



The effect of foliar application of Titanium dioxide nanoparticle on the physiological and antioxidant performance of two *Origanum* species

Asadi A^a, Cheniany M^{b*}, Lahouti M^c

^a Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

^b Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

^c Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Asadi A, Cheniany M, Lahouti M. The effect of foliar application of Titanium dioxide nanoparticle on the physiological and antioxidant performance of two *Origanum* species. *Journal of Cell and Tissue*. 2023;14(1): 50.

<https://10.52547/JCT/14.1.50>

KEYWORDS

Antioxidant enzymes,
Medicinal plant, Nanoparticle,
Origanum,
Titanium dioxide

ABSTRACT

Aim: Nanoparticles are superior to conventional elemental forms due to the novel physicochemical properties that enable them to act as plant growth promoters. Recent research on nanomaterials has been shown both positive and negative effects. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) are assayed worldwide in large quantities for various purposes. This study investigated the effect of TiO₂ NPs on some physiological and biochemical traits and the induction of the antioxidant systems in *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L., in a completely randomized design with three repetitions. **Material and Methods:** Surface-sterilized seeds were sown with 2 cm depth in each plastic pots filled with a 1: 1 mix of loamy soil and sand. Until reaching the appropriate physiological age, they were exposed to greenhouse conditions (16 h light/8 h dark photoperiod). Two-month-old plants were foliar sprayed with 10, 60, and 120 mg/L TiO₂ NPs and harvested 14 days after the last treatment. Plants sprayed with distilled water were used as controls. Changes in the photosynthetic pigments (the content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, and carotenoid), biochemical properties (the levels of membrane stability index, malondialdehyde, and proline contents), and the activity of antioxidant enzymes (Guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase, superoxide dismutase, catalase, and glutathione *s*-transferase) were measured in the collected samples.

Results: The comparison of data means showed that the treatment of 60 mg/L TiO₂ NPs caused the maximum amount of chlorophyll *a*, total chlorophyll, and carotenoids in both *Origanum* species. However, the highest content of chlorophyll *b* in *O. majorana* was observed in the treatment of 120 mg/L TiO₂ NPs. It is worth mentioning that the negative effect of the concentration of 120 mg/L TiO₂ NPs on the membrane system of two species is statistically significant and remarkable due to the leakage of electrolytes. Although the increase in the concentration of TiO₂ NPs led to fewer levels of malondialdehyde in *O. vulgare* in comparison with *O. majorana*; this concentration

* Corresponding author. Tel.: 05138805522; Fax: 05138804037

E-mail address: cheniany@um.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/14.1.50>

Received: Jan. 7, 23, 2023; Received in revised form: Mar. 11, 2023; Accepted: Mar. 30, 2023

Original Article

© Author



was found to be effective to the high levels of proline in *O. vulgare*. Most of the antioxidant enzymes (Guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, polyphenol oxidase, superoxide dismutase, and glutathione s-transferase) of *O. vulgare* showed their maximum activity at the concentration of 60 mg/L TiO₂ NPs. However, the lower activity of catalase in *O. vulgare*, compared to *O. majorana* was remarkable.

Conclusion: The results of this research show that the treatment of 60 mg/L TiO₂ NPs improves the physiological characteristics of the medicinal plant *Origanum*, including the increase of photosynthetic pigments, followed by the rate of photosynthesis and the increase of biomass. It is noteworthy that higher levels than the optimal concentrations of TiO₂ NPs can lead to an increase in the levels of ROS and oxidative burst, which leads to a decrease in plant performance. Therefore, the plant response to nanoparticles depends significantly on the concentration and time of application, as well as the size, shape, and surface functionalization of the particles. Finally, *O. vulgare* is introduced as a more successful species due to the higher activity of antioxidant enzymes when treating TiO₂ NPs.



تأثیر محلول پاشی نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بر عملکرد فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانتی دو گونه مرزنجوش

آمنه اسدی^۱، منیره چنیانی^{۲*} و مهرداد لاهوتی^۳

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
^۲استادیار، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، Cheniany@um.ac.ir
^۳استاد، فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

| واژگان کلیدی | چکیده |
|---|---|
| آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، دی‌اکسیدتیتانیوم، گیاه دارویی، مرزنجوش، نانوذره | <p>هدف: نانوذرات به دلیل ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی ویژه خود که آن‌ها را قادر می‌سازد به عنوان محرک رشد گیاه عمل کنند، نسبت به اشکال معمولی عنصر برتر می‌سازد. تحقیقات اخیر بر روی نانوذرات بیانگر هم اثرات مثبت و هم اثرات منفی این ذرات است. نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم (TiO₂ NPs) در مقادیر زیاد در سراسر جهان برای اهداف مختلف بررسی می‌شود. این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و القای سیستم آنتی‌اکسیدانتی دو گونه مرزنجوش مدیترانه‌ای (<i>Origanum vulgare</i> L.) و مرزنجوش اروپایی (<i>Origanum majorana</i> L.)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت.</p> <p>مواد و روش‌ها: اندام‌هوایی گیاهان دو ماهه پرورش داده شده در شرایط گلخانه، با غلظت‌های ۱۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم محلول پاشی شدند. برای گیاهان شاهد، تیمار با آب مقطر صورت گرفت. سنجش روند تغییرات رنگی‌های فتوسنتزی، میزان مالون‌دی‌آلدئید، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در نمونه‌های جمع‌آوری شده انجام شد.</p> <p>نتایج: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، موجب بیشترین میزان کلروفیل <i>a</i>، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای هر دو گونه مرزنجوش شد. ولی بیشترین میزان کلروفیل <i>b</i> مرزنجوش اروپایی، در تیمار ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات مشاهده گردید. شایان ذکر است که تأثیر منفی غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر سیستم‌های غشایی دو گونه از لحاظ آماری معنی‌دار و قابل توجه بود که می‌تواند اشاره به نشت الکتروولت‌ها داشته باشد. هر چند افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، موجب مقادیر پایین میزان مالون‌دی‌آلدئید گونه مدیترانه‌ای در مقایسه با گونه اروپایی شد؛ اما سطح پرولین مرزنجوش مدیترانه‌ای به شدت افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت اکثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوکاتایون اس-ترانسفراز) نوع مدیترانه‌ای، در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر تیمار مشاهده شد؛ اما فعالیت کاتالاز گونه مدیترانه‌ای نسبت به گونه اروپایی خود به طور قابل توجهی پایین بود.</p> |
| تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷ | |
| تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ | |
| تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۱۰ | |

نتیجه‌گیری: مجموعه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار ۶۰ میلی‌گرم درلیتر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم باعث بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی مرزنجوش از جمله افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و به‌دنبال آن سرعت فتوسنتز و افزایش زیست‌توده گیاه می‌شود. قابل ذکر است که سطوح بالاتر از غلظت بهینه نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند منجر به افزایش سطوح گونه‌های کنشگر اکسیژن و انفجار اکسیداتیو شود که منجر به کاهش عملکرد گیاه می‌شود. بنابراین، پاسخ گیاه به نانوذرات به طور قابل توجهی به غلظت و زمان کاربرد، و همچنین اندازه، شکل و عملکرد سطحی ذرات وابسته است. در نهایت مرزنجوش مدیترانه‌ای به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط تیمار با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به‌عنوان گونه گیاهی موفق‌تر معرفی می‌گردد.

