity.

**Conclusion:** Based on the results of this study, nano-particles are able to have a positive effect on some developmental and physiological characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. This indicated that applied nano-particles are not toxic in the used concentrations. Decreasing in characteristics (chlorophyll a, total protein and catalase activity) was observed that could be related to plant resistance.

**Keywords:** Aluminium oxide, Biochemical responses, *Phaseolus vulgaris*, physiological responses, nano-particle.