

بررسی تاثیر نانو اکسید روی بر میزان آلکالوئیدها، آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی و برخی شاخص های فیزیولوژی گیاه پرپوش (*Catharantus roseus*)

محمدرضا امیرجانی ^{۱*} Ph.D.، مهتری عسکری ^۱ Ph.D.، فاطمه عسکری ^۲ M.Sc. Student

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-amirjani@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۳

چکیده

هدف: این تحقیق به منظور مطالعه تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی بر روی برخی شاخص های رشدی، مقدار پرولین، آلکالوئیدها و همچنین تغییرات فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدانی انجام گرفت.

مواد و روش ها: آزمایش در شرایط کشت گلخانه، به صورت کاملا تصادفی با ۳ تکرار طراحی شد. گیاهان در معرض غلظت های مختلف ۲، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از نانوکود اکسیدروی قرار گرفتند و تاثیر این غلظت ها بر روی گیاه، با گیاه شاهد که از محلول غذایی کامل که حاوی سولفات روی است مقایسه شد. همچنین به منظور بررسی علائم کمبود روی، از غلظت صفر میکرومولار استفاده شد.

نتایج: تیمار گیاه با نانو اکسیدروی در غلظت ۲ سبب افزایش و در غلظت های بالاتر از ۲ میکرومولار به طور معنی داری سبب کاهش در وزن تر و خشک و طول ریشه شدند. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاهان تیمار شده با نانو اکسید روی نسبت به گیاه کنترل با افزایش غلظت نانو اکسیدروی در محلول غذایی افزایش یافت. همچنین مقدار پرولین و آلکالوئیدهای کل با افزایش شدت تنش در گیاه افزایش یافت.

نتیجه گیری: با افزایش غلظت نانو اکسیدروی جذب روی در مقیاس نانو بیشتر صورت گرفته است. به دلیل سمیت ایجاد شده، شاخص های رشدی گیاه کاهش یافته و تنش اکسیداتیو در گیاه القا شده است. گیاه برای مبارزه با رادیکال های آزاد تولید شده فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی خود را افزایش داده است. همچنین میزان پرولین نیز که به هنگام تنش در گیاهان افزایش می یابد، افزایش یافت.

واژگان کلیدی: آلکالوئید، آنزیم های آنتی اکسیدان، پرولین، نانو اکسیدروی

مقدمه

در قبال تنش اکسیداتیو باشد. نانوتکنولوژی، فناوری است که از کنش ها و واکنش هایی که در سطح اتم اتفاق می افتد منشا گرفته و فناوری جدیدی است که تمام علوم را در خواهد نوردید، به تعبیر دقیق تر "نانوتکنولوژی انقلابی جدید برای همه علوم در آینده است". این نانوتکنولوژی قادر به بهبود روش های ارزیابی، مدیریت و کاهش خطرات برای محیط زیست بوده و فرصت هایی را برای تولید محصولات جدید فراهم خواهد ساخت. نانوتکنولوژی در واقع مهندسی در سطح اتم و یا گروهی از اتم ها می باشد. از همین تعریف ساده برمی آید که نانوتکنولوژی یک رشته جدید نیست، بلکه رویکرد جدیدی در تمام رشته هاست. بنابراین علم نانوتکنولوژی توانمندی تولید مواد، ابزارها و سیستم های جدید برای در دست گرفتن کنترل در سطوح مولکولی و اتمی، با استفاده از خواصی که در آن سطوح ظاهر می شود، را دارد (۷). علم نانو می تواند تمام عرصه علوم را تحت تاثیر قرار دهد و علم کشاورزی نیز استثنا نمی باشد یکی از کاربردهای علم نانو در کشاورزی مدیریت تغذیه گیاهی است. با بهره گیری از نانوکودها، عناصر غذایی به آرامی و با سرعتی مناسب در تمام طول فصل رشد گیاه آزاد می شوند و بنابراین به دلیل کاهش شدید آبشویی عناصر، گیاهان قادر به جذب بیشترین مقدار مواد غذایی خواهند بود. تا به حال کاربردهای متعددی از فناوری نانو در کشاورزی، صنایع غذایی و علوم دامی مطرح شده است؛ از جمله ایجاد سیستم های هوشمند برای پیشگیری و درمان بیماری های گیاهی و بازیافت ضایعات حاصل از محصولات کشاورزی. از بین تدابیر موجود در مدیریت آفات کشاورزی استفاده از آفت کش ها و سموم سریع ترین و ارزان ترین روش برای واکنش به یک وضعیت اضطراری است. روش های کنترل زیستی در حال حاضر بسیار هزینه بر هستند. در این روش ها کنترل آفت از طریق یکی از دشمنان طبیعی آن آفت صورت می گیرد. امروزه مصرف بی رویه آفت کش ها مشکلات زیادی را ایجاد کرده اند این مشکلات شامل اثرات سو بر سلامت انسان (ایجاد مسمومیت های حاد یا بیماری های مزمن)، تاثیر این مواد بر حشرات گرده افشان و حیوانات اهلی مزارع و همچنین ورود این مواد به آب و خاک و تاثیر مستقیم و غیر مستقیم آن در این نظام های زیستی می باشد.

بررسی ها نشان داده اند که نانو اکسیدروی بر میزان جذب عناصر تاثیر دارد. با افزایش مصرف نانو اکسیدروی میزان روی نیز در گیاه افزایش می یابد. افزایش غلظت روی در ذرت با کاربرد سولفات روی گزارش شده است (۸). آزمایشات مختلف نشان