۱- مقدمه

فناوری نانو در جهت بهبود و افزایش کمیت و کیفیت دستاوردهای علمی بکار گرفته می‌شود. اولین کاربرد فناوری نانو در کشاورزی توسط وزارت کشاورزی آمریکا، در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت (۱). پاسخ گیاهان به نانوذرات وابسته به گونه گیاه، مرحله رویشی آن، نوع نانوذرات (۲) و زمان در معرض قرارگیری گیاه به این ذرات است (۳). در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به دلیل خواص ویژه آن شامل توانایی فتوکاتالیزوری، آب‌دوستی زیاد، هدایت‌پذیری بالا (۴) و تحریک واکنش-های اکسیداسیون و احیاء (۵) مورد توجه قرار گرفته است. گزارش شده است که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم قادرند با ترغیب جذب آب و عناصر غذایی از سیستم ریشه، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز (۶) و سوپراکسیددیسموتاز (۷) را افزایش دهند. مرزنجوش (*Origanum spp.*) گیاهی یک تا چند ساله و معطر از تیره نعناع (Lamiaceae) می‌باشد که حدوداً ۵۰ گونه دارد (۸). پراکنش این گیاه در دامنه‌های شمالی البرز و در نواحی جنگلی کشور، در استان‌های گلستان، مازندران، گیلان، آذربایجان شرقی، غربی، خراسان و تهران می‌باشد (۹). مرزنجوش از گیاهان خوراکی رایجی است که در نقاط مختلف دنیا به عنوان ادویه استفاده می‌شود. از کاربردهای درمانی آن می‌توان به درمان کلیه، ضعف اعصاب، اختلالات تنفسی، اسپاسم، گلودرد، دیابت، فشارخون بالا، سرماخوردگی، سردرد، صرع و عفونت‌های ادراری اشاره داشت. همچنین این گیاه دارای خاصیت ضدسرطانی، ضدچربی خون و ضدالتهابی قابل توجه است (۸). بر طبق گزارش‌های علمی معتبر، این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی قوی بر ضد پاتوژن‌های انسانی و نیز عوامل فساد مواد غذایی است. این خواص به دارا بودن روغن‌های اسانس، فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و سایر ترکیبات شیمیایی مرزنجوش نسبت داده می‌شود (۱۰).

نانوذرات بسته به غلظت خود می‌توانند موجب تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه‌های کنشگر اکسیژن (ROS)، پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیدشدن پروتئین‌ها، آسیب به اسیدهای نوکلئیک، مهار آنزیمی و گاهی مرگ سلولی شوند (۱۱). اکسیژن یکتایی ($O_2^{\cdot-}$)، سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، رادیکال هیدروکسیل (OH^{\cdot}) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) از انواع رایج ROS می‌باشند (۱۲). بنابراین وقتی گیاه در معرض نانوذرات قرار می‌گیرد، تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان (آنزیمی و غیرآنزیمی) را به منظور حفظ متابولیسم درون سلولی افزایش می‌دهد (۱۳). تاثیر مثبت این ذرات بر واکنش‌های نوری (۱۴ و ۱۵) و غیرنوری (۱۶ و ۱۷) فتوسنتز نیز تأیید شده است. تاثیر افزایش نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نعنا لعلی (*Mentha piperita L.*) (۱۸)، محتوای کلروفیل توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa c.v. Queen Elisa*) و گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum L.*) (۱۹ و ۲۰) و کلروفیل *a* اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) (۲۱) از مجموعه این نتایج است که پیامد افزایش رشد و راندمان تولید را به همراه داشت. با توجه به اهمیت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و خواص ویژه آن در افزایش زیست‌توده

گیاهان، این پژوهش به مطالعه مقایسه‌ای اثر این نانوذرات بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و توان آنتی‌اکسیدانی دو گونه مرزنجوش می‌پردازد.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه و آماده سازی بذرها: بذرهای مرزنجوش مدیریتانه‌ای و اروپایی به ترتیب از 'مرکز تحقیقات کشاورزی مشهد و شرکت 'پاکان بذر' اصفهان تهیه شدند. بذرهای سالم از هر دو گونه مرزنجوش، ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۶ درصد (v/v) ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند.

تهیه و آماده سازی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم: نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از US3490, US Research Nanomaterials, Inc. تهیه گردید. محلول پایه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۱/۲ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تهیه و به مدت ۲۵ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (مدل 2600s، شرکت Parsonic، ژاپن) با فرکانس ۴۰ هرتز قرار گرفتند. سپس غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تهیه شده از محلول پایه (۱۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به مدت ۴۰ دقیقه با فرکانس ۳۰ هرتز سونیکیت شدند.

کاشت گیاه و اعمال تیمارها: گلدان‌ها (۱۵×۱۵ سانتی‌متر مربع) با نسبت مساوی خاک و ماسه پر شدند. بذرها به سطح رویی خاک گلدان‌ها انتقال یافتند. گیاهان به مدت دو ماه در شرایط گلخانه با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، دوره ۱۶ ساعت روشنایی - ۸ ساعت تاریکی و آبیاری در حد ظرفیت زراعی قرار گرفتند. سپس بخش‌های هوایی مرزنجوش‌ها، با غلظت‌های مختلف ذرات نانو، در سه نوبت و با فواصل زمانی سه روز، محلول‌پاشی شدند. بعد از دو هفته از آخرین تیمار، برداشت گیاهان انجام شد.

سنجش رنگیزه‌های فنوسنتزی: برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل‌ها و کاروتنوئید از روش (۲۲) با کمی تغییرات استفاده شد؛ بدین صورت که ۰/۰۵ گرم از بافت برگ با ۴ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد (v/v) سائیده و پس از رساندن به حجم نهایی ۶ میلی‌لیتر، به مدت ۵ دقیقه در ۸۹۴ g (۴۰۰۰ rpm) سانتریفیوژ شد. خوانش جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل z230a، شرکت Chermle، آلمان) در طول موج‌های ۶۴۵، ۴۷۰ و ۶۶۳ نانومتر و محاسبه مقدار کلروفیل‌ها و کاروتنوئید بر مبنای رابطه‌های ارائه شده در رفرنس، انجام شد و نتایج بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر ارائه گردید.

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء: میزان پایداری غشاء برگ‌های متقابل ردیف دوم از قاعده ساقه، بر اساس رابطه $MSI = 1 - EC_{40}/EC_{100}$ و به روش (۲۳) سنجش شد. در این رابطه، EC_{40} هدایت الکتریکی نمونه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و EC_{100} هدایت الکتریکی نمونه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است.

سنجش میزان مالون دی‌آلدئید: بدین منظور، ۰/۱ گرم از بافت تر برگ با ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد (w/v) سائیده و سپس در ۸۰۵۰ g (۱۲۰۰۰ rpm) سانتریفیوژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۲ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد (w/v) و تیوباربیتوریک‌اسید (TBA) ۰/۵ درصد (w/v) اضافه شد. پس از قرارگیری مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده و غلظت کمپلکس (MDA-TBA) با استفاده از رابطه $A_{532-A_{600}/155}$ محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (۲۴).

سنجش میزان پرولین: برای تعیین مقدار پرولین، ابتدا ۰/۱ گرم از بافت برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر سولفو سالیسیلیک‌اسید ۳ درصد (v/w) سائیده و سپس در ۸۹۴ g (۴۰۰۰ rpm) سانتریفیوژ شد. پس از اضافه نمودن ۱ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین

و ۱ میلی لیتر استیک اسید، نمونه در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. با افزودن ۲ میلی لیتر تولوئن، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت با خوانش جذب در ۵۲۰ نانومتر، غلظت پرولین براساس میکرومول در گرم وزن تر نمونه گیاهی محاسبه شد (۲۵).

تهیه عصاره آنزیمی و سنجش میزان پروتئین: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا تهیه عصاره آنزیمی از بافت برگ به کمک بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷/۴) صورت گرفت (۲۶) و مقدار پروتئین کل در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه ارائه گردید (۲۷).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POX): سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز براساس اکسیداسیون گایاکول مورد اندازه گیری قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل عصاره آنزیمی و مجموعه بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار (pH=۶/۸)، H_2O_2 ۴۰ میلی‌مولار و گایاکول ۲۰ میلی‌مولار تهیه شد. با استفاده از تغییرات جذب به مدت ۱ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر و ضریب خاموشی $25/5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد آنزیمی در گرم وزن تر محاسبه شد (۲۸).

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): فعالیت آسکوربات پراکسیداز، بر پایه سرعت اکسیداسیون آسکوربات محاسبه شد. مخلوط واکنش از مجموعه بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، آب دو بار تقطیر، H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار و در نهایت عصاره آنزیمی آماده شد. تغییرات جذب مخلوط واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد آنزیمی در گرم وزن تر بیان شد (۲۹).

سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO): مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار (pH=۶/۸)، پیروگال ۰/۰۲ مولار و عصاره آنزیمی، در جهت بررسی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تهیه شد. ضرورت تامین دمای ۴۰ درجه سانتیگراد برای واکنش آنزیم وجود دارد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۳۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت و فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی $2/47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و براساس واحد آنزیمی در گرم وزن تر محاسبه شد (۳۰).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز بر مبنای محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و به روش (۳۱) و با استفاده از ضریب خاموشی $39/5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و براساس واحد آنزیمی در گرم وزن تر ارائه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): برای اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مخلوط واکنش (۳ میلی لیتر) شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵)، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، نیتروبلوترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۴ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در زیر لامپ‌های فلور سنت (در حدود ۳۰ وات) قرار گرفتند. از مخلوط واکنش بدون آنزیم به عنوان شاهد رو شنایی و مخلوط واکنش کامل قرار گرفته در شرایط تاریکی به عنوان شاهد استفاده گردید. پس از توقف واکنش، جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر خوانش و براساس ۵۰٪ ممانعت از احیای نوری NBT، فعالیت ویژه آنزیم براساس واحد آنزیمی در گرم وزن تر گزارش گردید (۳۲).

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST): فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز به روش (۳۳) مورد سنجش قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، گلوتاتیون احیا ۱ میلی‌مولار، ۱-کلرو-۲،۴-دی‌نیترو بنزن ۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی تهیه گردید. سپس تغییرات جذب نمونه‌ها در طول موج

۳۴۰ نانومتر بررسی و میزان فعالیت ویژه آنزیم با در نظر گرفتن ضریب خاموشی $9/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و براساس واحد آنزیمی در گرم وزن تر محاسبه شد.

۳- آنالیز آماری

کلیه آزمایشات براساس طرح فاکتوریل، در قالب کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (v.16) مورد تحلیل واریانس (ANOVA) قرار گرفت. میانگین‌ها با کمک آزمون دانکن در سطح احتمال خطا یک و پنج درصد مقایسه شدند.

۴- نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌های پژوهش حاضر نشان داد که نوع گونه گیاهی، تیمار اعمال شده و برهمکنش آن‌ها، بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بررسی شده معنی‌دار ($p \leq 0.05$ و $p \leq 0.01$) بود (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثرات گونه و تیمارهای نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر مقدار کلروفیل‌های a و b و کل، کاروتنوئیدها، شاخص پایداری غشا، مالون دی آلدئید و پرولین دو گونه مرزنجوش. ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای پنج و یک درصد است.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | کلروفیل a | کلروفیل b | کلروفیل کل | کاروتنوئید کل | شاخص پایداری غشا | مالون دی آلدئید | پرولین |
|--------------|------------|-------------|-------------|------------|---------------------|------------------|-----------------|---------|
| گونه | ۱ | ۰/۱۶۷** | ۰/۰۳۸** | ۰/۳۶۴** | ۰/۰۳۳** | ۴۸/۰۸۱** | ۰/۲۰۸** | ۲/۴۷** |
| تیمار | ۳ | ۰/۱۲۱** | ۰/۰۲۵* | ۰/۲۴۱** | ۰/۰۲۰** | ۱۲۸/۴۵۹** | ۰/۰۱۰** | ۱/۵۷** |
| گونه × تیمار | ۳ | ۰/۰۱۲* | ۰/۰۰۷* | ۰/۰۱۰** | ۰/۰۰۳ ^{ns} | ۱۴/۴۹۷** | ۰/۰۱۴** | ۰/۳۰۶** |
| خطا | ۱۶ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۹ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۰۱ | ۴/۴۵۱ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۶ |

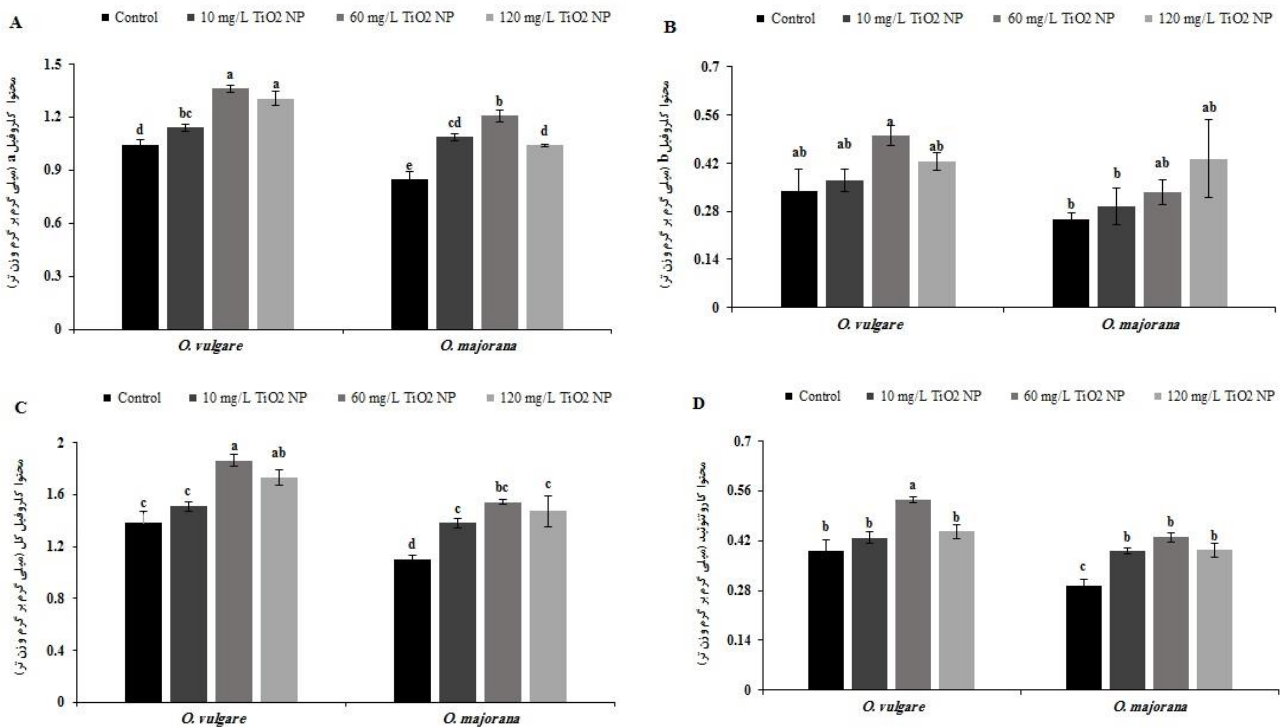
جدول ۲: تجزیه واریانس اثرات گونه و تیمارهای نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر مقدار پروتئین کل و فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در سطوح مختلف تیماری نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر دو گونه مرزنجوش. ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای پنج و یک درصد است.