عناصر معدنی ضروری گیاه که هر کدام دارای نقش های فیزیولوژیکی مشخصی هستند، بر اساس غلظت نسبی آن ها در بافت های گیاهی به عناصر کم مصرف و پرمصرف تقسیم می شوند. از آنجایی که اغلب عناصر کم مصرف مانند روی، مس، کبالت و غیره جز فلزات سنگین نیز طبقه بندی می شوند زمانی که غلظت آن ها در خاک و بافت های گیاهی بالاتر از حد کفایت گیاهی باشد به علت ایجاد مسمومیت، رشد و عمل کرد گیاه را تحت تاثیر قرار می دهند. در بسیاری از مناطق تحت کشت گیاهان، آلودگی فلزات سنگین سبب ایجاد اثرات مخرب بر بیوسفر و اختلال در اکوسیستم های آبی و خشکی آن ها شده است (۱) یکی از بارزترین اثرات این عناصر فلزی سنگین در گیاهان القای تنش اکسیداتیو و ایجاد رادیکال های فعال اکسیژن می باشد. انواع اکسیژن فعال (ROS) به عنوان عوامل اصلی بروز تنش اکسیداتیو از توان اکسیدکنندگی بالایی برخوردار هستند، مولکول های زیستی را مورد تهدید قرار داده، فرایندهای مختلف سلولی را تحت تاثیر قرار داده و با ایجاد اختلال در متابولیسم طبیعی سلول گیاهی منجر به مرگ سلول نیز می شوند. میزان آسیب سلول های تحت تنش فلزات سنگین بستگی به میزان تولید رادیکال های آزاد و ROS و همچنین کارایی مکانیسم های سم زدایی در گیاهان دارد (۲). برای کاهش سمیت فلز در گیاهان، سیستم های آنتی اکسیدان همچنین به عنوان مکانیسم تحمل مورد بررسی قرار می گیرند. سیستم های آنتی اکسیدانی شامل آنزیم های آنتی اکسیدان مثل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، فنل پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و مولکول های آنتی اکسیدان غیر آنزیمی که شامل آسکوربات، آلفا توکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و گلو تاتیون می باشد (۳). سمیت روی باعث القای تنش اکسیداتیو به وسیله تولید رادیکال های آزاد و گونه های اکسیژن فعال (ROS) می شود (۴). مقدار بالای ROS تحت شرایط تنش ایجاد می شود و تولید زیاد این ROS ها مانند سوپراکسید، H_2O_2 و OH^- در گیاهان تحت تنش فلز ایجاد می شود (۵). آنزیم های آنتی اکسیدانی در سلول های گیاهی H_2O_2 را به H_2O تبدیل می کنند و اثر سمیت H_2O_2 را تنظیم می کنند اما آنزیم های CAT، APX و GPX به نظر می رسد که اهمیت بیشتری دارند (۶). نتایج حاصل نشان می دهد که افزایش سطوح آنزیم های آنتی اکسیدانی القا شده به وسیله روی ممکن است به عنوان مکانیسم دفاعی ثانویه

دهند. بنابراین در این بررسی در شرایط صفر میکرومولار احتمالا خروج فسفر از سلول‌های ریشه صورت گرفته است و مقدار فسفر کاهش یافته است. عنصر روی از طریق تاثیر بر میزان جذب و جابه‌جایی عناصر ضروری و نیز اثر بر میزان فعالیت برخی از آنزیم‌ها در جایگاه عمل‌کردشان موجب اختلال در متابولیسم گیاه می‌شود. واکنش متقابل میان فلز روی و آهن در بسیاری از مطالعات گزارش شده است (۱۳). طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، افزایش نانو اکسید روی در محلول غذایی منجر به کاهش سطح آهن در اندام‌های هوایی گیاه پرپوش شده است. محققین نشان داده‌اند که مصرف روی غلظت آهن را کاهش می‌دهد (۱۴).

پرپوش یکی از گیاهان دارویی مهم و از تیره خرزهره می‌باشد. تمام بخش‌های این گیاه دارای آلکالوئید است حتی دانه آن دارای آلکالوئیدهای مهمی از جمله اجمالیسین، سرپنتین، وین‌بلاستین و وین کریستین است. آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین کریستین از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند: این دو آلکالوئید از طریق اتصال به میکروتوبول‌ها و توقف تقسیم سلولی در طی متافاز میتوز، خاصیت ضد توموری داشته و بیش از ۴۰ سال است که در شیمی درمانی بسیاری از سرطان‌ها کاربرد دارند (۱۵).

پژوهش حاضر به‌منظور بررسی مقایسه پاسخ‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه پرپوش به دو فرم روی (سولفات روی موجود در محیط هورگلد و نانو سولفات روی) طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی بذر: بذر گیاه پرپوش (*Catharanthus roseus*) از شرکت پاکان بذر اصفهان در مهر ماه سال ۱۳۹۱ تهیه شد. این بذرها ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی سطحی و سپس ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرهای ضد عفونی شده در بین دو کاغذ صافی مرطوب و استریل قرار گرفتند و به محض جوانه‌زنی به گلدان منتقل شدند.

تهیه و آماده‌سازی نانوذرات اکسید روی: نانوذرات اکسید روی از شرکت پیشگامان نانو مواد مشهد خریداری شدند. برای ساخت غلظت‌های مورد نیاز (۲، ۴، ۵، ۱۰، ۱۵ میکرومولار) ابتدا ۰/۱۶ گرم ماده وزن شد و در ۱۰۰ ml آب مقطر دو بار تقطیر حل شدند و محلول ۲ میلی‌مولار نانو اکسید روی به دست آمد. سپس در دستگاه اولتراسونیک (100 W, 40 KHz) به مدت نیم

داده‌اند که با افزایش کاربرد روی، غلظت روی در ریشه، ساقه و برگ ذرت افزایش می‌یابد به طوری که مقدار آن در اندام‌های هوایی بیشتر از ریشه می‌باشد (۹). افزایش غلظت نانو اکسید روی بر میزان جذب پتاسیم فسفر و آهن نیز موثر است. پتاسیم نقش ویژه‌ای در حیات و بقای گیاهان تحت شرایط تنش محیطی بازی می‌کند و در شرایط کمبود پتاسیم حساسیت گیاهان به تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. به طوری که در شرایط تنش، تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در گیاهان به شدت تحریک می‌گردد. محققان نیاز به پتاسیم بالا را به نقش بازدارندگی پتاسیم در مقابل تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در طی فتوسنتز و اکسید شدن NADPH نسبت داده‌اند (۵). اثر مطلوب کاربرد روی بر غلظت پتاسیم در برنج گزارش شده است. برهم‌کنش مثبت و معنی‌داری بین روی و پتاسیم در گندم نیز مشاهده شده است (۱۰). در مطالعه دیگری نیز کاربرد روی باعث افزایش عناصر بور و پتاسیم در بافت گیاهی برنج گردید (۱۱). یکی از علائم سمیت روی در گیاهان اختلال در جذب فسفر، منیزیم و منگنز می‌باشد (۱۲). هنگامی که روی و فسفر در حد توازن در گیاه وجود دارند سبب افزایش عمل‌کرد می‌شوند ولی وقتی بین فسفر و روی توازن وجود نداشته باشد این دو عنصر دارای اثرات متقابل می‌شوند. اثر متقابل عنصر روی و فسفر در داخل سیستم گیاهی به این صورت است با افزایش مقدار یکی، دیگری در اندام‌های گیاهی کم می‌شود یعنی رابطه روی و فسفر یک رابطه ضدیتی است. برهم‌کنش روی-فسفر در خاک ممکن است به دلیل اختلال در انتقال از خاک به سطح ریشه، افزایش جذب سطحی روی در خاک‌های حاوی اکسیدهای آهن و آلومینیم و کاهش پخشیدگی این عناصر به سمت ریشه نیز باشد. امروزه پذیرفته شده است که برهم‌کنش روی و فسفر در گیاهات اتفاق می‌افتد. روی این قابلیت را دارد که احتمالا با انجام وظایفی در غشا سلولی آهنگ جذب فسفر به وسیله ریشه را کنترل کند. اثر بازدارندگی روی بر تغذیه فسفوری گیاهان به‌طور گسترده توسط محققان گزارش شده است (۱۰). در شرایط کمبود روی (غلظت صفر میکرومولار) فسفر از ریشه‌ها به قسمت‌های هوایی گیاه منتقل می‌شود و علت را آسیب‌دیدگی سیستم کنترل آزاد شدن فسفر از سلول‌های ریشه به آوندهای چوبی ذکر می‌کنند بنابراین با افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی ریشه، غلظت فسفر افزایش می‌یابد اما افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی همان‌گونه که می‌تواند جذب عناصر را زیاد کند، خروج آن‌ها از ریشه را نیز بایستی افزایش

پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی قرائت شد. در صد مهار رادیکال DPPH (%I) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\%I = \frac{\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه مورد آزمایش}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج مورد استفاده در این پژوهش میانگین حداقل ۵ تکرار در هر آزمایش است. اطلاعات به دست آمده توسط روش ANOVA با استفاده از نرم افزار SPSS v.16 و $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

اثر نانو اکسیدروی بر وزن تر و خشک و طول ریشه در جدول ۱ نشان داده شده است. اندازه گیری ها نشان داد که روی در غلظت های پایین نانو اکسیدروی (۲ میکرومولار) باعث افزایش میزان وزن تر و خشک ریشه نسبت به نمونه شاهد می شود، اما این افزایش نسبت به نمونه شاهد معنی دار نیست. این در حالی است که با افزایش غلظت نانو اکسیدروی (۲ میکرومولار به بالا) وزن تر و خشک ریشه نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی داری پیدا می کند. علاوه بر این در غلظت صفر میکرومولار که فاقد روی بوده است نیز وزن تر و خشک ریشه کاهش یافته است و این کاهش نسبت به شاهد معنی دار بوده است. در مورد طول ریشه نیز بیشترین میزان طول ریشه به غلظت ۲ میکرومولار نانو اکسیدروی مربوط است که این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی دار است و با افزایش شدت تنش از طول ریشه کاسته می شود. طول ریشه در غلظت صفر میکرومولار نیز نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی داری داشته است. نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار پرولین گیاهان تیمار شده با نانو اکسیدروی روند افزایشی را نشان می دهد با افزایش شدت تنش میزان پرولین گیاه نیز افزایش یافته است. در غلظت های صفر، دو و چهار میکرومولار میزان پرولین گیاه کاهش یافته است ولی این کاهش نسبت به شاهد معنی دار نبوده است (شکل ۱). نتایج آنالیز واریانس اثر معنی داری ($p < 0.01$) را بر میزان آلکالوئیدهای کل گیاهان پرپوش ۷۰ روزه نشان می دهد. با توجه به شکل ۲ میزان آلکالوئیدهای کل اندازه گیری شده در غلظت صفر میکرومولار نانو اکسیدروی ۷ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته است. اما این کاهش معنی دار نبوده است. به تدریج با افزایش تنش روی

ساعت به منظور پراکنده شدن ذرات قرار گرفتند، سپس یک مگنت مغناطیسی درون محلول قرار داده شد و به مدت یک ساعت بر روی دستگاه استیرر قرار گرفت تا مانع آگلومره شدن نانوذرات شود. از این محلول برای ساخت مقادیر مورد نیاز استفاده شد. برای ساخت غلظت ۲ میکرومولار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده را در ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول هوگلند بدون روی حل شد و به همین ترتیب برای ساخت غلظت ۴ میکرومولار ۲ میلی لیتر، ۵ میکرومولار ۵ میلی لیتر، ۱۰ میکرومولار ۱۰ میلی لیتر و ۱۵ میکرومولار ۷/۵ میلی لیتر، از سوسپانسیون آماده شده به ۱۰۰۰ میلی لیتر هوگلند بدون روی منتقل شدند. در تیمار صفر از هوگلند فاقد روی استفاده شد و از هوگلند کامل دارای سولفات روی هم به عنوان شاهد استفاده شد (۱۶).

کاشت گیاه و اعمال تیمارها: گلدان های با ارتفاع ۲۰ سانتی متری با نسبت مساوی خاک و پرلیت پر شدند سپس بذرهایی که روی کاغذ صافی جوانه زده بودند، به گلدان ها منتقل شدند. کلیه گیاهان در شرایط آزمایشگاهی با دمای 25 ± 3 درجه سانتی گراد در روز و 20 ± 2 درجه سانتی گراد در شب و دوره روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی رشد داده شدند و اعمال تیمارها به صورت یک روز در هفته و به مدت ۱۰ هفته ادامه یافت. برای کم کردن اثرات محیطی، جابه جایی تصادفی گلدان ها در طول دوره رشد انجام گرفت. این طرح به صورت کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در پایان دوره گیاهان برای بررسی تاثیر نانو اکسیدروی برداشت شدند.

اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی: فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کل با معرف DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)، SOD، CAT و GPX به ترتیب از روش های کامکار و همکاران (۱۷)، جیانوپلیتیس و راس (۱۸)، کاکماک و مارسچنر (۱۹) اندازه گیری شد. میزان پرولین و آلکالوئیدهای کل نیز به ترتیب از روش های بیتس و همکاران (۲۰) و عظیمی و همکاران (۲۱) اندازه گیری شد.