| منبع تغییرات | درجه آزادی | پروتئین محلول کل | گایاکول پراکسیداز | آسکوربات پراکسیداز | پلی فنل اکسیداز | کاتالاز | سوپراکسید دیسموتاز | گلوکاتیبون اس-ترانسفراز |
|--------------|------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------|------------|--------------------|-------------------------|
| گونه | ۱ | ۴/۴۰۴** | ۰/۱۹۲** | ۲۹/۲۱۳** | ۲/۰۷۹** | ۲۱۴۸/۹۳۱** | ۱۳۵۳۱/۷۸** | ۸/۳۰۱** |
| تیمار | ۳ | ۱/۱۰۲** | ۰/۰۷۵** | ۲۴۸/۴۲** | ۱/۸۲۵** | ۳۲۸/۱۶۴** | ۴۵۵۰/۹۴۸** | ۱۷/۹۶** |
| گونه × تیمار | ۳ | ۰/۶۷۷** | ۰/۰۱۴** | ۷۱۱/۸۶۲** | ۰/۶۹۲** | ۳۲۱/۱۹** | ۱۶۷۴/۳۲۴** | ۱/۵۵۲** |
| خطا | ۱۶ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۰۱ | ۱/۷۷ | ۰/۰۱۲ | ۳۳/۲۳۴ | ۱۷/۰۶۶ | ۰/۰۳۱ |

مقدار کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل

بررسی مقادیر کلروفیل‌های a و b و کل نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم، تقریباً مقدار رنگیزه‌های مذکور در هر دو گونه مرزنجوش مورد مطالعه افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان کلروفیل‌های a و کل در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات مشاهده شد. هر چند بین تیمار ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (شکل ۱ - A و C)؛ اما بیشترین مقدار کلروفیل b مرزنجوش اروپایی در غلظت ۱۲۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات اندازه‌گیری شد (شکل ۱ - B). میزان کاروتنوئیدهای دو گونه تیمار شده با غلظت‌های نانوذرات، در ابتدا افزایشی و سپس کاهش‌ی بود؛ به

این نحو که بیشترین مقدار کاروتنوئید مرزنجوش مدیترانه ای در تیمار غلظت ۶۰ میلی گرم درلیتر نانوذرات مشاهده شد و بعد از آن کاهش یافت ولی بین تیمار ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم درلیتر نانوذرات در گونه اروپایی، تفاوت معنی داری از لحاظ آماری وجود نداشت (شکل ۱- D). نکته قابل توجه، بیشتر بودن محتوای تمام رنگیزه‌ها، در شرایط تیمار شده با نانوذرات نسبت به شرایط کنترل (شاهد) دو گونه بود.



شکل ۱: تاثیر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و میزان کاروتنوئید (D) دو گونه مرزنجوش. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون دانکن در سطح $p \leq 0.05$ است.

بر اساس منابع، با افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تا ۱۰۰ میلی گرم درلیتر، محتوا کلروفیل a و b و کل مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) و بادرنجبویه (*Dracocephalom moldavica* L.) افزایش یافت (۱۷ و ۳۴)، اما غلظت‌های بالاتر این نانوذرات (۲۰۰ میلی گرم درلیتر)، موجب کاهش مقدار کلروفیل a و b و کاروتنوئید بادرنجبویه گردید. در پژوهشی دیگر، کلروفیل a و b و کل گندم (*Triticum aestivum* L.) در نتیجه افزایش غلظت تیمار نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تا ۴۰ میلی گرم درلیتر، افزایش و در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی گرم درلیتر کاهش یافت (۳۵). در پژوهش حاضر، تاثیر القایی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوا رنگیزه‌های دو گونه مرزنجوش مشاهده شد. مشخص شده است که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با بهبود ساختار کلروفیل و افزایش تولید این گروه از رنگیزه‌ها (۷)، به نوعی از پیری کلروپلاست جلوگیری می‌کنند (۳۶). محققان بیان داشتند که این اثرات مثبت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند منوط به افزایش جذب مواد مغذی مانند نیتروژن و منیزیم (اجزاء ساختار کلروفیل) باشد (۳۷). ولیکن در غلظت‌های زیاد نانوذرات و آسیب ناشی از آن بر سیستم غشایی کلروپلاست و کلروفیل، راندمان فتوسنتز و زیاده گیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۳۸). کاروتنوئیدها علاوه بر ایفای نقش رنگیزه کمکی در دستگاه فتوسنتزی، وظیفه حفاظت کلروفیل‌ها در برابر تنش اکسیداتیو را بر عهده دارند و می‌توانند با گرفتن انرژی اضافی طول‌موج‌های کوتاه و تبدیل اکسیژن یکتایی به اکسیژن سه‌تایی و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کنند (۳۹). لذا افزایش غلظت کاروتنوئیدها در شرایط تیمار با سطوح متوسط

نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم منطقی به نظر می‌رسد؛ اما در غلظت‌های بیشتر نانوذرات تولید بیش از حد ROSها، پراکسیداسیون غشاء و به هم خوردن تعادل یونی و به دنبال آن آسیب ساختار کلروپلاست (غشاء) و در نهایت کاهش مقدار رنگیزه‌ها صورت می‌گیرد (۴۰ و ۴۱).

شاخص پایداری غشا

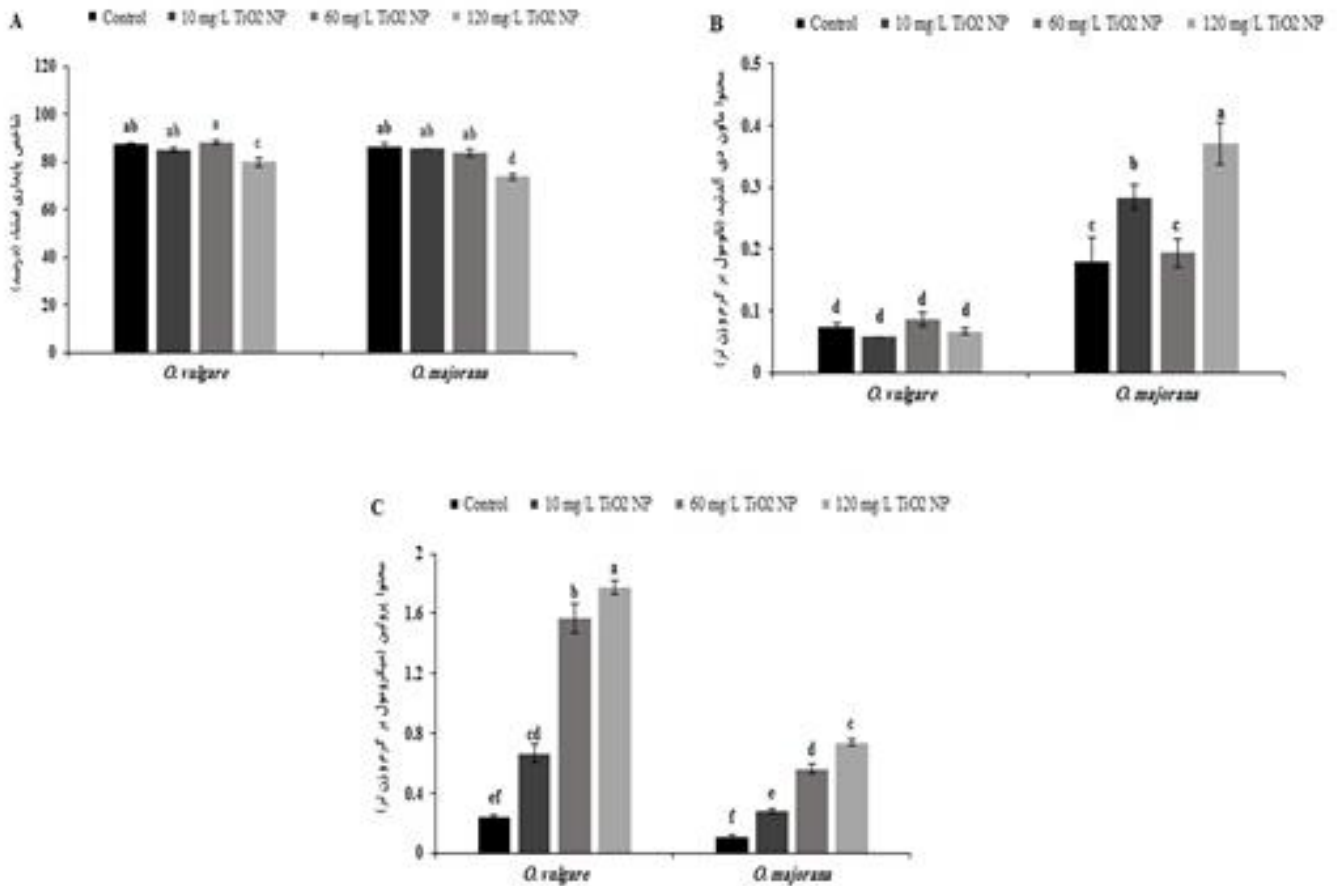
ارزیابی تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر دو گونه مرزنجوش نشان داد که هرچند از لحاظ آماری، تفاوتی در اثر غلظت‌های مختلف نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بر شاخص پایداری غشا وجود ندارد اما می‌توان بیان داشت که غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر تیمار، موجب افزایش شاخص پایداری غشا مرزنجوش مدیترانه‌ای نسبت به شاهد شد (شکل ۲- A). شایان ذکر است که تاثیر منفی غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر سیستم غشایی دو گونه از لحاظ آماری معنی‌دار بوده و به دلیل نشت الکتروولیت‌ها قابل توجه است. مشابه این نتایج، افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تیمار شده موجب کاهش شاخص پایداری غشا گندم شد (۳۵). کاهش شاخص پایداری غشا در غلظت‌های بالا این نانوذرات، در گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) نیز مشاهده شد (۴۲). غشا یکی از نقاط اصلی آسیب اعمال شده از سوی رادیکال‌های هیدروکسیل است. لذا هرگونه کاهش در شاخص پایداری غشا نشان‌دهنده آسیب به غشاهای زیستی و معیاری برای ارزیابی سطح اکسایش وارده به آن می‌باشد. هرچه آسیب به سیستم غشایی کمتر باشد، میزان نشت الکتروولیتی کمتر و در نتیجه نفوذپذیری انتخابی غشا بهتر حفظ می‌گردد (۴۳). در گیاهانی که در معرض انواع تنش‌ها قرار می‌گیرند، نفوذپذیری غشاهای سلولی به دلیل صدمات ناشی از تجمع ROS افزایش می‌یابد که این امر منجر به کاهش تمامیت غشاها و کاهش توانایی در کنترل ورود و خروج مواد می‌شود.

مالون دی‌آلدئید

بررسی نتایج داده‌ها نشان داد که تیمارهای نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تاثیر معنی‌داری بر تغییر میزان مالون دی‌آلدئید مرزنجوش مدیترانه‌ای (در مقایسه با نمونه شاهد) نداشت؛ اما تاثیر افزایشی تیمارهای ۱۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات بر میزان مالون دی‌آلدئید مرزنجوش اروپایی قابل توجه بود؛ به طوری که در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات، مقدار مالون دی‌آلدئید دو برابری نسبت به نمونه شاهد مشاهده شد (شکل ۲- B). مالون دی‌آلدئید یکی از نشانگرهای مهم پراکسیده شدن سیستم غشایی و وقوع تنش اکسیداتیو است. در پژوهش‌های پیشین مشخص شد که با افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، میزان مالون دی‌آلدئید لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) و نخود افزایش یافت (۱۳ و ۴۲)؛ اما افزایش غلظت نانوذرات تا ۱۵۰ میکرومول در لیتر موجب کاهش مالون دی‌آلدئید گیاه آروندیناریا (*Arundinaria pygmaea* L.) شد (۴۴). پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط رادیکال‌های آزاد، یک شاخص برای حضور ترکیبات سمی در محیط است که منجر به تولید و افزایش مالون دی‌آلدئید ناشی از تنش اکسیداتیو می‌گردد (۴۵). بر پایه نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه مرزنجوش مدیترانه‌ای تحت تیمار با غلظت‌های نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، قادر است تا رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و مانع از پراکسیداسیون غشاء شود. در حالی که غلظت‌های میانه و بالا نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم اعمال شده بر مرزنجوش اروپایی به جهت تولید بیش از حد ROS در مسیر پیام‌رسانی سیگنال، موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تغییر در ساختار غشاء و دیواره سلولی گردید (۴۰ و ۴۶ و ۴۷) که در صورت تشدید شدن شرایط تنش و نشت بالای یونی، مرگ سلولی را به دنبال خواهد داشت (۴۸).

پرولین

بررسی میزان پرولین هر دو گونه مرزنجوش نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، مقدار این ترکیب افزایش یافت؛ البته این روند تغییر به گونه‌ای بود که مرزنجوش مدیترانه‌ای ۵۸/۵۴ درصد افزایش بیشتری در مقدار پرولین (تیمار ۱۲۰ میلی‌گرم درلیتر) نسبت به مرزنجوش اروپایی داشت (شکل ۲-C).