ارزیابی مهار فعالیت رادیکال DPPH (Inhibitory %I)

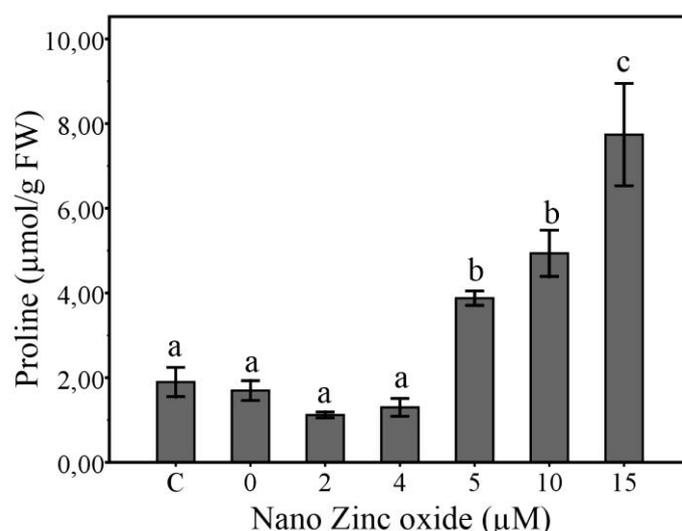
%I (percentage): ۱۰۰ میلی گرم نمونه برگ تازه در اتانول ۹۰ درصد هموزنیزه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس سانتریفوژ شدند. ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی با ۸۰۰ میکرولیتر از DPPH محلول در اتانول (۰/۵ میلی مولار) مخلوط شدند. میزان جذب محلول در ۵۱۷ نانومتر و

گیاکول پراکسیداز نیز با افزایش میزان نانو ذرات، به ترتیب از ۲، ۴ و ۱۰ میکرومول، افزایش یافته است (شکل ۳، ج و د) این نتایج حاکی از این است که افزایش تیمار نانو اکسیدروی موجب القای تنش اکسیداتیو و در نتیجه تولید بیشتر گونه های فعال اکسیژن در گیاه پرپوش شده است. در غلظت صفر میکرومولار میزان فعالیت این آنزیم های آنتی اکسیدان کاهش یافته است و این کاهش در فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کل و گایاکول پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد معنی دار بوده است. اما کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز نسبت به نمونه شاهد معنی دار نبوده است.

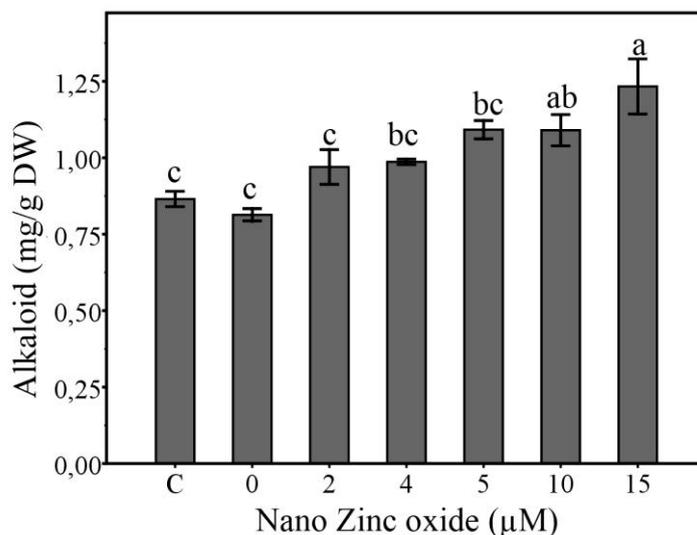
میزان آلکالوئیدهای کل افزایش می یابد به طوری که غلظت های ۲، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار نانو اکسیدروی به ترتیب ۱۶، ۲۸، ۲۸ و ۴۵ درصد نسبت به شاهد افزایش را نشان داده است که البته در غلظت های ۰ و ۲ نسبت به شاهد معنی دار نبودند. نتایج آنالیز واریانس اثر معنی دار ($p \leq 0.01$) غلظت های مختلف نانو اکسیدروی را بر میزان I% (درصد تخریب رادیکال DPPH) را نشان داد. با افزایش شدت تنش میزان I% در گیاهان تحت تیمار نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان I% در غلظت ۱۵ میکرومولار نانو اکسیدروی مشاهده شد (شکل ۳، الف). همانطور که در شکل مشاهده می شود میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز و

جدول ۱: مقایسه میانگین اثر غلظت های مختلف نانو اکسیدروی بر وزن تر و خشک و طول ریشه گیاه پرپوش ۷۰ روزه. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها مطابق آزمون دانکن است. داده ها میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

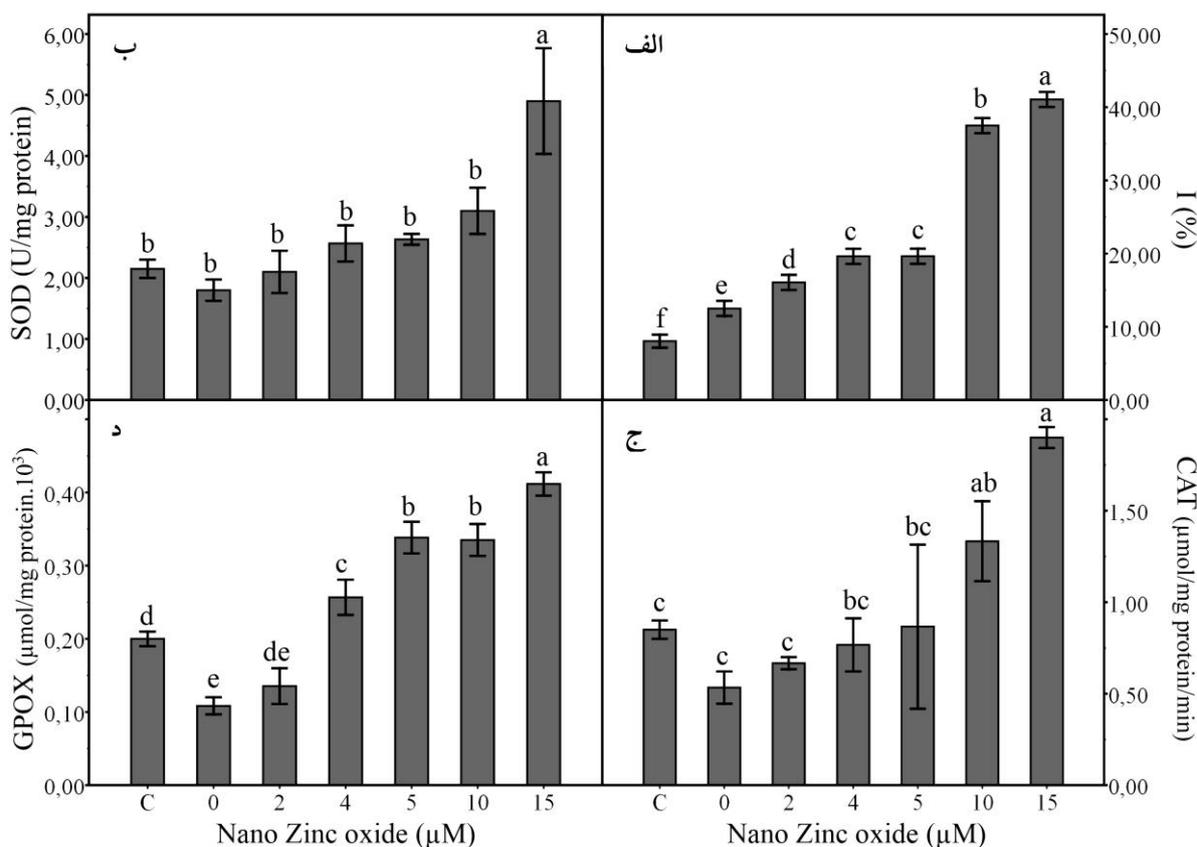
غلظت های مختلف نانو اکسیدروی (میکرومتر)	وزن تر	وزن خشک	طول ریشه
کنترل	۰/۱۱۵ ^a	۰/۰۲۷ ^a	۱۷/۳۳ ^a
۰	۰/۱۱۵ ^b	۰/۰۱۷ ^c	۱۷/۳۳ ^a
۲	۰/۱۲۵ ^{ab}	۰/۰۳ ^{ab}	۱۹/۰ ^a
۴	۰/۰۳۳ ^b	۰/۰۳ ^{bc}	۱۸/۶۷ ^b
۵	۰/۰۸۸ ^b	۰/۰۱۴ ^{bc}	۱۸/۶۷ ^b
۱۰	۰/۰۱۲ ^b	۰/۰۱۲ ^{bc}	۷/۰ ^b
۱۵	۰/۰۱۲ ^b	۰/۰۰۳ ^c	۵/۳۳ ^b



شکل ۱: اثر غلظت های مختلف نانو اکسیدروی (۰، ۲، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) بر میزان پرولین برگ گیاهان پرپوش ۷۰ روزه. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار اختلاف میانگین ها برای هر شاخص می باشد.



شکل ۲: اثر غلظت های مختلف نانو اکسید روی (۰، ۲، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) بر میزان آلکالوئید برگ گیاهان پرپوش ۷۰ روزه. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار اختلاف میانگین ها برای هر شاخص می باشد.



شکل ۳: اثرات غلظت های مختلف نانو اکسید روی (۰، ۲، ۴، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) بر میزان الف) I، ب) SOD (ج) CAT و د) GPOX برگ گیاهان پرپوش ۷۰ روزه. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار اختلاف میانگین ها برای هر شاخص می باشد.

بحث

در غلظت ۲ میکرومولار نانو اکسید روی وزن تر و خشک ریشه افزایش جزئی نسبت به شاهد داشته است اما این افزایش معنی دار نبوده است. کاهش میزان وزن تر و خشک در دو بخش هوایی و ریشه در غلظت های بالای نانو اکسید روی به تنهایی حاکی از عدم ورود آب به درون بافت های گیاهی است. یافته های اخیر حاکی از آن است که کانال های آبی محدود به سلول های جانوری نبوده و در سلول های گیاهی نیز وجود دارند. عناصر سنگین از طریق بلوکه کردن کانال های آبی به واسطه برهم کنش با گروه های سولفیدریل کانال های آبی سبب بسته شدن کانال های آبی و عدم نفوذ آب به درون بافت های گیاهی می شوند، عناصر سنگین با اثر سریع با ارتباطات آبی سلول های گیاهی به علت کاهش سریع قابلیت هدایت آبی سلول ها سمیت خود را آشکار می نمایند و تاثیر بر کاهش قابلیت انتقال آبی غالباً سریع تر و بیشتر از تاثیر سمیت عناصر سنگین بر غشای پلاسمایی در گیاهان آشکار می گردد (۲۲). کاهش وزن می تواند به دلیل افت محتوی آب گیاه و تاثیر آن بر فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تعرق، تنفس و فتوسنتز رخ داده باشد. نتایج حاصل از کاهش وزن تر ریشه با نتایج مورد مطالعه بر روی گیاه *Arabidopsis thaliana* همخوانی دارد (۲۳). تیمار گیاه (*Vigna radiata*) در غلظت های بیش از ۲۰۰ ppm نانو اکسید روی رشد ریشه این گیاه را کاهش داده است (۲۴). همچنین به کار بردن غلظت های بالای نانوذرات اکسید روی در گندم، توقف رشد، کاهش بیوماس را به همراه داشت (۲۵). در این آزمایش در غلظت صفر میکرومولار وزن تر و خشک ریشه کاهش یافته است و این کاهش نسبت به شاهد معنی دار بوده است. کمبود روی به ویژه منجر به کاهش رشد گردیده، زیست توده کمتری تولید شده و در نهایت عمل کرد گیاه کاهش می یابد (۲۶). اثر غلظت های مختلف نانو اکسید روی، به استثنا غلظت ۲ میکرومول، بر طول ریشه گیاه پریش در سطح ۰.۵ درصد معنی دار است. در شرایط تنش روی، رشد طولی ریشه ها کاهش می یابد علل بازدارندگی رشد ریشه را می توان حساسیت زیاد مریستم راس ریشه به فلزات سنگین و اثر روی بر آنزیم ایندول استیک اسید اسیداز در سطح ریشه اشاره کرد (۲۷). کاهش رشد ریشه ها که با کاهش طول و وزن تر آن مشخص می شود منجر به عدم توسعه و گسترش مناسب سیستم ریشه ای شده و با کاهش سطوح جذب کننده و تغییر در ساختار غشای سلولی، جذب آب کاهش یافته، محتوی آب گیاه افت می کند که

این امر بر فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر تعرق، تنفس و فتوسنتز اثر کرده نهایتاً موجب کاهش رشد در سایر بخش های گیاه می شود. در این پژوهش نیز در غلظت صفر میکرومولار طول ریشه ۶۱ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت و این کاهش نسبت به شاهد معنی دار بوده است. طی مطالعاتی مشاهده شده است که کمبود روی باعث کاهش رشد ریشه می شود (۲۸).