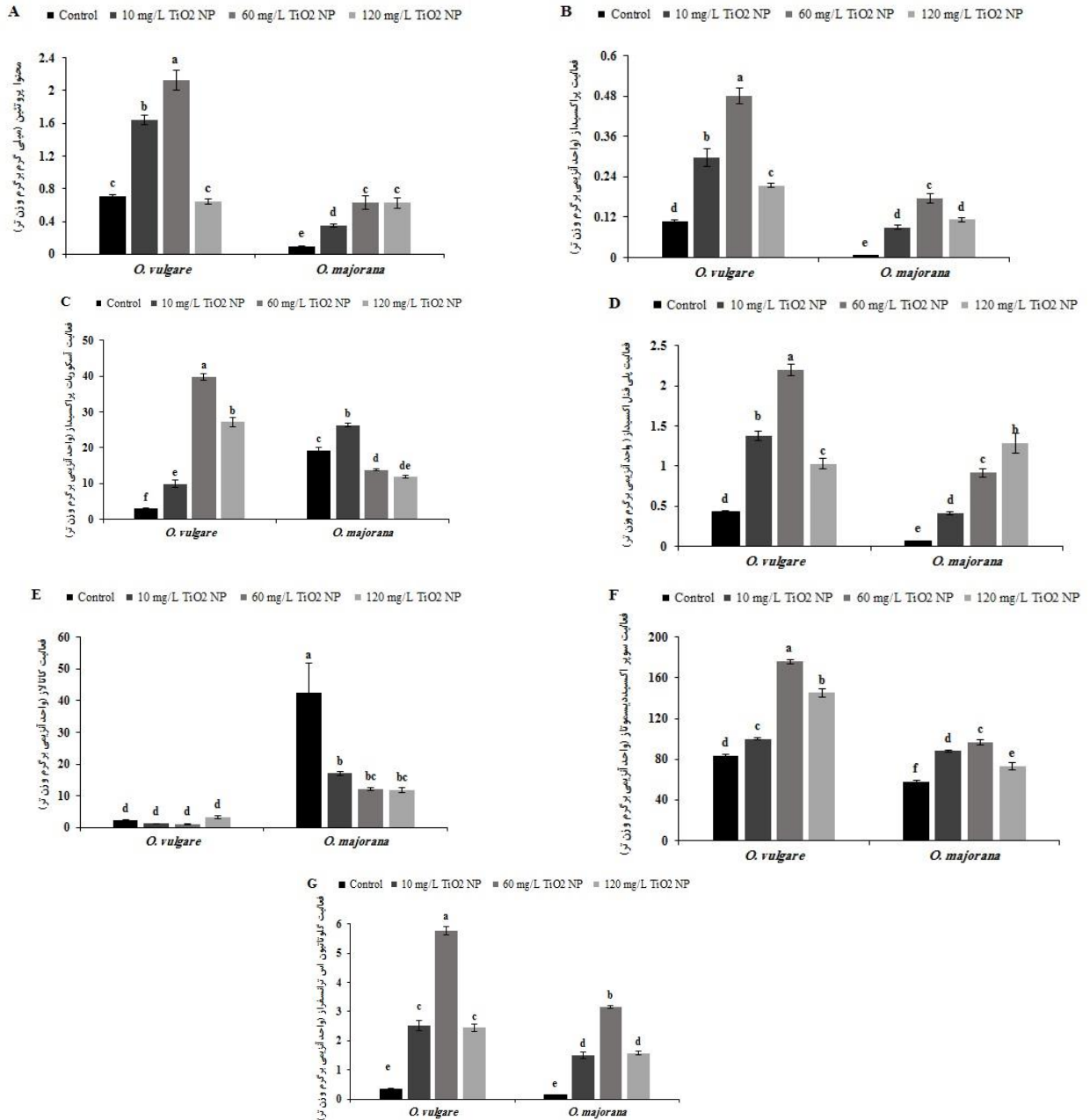
شکل ۲: تاثیر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر شاخص پایداری غشا (A)، میزان مالون دی‌آلدئید (B) و مقدار پرولین (C) دو گونه مرزنجوش. مقادیر میانگین سه تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون دانکن در سطح $p \leq 0.05$ است.

نیز گزارشی مبنی بر افزایش مقدار پرولین در گیاه گندم تحت تیمار با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ارائه دادند (۴۹). در پژوهشی دیگر، مقدار پرولین در گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت تیمار با نانوذرات تیتانیوم افزایش و تحت تیمار با نانوذرات روی (ZnO) کاهش یافت (۵۰). پرولین یکی از حساس‌ترین اسمولیت‌های تنشی است که با حفظ ساختار سلول و تثبیت فشار اسمزی، در پایداری پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و نیز تنظیم pH سلول نقش دارد (۵۱). لذا افزایش آن به‌عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانت غیر آنزیمی طبیعی به‌نظر می‌رسد.

پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

بررسی مقدار پروتئین کل در پژوهش حاضر نشان داد که چه در شرایط شاهد و چه در شرایط تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم، مرزنجوش مدیترانه‌ای از مقدار قابل توجه پروتئین نسبت به مرزنجوش اروپایی برخوردار است. به طوری که غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات، بهترین تاثیر را بر این افزایش داشت (شکل ۳- A).

میانگین داده‌های حاصل از بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که تا تیمار ۶۰ میلی گرم نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر هر دو گونه مرزنجوش، بیشترین میزان فعالیت و سپس روند کاهشی بر فعالیت این آنزیم وجود دارد. به طوری که افزایش فعالیت آنزیم مذکور در مرزنجوش مدیترانه‌ای تیمار شده با ۶۰ میلی گرم نانوذرات نسبت به گیاه شاهد ۴/۴ برابر و نسبت به مرزنجوش اروپایی در همان تیمار، ۲/۷ برابر بود (شکل ۳- B). ارزیابی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم در مرزنجوش مدیترانه‌ای (در شرایط تیمار با ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات) ۱۳ برابر شاهد است؛ ولیکن این افزایش فعالیت در مرزنجوش اروپایی مربوط به تیمار ۱۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات و تنها ۱/۳۶ برابر شرایط شاهد است (شکل ۳- C). تاثیر مثبت تیمار نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز مرزنجوش مدیترانه‌ای شاخص تر از مرزنجوش اروپایی بود؛ به نحوی که بیشترین فعالیت آنزیم مذکور در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات بر مرزنجوش مدیترانه‌ای و در تیمار ۱۲۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات بر مرزنجوش اروپایی مشاهده شد (شکل ۳- D). با بررسی نتایج داده‌ها، هر چند تفاوت معنی داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای نانوذرات بر مرزنجوش مدیترانه‌ای مشاهده نشد؛ اما بین اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم کاتالاز مرزنجوش اروپایی تفاوت معنی داری وجود داشت و با افزایش غلظت نانوذرات، میزان فعالیت آنزیم با کاهش شدیدی مواجه شد؛ و کمترین فعالیت آنزیم در تیمار ۱۲۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات (۳/۶ برابر کاهش نسبت به شاهد) بود (شکل ۳- E). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز هر دو گونه مرزنجوش در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات مشاهده شد و بعد از آن فعالیت آنزیم‌ها کاهش یافتند. شایان ذکر است که میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز مرزنجوش مدیترانه‌ای نسبت به مرزنجوش اروپایی و در تیمار با ۶۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۱/۸۲ و ۱/۸ برابر بیشتر بود (شکل ۳- F و G).



شکل ۳: تاثیر تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان پروتئین محلول کل (A) و فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت پراکسیداز (B)، آسکوربات پراکسیداز (C)، پلی‌فنل اکسیداز (D)، کاتالاز (E)، سوپراکسید دیسموتاز (F) و گلوکوتیون اس-ترانسفراز (G) دو گونه مرزنجوش. مقادیر میانگین سه تکرار \pm SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون دانکن در سطح $p \leq 0.05$ است.

آنچه در نتایج پیش‌رو قابل توجه است، تاکید بر بیشترین تاثیر مثبت از سوی غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات بر مقدار پروتئین کل، فعالیت پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکوتیون اس-ترانسفراز مرزنجوش مدیرانه‌ای بود؛ در حالی که برای تغییرات صفات بیوشیمیایی ارزیابی شده مرزنجوش اروپایی نمی‌توان به غلظت موثر مشترک دست یافت. بررسی پژوهش‌های مشابه نشان داد که با تیمار غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بادرنجبویه، بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های گلیکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در شرایط تیمار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و برای آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در تیمار ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات مشاهده شد (۳۴). با این حال، روند افزایشی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز گیاه آروندیناریا هم‌راستا با افزایش غلظت نانوذرات

دی‌اکسیدتیتانیوم گزارش شد (۴۴). غلظت نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم (۰/۰۱ الی ۰/۰۵ درصد) تیمار شده بر گیاه لوبیا سبز، هر چند فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد ولیکن فعالیت سوپراکسیددیسموتاز تا غلظت ۰/۰۳ در صد افزایش و بعد از آن کاهش یافت (۱۳). در گزارشات دیگر نیز روند افزایشی-کاهشی برای فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز و روند افزایشی برای پراکسیداز عدسک آبی (*Lemna minor* L.) تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ارائه شد (۴۵). فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاه هیبرید سینگل کراس ۷۰ ذرت دانه‌ای (*Corn 704 single cross*) تحت تیمار با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش و پراکسیداز نیز روند افزایشی-کاهشی داشت (۵۲). هم‌چنین (۵۳)، گزارشی مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوکاتایون اس-ترانسفراز تحت تیمار افزایشی نانوذرات نقره (AgNP) در لوبیا سبز را بیان نمودند.

افزایش میزان پروتئین تحت تیمار با غلظت بهینه نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در پژوهش حاضر را می‌توان به فعال شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین‌ها نسبت داد؛ در حالی که کاهش مقدار پروتئین در غلظت‌های بیشتر نانوذرات می‌تواند مرتبط به واکنش و تخریب ساختار پروتئین‌های درگیر با رادیکال‌های آزاد، افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین‌ها، کاهش سنتز پروتئین‌ها و هم‌چنین تجمع اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین باشد (۵۴). تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش، به کاهش آسیب پروتئین‌ها می‌انجامد (۵۵). بنابراین میزان بالای پروتئین در مرزنجوش مدیترانه‌ای را می‌توان به بالا بودن مقدار پرولین در مقام مقایسه با گونه اروپایی نسبت داد. افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدانتی که از مهم‌ترین سازوکارهای دفاعی گیاهان در برابر انواع تنش‌ها می‌باشد. آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به عنوان یکی از عوامل اصلی در مقابل تنش اکسیداتیو، از یک سو با تبدیل آنیون سوپراکسید به پراکسیدهیدروژن، موجب حذف این آنیون شده واز سوی دیگر با تحریک آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، سمیت H_2O_2 را کاهش می‌دهد (۵۶). در این پژوهش افزایش فعالیت پراکسیدازها من جمله آسکوربات پراکسیداز که در جاروب کردن H_2O_2 نقش موثری دارند منطقی است. با توجه به افزایش قابل توجه فعالیت آسکوربات پراکسیداز در مرزنجوش مدیترانه‌ای، شاید بتواند کم بودن سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در حذف H_2O_2 را جبران نماید. پژوهش‌ها نشان داده است که فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نیز در عملکرد دفاعی گیاهان در برابر انواع تنش‌ها افزایش می‌یابد (۵۷). H_2O_2 فعال‌کننده قوی آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز در برابر تنش‌های فلزات، شوری و اسمزی است. مطالعات زیادی نقش این آنزیم در جاروب کردن ROS و سمیت‌زدایی H_2O_2 را تایید کرده‌اند (۵۸). هر چند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اغلب در زمانی که سلول با سطح تنش مواجه می‌شود طبیعی است (۴۵) اما در غلظت‌های بالای نانوذرات که در سلول H_2O_2 و سایر گونه‌های ROS افزایش می‌یابد، این فعالیت‌ها احتمالاً به دلیل غیرفعال شدن آنزیم‌ها، کاهش سنتز آنزیم‌ها، فعال شدن پروتئازهای پراکسیزومی و یا تغییر در ساختار آنزیم‌ها توسط ROS، کاهش می‌یابد (۵۹). هم‌چنین تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به غلظت و مدت زمان تیمار، گونه و سن گیاه وابسته است. البته این احتمال که نانوذرات به طور مستقیم با از بین بردن ROS و رادیکال‌های آزاد، از افزایش فعالیت آنزیم جلوگیری کنند، نیز وجود دارد (۳۹).

۵- نتیجه گیری

مجموع نتایج پژوهش حاضر تاکید می‌کند که تیمار با مقادیر بهینه نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم (۶۰ میلی‌گرم در لیتر)، سبب بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی از جمله افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و به دنبال آن، سرعت فتوسنتز و در نهایت افزایش زیتوده گیاه دارویی مرزنجوش می‌گردد. با این وجود، غلظت‌های بیشتر از حد بهینه نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند منجر به فوران سطح ROS و در نتیجه تشدید تنش اکسیداتیو گردد که پیامد آن، کاهش عملکرد گیاه است. بنابراین تعیین میزان بهینه این نوع تیمار الیسیتوری از اهمیت بسزایی برخوردار است. قابل تامل است که گونه مرزنجوش مدیترانه‌ای به دلیل دارا بودن سیستم آنزیمی قدرتمند و فعالیت

بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به طور خاص، به‌عنوان گونه موفق تحت تیمار با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در این پژوهش معرفی می‌گردد.

۶- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت تامین هزینه‌های این پژوهش (با کد طرح ۳/۵۳۶۳۴) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۷- منابع

1. Scott, N, Chen, H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. *Industrial Biotechnology*. 2013; 9(1): 17-18.
2. Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y. and Kumar, D. S. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*. 2010; 179(3): 154–163.
3. Hatami, M., Naghdi Badi, H. and Ghorbanpour, M. Nano-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells: A review. *Journal of Medicinal Plants*. 2019; 18(71): 6–36.
4. Kurepa, J., Nakabayashi, R., Paunesku, T., Suzuki, M., Saito, K., Woloschak, G. E. and Smalle, J. A. Direct isolation of flavonoids from plants using ultra-small anatase TiO₂ nanoparticles. *Plant Journal*. 2014; 77(3): 443–453.
5. Ahmad, B., Shabbir, A., Jaleel, H., Khan, M. M. A. and Sadiq, Y. Efficacy of titanium dioxide nanoparticles in modulating photosynthesis, peltate glandular trichomes and essential oil production and quality in *Mentha piperita* L. *Current Plant Biology*. 2018; 13: 6-15.
6. Khater, M. S. Effect of Titanium Nanoparticles (TiO₂) on Growth, Yield and Chemical Constituents of Coriander Plants. *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*. 2015; 48(4): 187-194.
7. Morteza, E., Moaveni, P., Farahani, H.A. and Kiyani, M. Study of photosynthetic pigments changes of maize (*Zea mays* L.) under nano TiO₂ spraying at various growth stages. *Springerplus*. 2013; 2(1): 247-252.
8. Meabed, E. M. H., El- Sayed, N. M., Abou-Sreea, A. I. B. and Roby, M. H. H. Chemical analysis of aqueous extracts of *Origanum majorana* L. and *Foeniculum vulgare* L. and their efficacy on *Blastocystis* spp. cysts. *Phytomedicine*. 2018; 43: 158–163.
9. Mozafarian, V. *Intification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran* (Farhang Moaser press). Iran, Tehran, 2012.
10. Erenler, R., Sen, O., Aksit, H., Demirtas, I., Yaglioglu, A. S., Elmastas, M. and Telci, I. Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* L. and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; 96(3): 822–836.
11. Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011; 213: 113-136.
12. Apel, K. and Hirt H. Reactive oxygen species metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004; 55: 373– 399.
13. Ebrahimi, A., Galavi, M., Ramroudi, M. and Moaveni, P. Effect of TiO₂ nanoparticles on antioxidant enzymes activity and biochemical biomarkers in Pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Molecular Biology Research*. 2016; 6(1): 58-66.
14. Hong, F., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z., Gu, F. and Yang, P. Influences of nano-TiO₂ on the chloroplast aging of spinach under light. *Biological Trace Element Research*. 2005; 104(3): 249-260
15. Rezaizad, M. S., Abbaspour, H., Hashemi-moghaddam, H. and Gerami, M. Photocatalytic activity of Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂) on the physiological and phytochemical properties of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of Medicinal Plants and By-products*. 2021; 2: 169-177.
16. Su, M., Liu, J., Yin, S., Ma, L. and Hong, F. Effects of Nanoanatase on the Photosynthetic Improvement of Chloroplast Damaged by Linolenic Acid. *Biological Trace Element Research*. 2008; 124(2): 173–83.
17. Mazarie, A., Mousavi-nik, S., Ghanbari, A. and Fahmideh, L. Effect of different spraying concentrations of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on some physiological traits and antioxidant system activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) *Iranian Journal of Plant Biology*. 2019; 11(1): 39 -4.
18. Samadi, N., Branch, D., Yahyaabadi, S. and Rezayatmand, Z. Effect of TiO₂ and TiO₂ nanoparticle on germination, root and shoot length and photosynthetic pigments of *Mentha Piperita* L. *International Journal of Plant and Soil Science*. 2014; 3(4): 408-418.