اثر غلظت های مختلف نانو اکسید روی بر میزان پرولین

پژوهش ها نشان می دهد که با افزایش غلظت روی مقدار پرولین اندام هوایی افزایش می یابد. پرولین در بهبود استرس های محیطی از جمله استرس های فلزات سنگین در گیاهان و میکروارگانیسم ها نقش مهمی دارد (۲۹). تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش با کاهش خسارت در غشای سلولی و پروتئین ها می باشد (۳۰). سنتز پرولین در کاهش پتانسیل اسمزی سیتوپلاسمی و حفظ نسبت $NADP/NADPH^+$ دخالت دارد (۳۱). همچنین پرولین به عنوان یک اسمولیت، جاروب کننده ی رادیکال ها، تثبیت کننده ماکرومولکول ها و یک جز دیواره سلولی عمل می کند (۳۲). پرولین تثبیت کننده پروتئین و کلات کننده فلزات است و از پراکسیداسیون لیپیدها و گونه های فعال اکسیژن جلوگیری می کند (۳۳). بنابراین در هنگام تنش فلزات سنگین تولید پرولین افزایش می یابد تا گیاه را در مقابل سمیت حفظ نماید. در شرایط تنش گلوتامات که پیش ساز سنتز کلروفیل و پرولین است به سمت تولید پرولین پیش می رود. چهار دلیل برای افزایش تجمع پرولین در حین تنش پیشنهاد شده است که عبارتند از: الف) تحریک سنتز آن از اسید گلوتامیک ب) کاهش صادرات آن از طریق آوند آبکش ج) جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش د) تخریب و اختلال در فرآیند سنتز پروتئین (۳۴). انباشتگی پرولین آزاد در پاسخ به روی، کادمیم و مس در میخک مقاوم و غیرمقاوم مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که غلظت پرولین در برگ های اکوتیپ مقاوم در برابر فلزات مزبور، پنج تا شش برابر بیشتر از اکوتیپ های غیرمقاوم است (۳۵). در این پژوهش نیز با افزایش غلظت های نانو اکسید روی در محلول غذایی، مقدار پرولین در اندام هوایی گیاه پریش افزایش یافت. در غلظت صفر میکرومولار میزان پرولین گیاه کاهش یافته است ولی این کاهش نسبت به شاهد معنی دار نبوده است.

اثر غلظت های مختلف نانو اکسید روی بر میزان آلکالوئیدهای کل

در مطالعه حاضر میزان تجمع آلکالوئیدهای کل با افزایش غلظت نانو اکسید روی افزایش یافته است و این افزایش در غلظت های بیشتر از ۴ میکرومول در سطح ۱ درصد نسبت به نمونه شاهد معنی دار است. آلکالوئیدها در تمام اندام های گیاهی یافت می شوند. میزان آن در بافت گیاه به میزان بیوسنتز و کاتابولیسم گیاه بستگی دارد و این خود نیز به مرحله رشد، وظیفه هر اندام گیاهی و عوامل محیطی دارد. گزارش های زیادی در مورد اثر عوامل محیطی بر میزان آلکالوئیدها وجود دارد. شرایط محیطی بر رشد گیاه و همچنین تشکیل آلکالوئیدها موثر است. بسیاری از آلکالوئیدها در بافت های جوان در حال رشد تشکیل شده، عوامل موثر بر رشد این بافت ها، مانند نفوذ نور، منبع نیتروژن، پتاسیم، فسفر و سایر مواد معدنی، درجه حرارت، رطوبت خاک، و ارتفاع از سطح دریا بر میزان تولید آلکالوئیدها اثر می گذارد (۳۶). در آزمایشی که برای بررسی تاثیر فلزات سنگین بر تجمع آلکالوئیدها در گیاه پرپوش انجام شد محققان مشاهده کردند که استفاده از نیکل، سرب، منگنز و کادمیم در غلظت های ۵ میلی مولار میزان آلکالوئیدهای کل در ریشه این گیاه افزایش یافت. تیمار کادمیم و نیکل دو برابر و سرب سه برابر میزان آلکالوئید را افزایش داد (۳۷). در آزمایشی دیگر که بر روی گیاهان پرپوش که در معرض نیتروژن اضافی قرار گرفته بودند مشاهده شد میزان چهار آلکالوئید وین بلاستین، وین کریستین، وین دولین و کاتارانتین افزایش یافت. آزمایشات نشان داد که گیاهان پرپوش که تحت تنش خشکی قرار گرفته بودند شاخص های رشدی آن ها کاهش یافت اما محتوای آجمالی سین افزایش یافت. در آزمایشی دیگر نیز مشاهده شد طی تنش خشکی، میزان ایندول آلکالوئید در این گیاه (پرپوش) افزایش یافته است (۳۸). در طی تنش زخمی (قطع قسمت هایی از گیاه) نیز میزان آلکالوئیدها در بافت های در حال رشد افزایش می یابد. اما در گیاهانی که بیش از ۵۰ درصد زیتوده از آن ها جدا شده است میزان آلکالوئیدهای گیاه کاهش می یابد (۳۹). در گیاهان پرپوش که تحت تنش آب دریا قرار گرفته بودند و نسبت جذب سدیم به پتاسیم در آن ها افزایش یافته بود مشاهده شد میزان آلکالوئیدهای وین بلاستین، وین کریستین، وین دولین و کاتارانتین افزایش یافت (۴۰). در این تحقیق غلظت صفر میکرومولار مقدار آلکالوئیدهای کل نسبت به شاهد کاهش یافته

است اما این کاهش معنی دار نبوده است.

اثر غلظت های مختلف نانو اکسید روی بر مقدار و فعالیت آن تی اکسیدانی کل

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیا توسط فرایندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون، رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می شود. ترکیب هایی که قابلیت انجام این عمل را دارند به عنوان یک آن تی اکسیدان مطرح می شوند. افزایش میزان I/D (درصد تخریب رادیکال آزاد) همراه با تنش روی به این معنی است که با افزایش شدت تنش مقدار آن تی اکسیدان بیشتری تولید شده و رادیکال های DPPH بیشتری را تخریب کرده است. مطابق با گفته های بالا گیاهان از طریق سیستم دفاعی آن تی اکسیدانی در برابر آسیب های ناشی از تنش از خود محافظت می کنند. به عنوان مثال فعالیت تخریب رادیکال DPPH در گیاه برنج تحت تنش گرما (۲) و در گیاه *Cakile maritime* تحت تنش شوری به طور معنی داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (۴۱). به کارگیری سیلیکون و شوری به صورت جدا بر روی گیاه *Sorghum bicolor* فعالیت تخریب رادیکال DPPH را نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد (۴۲). در غلظت صفر میکرومولار نانو اکسید روی میزان I/D نسبت به شاهد کاهش را نشان داد و این کاهش نسبت به شاهد معنی دار بوده است. همانطور که ذکر شد با افزایش درصد رادیکال های آزاد مقدار DPPH در گیاهان افزایش می یابد (۴۳). در تیمار صفر مقدار رادیکال آزاد کمتری تولید شده، در نتیجه تخریب رادیکال آزاد نیز کمتر صورت گرفته است و در نهایت میزان I% کاهش یافته است.