19. Mishra, P., Singh, R., Kumar, U. and Prakash. V. Stevia rebaudiana A magical sweetener. Global Journal of Biotechnology and Biotechnology Research. GJBRR. 2010; 5: 62-74. 25.
20. Hashemi-Dehkordi, A., Mousavi, M., Moalemi, N. and Ghafarian-Moghareb MH. Effect of titanium dioxide (anatase) nanoparticles on physiological characteristics of Strawberry in *Fragaria ananassa* c.v. queen elisa under hydroponic cultures. Plant Process and Function. 2016; 5(16): 79-71.
21. Zheng, L., Hong, F., Lu, S. and Liu, C. Effect of nano TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biological Trace Element Research. 2005; 104: 83-91.
22. Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* plant physiology 24: 1-15.
23. Sairam, R. K. and Saxena, D. C. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science. 2000; 184: 55-61.
24. Jambunathan, N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. Plant Stress Tolerance (pp. 291-297). Humana Press, 2010.
25. Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teave, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 1973; 39: 107-205.
26. Zhang, J. and Kirkham, M.B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. Plant and Cell Physiology. 1994; 35(5): 785-791.
27. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72(1-2): 248-254.
28. Chance, B. and Maehly, A.C Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology. 1955; 2: 764-775.
29. Sairam, R. K., Rao, K.V. and Srivastava, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science. 2002; 163 (5): 1037-1046.
30. Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J. Purification and some properties of polyphenol oxidase from *Sunflower* seeds. Phytochemistry. 1993; 34(4): 927-931.
31. Aebi, H. Catalase in vitro. Method of Enzymology. 1984; 105: 121-126.
32. Giannopolitis, C. and Ries, S. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plant. Plant Physiology. 1977; 59: 309-314.
33. Rohman, M. M., Hossain, M. D., Suzuki, T., Takada, G. and Fujita, M. Quercetin-4'-glucoside: a physiological inhibitor of the activities of dominant glutathione S-transferases in onion (*Allium cepa* L.) bulb. Acta Physiologicae Plantarum. 2009; 31: 301-309.
34. Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M. R., Fotopoulos, V. and Kimura, S. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. Scientific Reports. 2020; 10(1): 1-14.
35. Mustafa, N., Iqbal Raja, N., Ilyas, N., Ikram, M., Mashwani, Z. and Ehsan, M. Foliar applications of plant-based titanium dioxide nanoparticles to improve agronomic and physiological attributes of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants under salinity stress. Green Processing and Synthesis. 2021; 10(1): 246-257.
36. Yang, F. and Hong, F. Influence of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. Biological Trace Element Research. 2006; 110: 179-190.
37. Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C. and Yang, P. Influence of nanoanatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. Biological Trace Element Research. 2006; 110(2): 179-190.
38. Daghan, H. Effects of TiO₂ nanoparticles on maize (*Zea mays* L.) growth, chlorophyll content and nutrient uptake. Applied Ecology and Environmental Research. 2018; 16(5): 6873-6883.
39. Mahdinezhad, N., Mousavi, Fakheri. B. and Heidari, F. The effect of some nanoparticles on the activity of antioxidant enzymes and parthenolide yield of Feverfew plant (*Tanacetum parthenium* L.) under water deficit stress. Environmental Stresses in Crop Sciences. 2018; 11(4): 917-929.
40. Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Trcera, N., Sorieul, S., Cecillon, L., Ouerdanef, L., Legros, S. and Sarreta, G. Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. Journal of Hazardous Materials. 2014; 273: 17-26.
41. Hossain, Z., Mustafa, G. and Komatsu, S. Plant responses to nanoparticle stress. International Journal of Molecular Sciences. 2015; 16: 26644-26653.
42. Hajra, A. and Kumar Mondal, N. Effects of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germination, biochemical and morphoanatomical attributes of *Cicer arietinum* L. Energy, Ecology and Environment. 2017; 2(4): 277-88.
43. Azizpour, K., Shakiba, M. R., Khosh Kholgh Sima, N. A., Alyari, H., Moghaddam, M. E. and Pessarakli, M. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. Journal of Plant Nutrition. 2010; 33(6): 859-873.
44. Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Ramakrishnan, M., Ahmad, Z. and Xie, Y. Different physiological and biochemical responses of *Bamboo* to the addition of TiO₂ NPs under heavy metal toxicity. Forests. 2021; 12(6): 759

45. Song, G., Gao, Y., Wu, H., Hou, W., Zhang, C. and Ma, H. Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2012; 31(9): 2147–2152.
46. Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. and Mukherjee, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*. 2010; 81(10): 1253–1262.
47. Mohammadi, R., Maali-Amiri, R. and Mantri, N. L. Effect of TiO₂ nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. *Russ. Journal of Plant Physiology*. 2014; 61: 768–775.
48. Ma, X., Wang, Q., Rossi, L. and Zhang, W. Cerium oxide nanoparticles and bulk cerium oxide leading to different physiological and biochemical responses in *Brassica rapa*. *Environmental Science and Technology*. 2016; 50(13): 6793-6802.
49. Aliabadi, T., Safipour Afshar, A. and Saeid Nematpour, F. The effects of nano TiO₂ and nano aluminium on the growth and some physiological parameters of the wheat (*Triticum aestivum*). *Iranian Journal of Plant Physiology*. 2016; 6(2): 1627-1635.
50. Dogaroglu, Z. and Koleli, N. TiO₂ and ZnO nanoparticles toxicity in Barley (*Hordeum Vulgare L.*). *Clean - Soil, Air, Water*. 2017; 45(11): 1700096.
51. Wang, G., Zhang, J., Wang, G., Fan, X., Sun, X., Qin, H. and Song, R. Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize. *The Plant Cell*. 2014; 26(6): 2582-2600.
52. Shargi, F. and Khalilyand Behrouzfar, E. Effect of nano-TiO₂ and salicylic acid foliar application on some biochemical traits of *Corn 704* single cross under water regimes. *Journal of Crop Ecophysiology*. 2019; 13 (3): 413-430.
53. Alashti, M., Firouzabadi, M., Dehestani, A., Gholami, A. and Parsaeian, M. Morphological and physiological response of *Green bean* plant to foliar application of citric acid and hydrogen sulfide under nanosilver stress. *Journal of Plant Process and Function*. 2021; 10(44): 283-300.
54. Sharma, S. S. and Dietz, K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*. 2009; 14(1): 43–50.
55. Tan, J., Zhao, H., Hong, J., Han, Y., Li, H. and Zhao, W. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2008; 4(3): 307-313.
56. Kopyra, M. and Gwozdz, E. A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003; 41: 1011-1017.
57. Mayer, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi. *Phytochemistry*. 2006; 67(21): 2318-2331.
58. Haluskova, L. U., Valentovicova, K., Huttova, J., Mistrik, I. and Tamas, L. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2009; 47(11): 1069-1074.
59. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Kumar, R., Seth C. and Gupta, D. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum L.*) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*. 2006; 65(6): 1027–39.