اثر غلظت های مختلف نانو اکسید روی بر مقدار و فعالیت آن تی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز

در مطالعه حاضر میزان فعالیت SOD با افزایش شدت تنش افزایش یافته است و این افزایش در غلظت ۱۵ میکرومولار نانو اکسید روی نسبت به شاهد در سطح ۰۵ درصد معنی دار بوده است. فراوان ترین ایزوزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان عالی، نوع واجد روی و مس (Cu/Zn SOD) است که در آن روی نقش ساختاری و مس نقش کاتالیتیکی دارد روی به همراه مس بخش اصلی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به عنوان جاروب کننده رادیکال های آزاد تشکیل می دهد. با افزودن روی تولید اکسیژن رادیکال و مراحل فتواکسیداسیون کاهش پیدا می کند زیرا

نتیجه گیری

با توجه به این موضوع که مقدار پرولین در طی تنش افزایش می یابد مشاهده می شود که در این آزمایش نیز با افزایش غلظت، جذب روی در مقیاس نانو بیشتر صورت گرفته، تنش روی ایجاد شده است و با افزایش شدت تنش میزان آلکالوئیدهای کل و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نیز افزایش یافته است.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

- Bonnet M, Camares O, Veisseire P. Effect of Zinc and influence of *Acremonium Lolli* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity of ryegrass. *Experimental botany*. 2005; 51: 945-953.
- Kang HM, Saltveit ME. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*. 2002; 115(15): 577-576.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biology*. 2004; 55: 373-379.
- Weckx JE J, Clijsters H. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol and Biochemistry*. 1997; 35(5): 405-410.
- Galligo SM, Benavides MP, Tomoro ML. Effect of Cd ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Biology*. 1999; 42: 49-55.
- Kersie BD, Leshem Y. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publish. 1994; 1-180.
- Andreta E. Nanosciences and nanotechnologies: what future for research. Future Conference and Expo, Chiba-shi, Chiba, Tokyo. 2003.
- Yilmaz A, Ekis H, Cakmak I. Effect of different zinc application methods on grain yield and zinc concentration in wheat. *Plant Nutrition*. 1997; 20:461-471.
- Hong, W, Ji-Yun J. Effects of zinc deficiency and drought on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in maize (*Zea mays* L.). *Agricultural Sciences in China*. 2007; 6(8): 988-995.

فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در حضور روی افزایش می یابد (۴۴). مشاهده شده است تحت شرایط تنش روی میزان فعالیت SOD در گیاه توت *Murus alba* افزایش می یابد (۴۵). در این آزمایش در غلظت صفر میکرومولار نانو اکسیدروی ۱۹ درصد فعالیت SOD نسبت به شاهد کاهش یافته است اما این کاهش نسبت به شاهد معنی دار نبوده است.

اثر غلظت های مختلف نانو اکسیدروی بر مقدار و فعالیت آنتی اکسیدان کاتالاز

با افزایش شدت تنش روی آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله کاتالاز افزایش می یابد (۴۶). کاتالاز آنزیم مهمی است که در سیستم دفاعی برای تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 به کار می رود. بدین شکل از تولید ROSها جلوگیری می نماید و بنابراین، با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم گیاه کمتر مورد تهاجم ROSها قرار می گیرد. افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت های بالای روی در گیاه ذرت (*Zea mays*) نیز به اثبات رسیده است (۴۷). در آزمایشی بر روی گیاه دارویی *Fogopyrum esculentom* تحت تیمارهای مختلف نانو اکسیدروی مشاهده شد که میزان فعالیت این آنزیم تا غلظت های بالای ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر افزایش می یابد (۴۸). در این آزمایش در غلظت صفر میکرومولار نانو اکسیدروی ۳۵ درصد فعالیت CAT نسبت به شاهد کاهش یافته است اما این کاهش نسبت به شاهد معنی دار نبوده است.

اثر غلظت های مختلف نانو اکسیدروی بر مقدار و فعالیت آنتی اکسیدان گایاکول پراکسیداز

در مطالعه حاضر میزان فعالیت GPX با افزایش شدت تنش افزایش یافته است و این افزایش نسبت به شاهد در سطح ۰/۱ درصد معنی دار بوده است. در تنش روی با افزایش غلظت روی میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در بسیاری از گونه های گیاهی افزایش می یابد در آزمایش ها انجام شده بر روی گیاه ذرت (*Zea mays*) مشاهده شده است که با افزایش شدت تنش روی میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز افزایش می یابد (۴۶). در این مطالعه در غلظت صفر میکرومولار روی فعالیت گایاکول پراکسیداز کاهش یافته است و این کاهش نسبت به نمونه شاهد معنی دار است. اخیرا گزارش شده است در شرایط کمبود روی در گونه های گندم، لوبیا و برنج فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاهش یافته است (۴۸).

10. Verma TS, Neue HU. Effect of soil salinity and zinc application on electrochemical and chemical kinetics and growth and yield of rice. *Commun. Soil Science*. 1984; 15: 553-571.
11. Gupta VK, Dabas DS. Efficiency of sparingly soluble and chelated zinc sources on yield, nutrient composition and nutrient ratio in berseem. *Tropical Agricultural Science*. 1983; 1:73-80.
12. Chaney RL. Zinc phytotoxicity. In: Robson AD, ed. *Zinc in soil and plants*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1993; 135-150.
13. Rosen JA, Pike CS, Golden ML. Zinc, iron and chlorophyll metabolism in Zinc toxic Corn. *Plant Physiology*. 1977; 59(6): 1085-1087.
14. Ming C, Yin CR. Effect of Mn and Zn-fertilizers on nutrient balance and deficiency diagnosis of winter wheat crop in pot experiment. *International Symposium on the Role of Sulphur, Magnesium, and Micronutrients in Balance*. *Plant Nutrition*. 1992; 369-379.
15. Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM. Shoot initiation in light- and dark-grown tobacco callus: The role of ethylene. *Physiol. Plantarum*. 1981; 53(3): 319-326.
16. Prasad T NVKV, Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, et al. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of Peanut. *Journal of Plant Nutr*. 2012; 35(6): 905-927.
17. Kamkar A, Shariatifar N, Jamshidi AH, Mohammadian M. Investigated the antioxidant Aqueous, methanol and ethanol cumin and Blghst in vitro. *Journal of Medical Sciences and Health Services Gonabad*. 1389; 16(2): 45-3
18. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol*. 1977; 59(2): 309-314.
19. Cakmak I, Marschner H. Manganese deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*. 1992; 98(4): 1222-1227.
20. Bates LS, Waldron RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studied. *Plant and soil*. 1973; 39: 205-207.
21. Ataei-Azimi A, Delnavaz Hashemloian B, Ebrahimzadeh H, Majd A. High in vitro production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(16): 2834-2839
22. Barcelo J, Poschenrieder C. Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV (eds) *Heavy metal stress in plants*, 3rd edn. Springer, Berlin 2004; 223-248.
23. Luderid D, Hofte H, Himelblau E, Chrispeels M. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein Y-TLP in Arabidopsis thaliana is correlated with cell enlargement. *Plant Physiology*. 1992; 100: 1633-1639.
24. Mahajan P, Dhoke SK, Khanna AS. Effect of Nano-ZnO Particle Suspension on Growth of Mung (*Vigna radiata*) and Gram (*Cicer arietinum*) Seedlings Using Plant Agar Method. *Journal of Nanotechnology*. 2011; 2-7.
25. Lin D, Xing B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science Technology*. 2008; 42(15): 5580-5585.
26. Fournier JMA, Roldán NM, Sanchez C, Ghinas A, et al. K⁺ starvation increases water uptake in whole sunflower plants. *Plant Sci*. 2005; 168: 823-829.
27. Fiskesjo G. Allium test for screening chemicals: Evaluation of cytological parameters. *Plants for Environmental Studies*. 1997; 101: 307-333.
28. Zhi-xin Y, Shu-qing L, Da-wei Zh, Sheng-dong F. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*. 2006; 6: 1135-1141.
29. Siripornadulsil S, Traina S, Verma DS, Sayre RT. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic Heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*. 2002; 14: 2837-2847.
30. Alia P, Saradhi P, Mohanty P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *J. Photochem. Photobiol. B*. 1997; 38: 253-257.
31. Taylor CB. Proline and water deficit: Ups down ins and outs. *Plant Cell*. 1968; 8: 1221-1224.
32. Matysik J, Alia Bhalu B, Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. 2002; 82: 525-532.
33. Shah K, Dubey RS. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedling: Role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol. Plant*. 1998; 40: 121-130.
34. Llamas A, Ullrich CI, Sanz A. Cadmium effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa*) roots. *Plant and Soil*. 2000; 219: 21-28.
35. Schat H, Sharma SS, Vooijs R. Heavy metal induced accumulation of free proline in a metal tolerant and non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plantarum*. 1997; 101: 477-482.

36. Waller GR. Environmental influences on alkaloid production. *Alkaloid Biology and Metabolism in plant*. New York. 1978; 1-6.
37. Srivastava NK, Srivastava AK. Influence of Some Heavy Metals on Growth, Alkaloid Content and Composition in *Catharanthus roseus* L. *Indian J Pharm Sci*. 2010; 72(6): 775-778.
38. Abdul Jaleel C, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, et al. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Plant Physiology Lab, Department of Botany, Annamalai University, Annamalai Nagar*. 2007; 002:1-6.
39. Peter M, Frischknecht M, Thomas W. Effect of drought and wounding stress on indole alkaloid formation in *Catharanthus roseus*. *Plant Biology*. 1987; 26(3):707-710.
40. Jing-Yan W, Zhao-Pu L. Alkaloid Accumulation in *Catharanthus roseus* Increases with Addition of Seawater Salts to the Nutrient Solution. *College of Resources and Environmental Sciences*. 2010; 20(6):718-724.
41. Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, et al. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2007; 45: 244-249.
42. Kafi M, Nabati J, Masoumi A, Mehrgerdi MZ. Effect of salinity and silicon application on oxidative damage of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) monech.]. *Pakistan journal of Botany*. 2011; 43(5): 2457-2462.
43. Mon MM, Maw SS, Oo ZK. Quantitative Determination of Free Radical Scavenging Activity and Anti-tumor Activity of Some Myanmar Herbal Plants. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 2011; 51(2): 523-529.
44. López-Milla'n AF, Ellis DR, Grusak A. Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and *raz* mutant plants. *Plant Science*. 2005; 168: 1015-1022.
45. Tewari RK, Kumar P, Sharma, PN. Morphology and physiology of zinc stressed mulberry plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 2008; 171: 286-294.
46. Hosseini Z, Poorakbar L. Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 2013; 9 (1): 66-73
47. Lee S, Kim S, Kim S, Lee I. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fogopyrum esculentum*. *Environ Sci pollut Res*. 2012; 10: 8-12.
48. Pandey N, Gupta B, Pathak C. Antioxidant responses of Pea Genotypes to zinc deficiency. *Journal of plant physiology*. 2012; 59(2): 195-205.

Effect of Nano Zinc Oxide on Alkaloids, Enzymatic and Antienzymatic Antioxidant Contents and Some Physiological Parameters of *Catharantus roseus*

Amirjani MR, Ph.D.*¹, Askari M, Ph.D.¹, Askari F, M.Sc. Student²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

* Email corresponding author: m-amirjani@araku.ac.ir

Received: 14 Aug. 2013

Accepted: 18 May. 2014

Abstract

Aim: The effects of different concentrations of ZnO nanoparticles on some growth parameters, the amounts of proline and alkaloids and changes in activity of some antioxidant enzymes were investigated.

Material and methods: Experiments were performed under controled greenhouse conditions and completely randomized design with three replications. Plants were exposed to different concentrations (2, 4, 5, 10 and 15 mM) of nano zinc oxide and the effect of these concentrations were compared with the plants that used a complete nutrient solution containing zinc Sulfate.

Results: Treatment of the plant with concentration of 0 to 2 micromolar caused increased and higher concentrations significantly reduced dry weight as well as root length. The results showed that the antioxidant enzymes activities in the treated plants increased with increasing concentration of nano zinc oxide in the nutrient solution compared to the control plants. As the level of stress was elevated, the amount of proline and total alkaloids also increased.

Conclusion: With increasing concentrations of zinc oxide nanoparticles, Zn absorption raised. Due to this toxicity, plant growth parameters were affected and oxidative stress in plants was induced. To overcome free radical production, plants have increased their antioxidant enzyme activities and proline.

Keywords: Alkaloid, Antioxidative enzymes, Nano particles, Proline