



دانشگاه آردی و منابع طبیعی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و چهارم، شماره دوم، ۱۳۹۶

<http://jopp.gau.ac.ir>

مقایسه سمیت ذرات نانو اکسید روی و بالک بر رشد گیاه شبلیله (*Trigonella foenum-graceum*) در شرایط گلخانه

نرگس قاسمی سیانی^۱، سیف‌اله فلاح^۲ و علی رستم‌نژادی^۳

^۱ دانشجوی دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، دانشیار اکولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، آستادیار الکتروسرام، مرکز تحقیقات الکتروسرام، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، شاهین شهر، اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۷

چکیده

سابقه و هدف: کاربرد گسترده نانوذرات در زمینه‌های مختلف امکان ورود آن‌ها به محیط زیست را افزایش می‌دهد. بنابراین، خاک می‌تواند یک مخزن مهمی از نانوذرات آزاد شده به محیط باشد. با توجه به ویژگی‌های نانوذرات ممکن است این ترکیبات با اجزای بوم‌نظام‌ها از جمله گیاهان و اجتماعات همزیست آن‌ها برهمکنش داشته باشند. بنابراین از یک طرف درک رفتار نانوذرات در خاک و گیاه برای کاهش خطرات بالقوه برای محیط زیست و سلامت انسان‌ها نقش خواهد داشت و از طرف دیگر در مطالعات سمیت‌شناسی نانوذرات فلزی به دلیل حلالیت آن‌ها در خاک، ارزیابی مقایسه‌ای سمیت آن‌ها با سایر ترکیبات غیر از نانو لازم است. این مطالعه با هدف بررسی سمیت ذرات نانو اکسید روی و بالک بر رشد شبلیله در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه گیاه شبلیله با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی (۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بستر شن + پرلیت تیمار شد. برای ارزیابی مقایسه‌ای نیز از بالک اکسید روی نیز در غلظت‌های متناظر با نانو اکسید روی استفاده شد. عدم استفاده از نانو و بالک در بستر کشت به‌عنوان شاهد برای هر دو آزمایش در نظر گرفته شد. هر دو آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا و تجزیه و تحلیل گردید. از مقایسه‌های ارتوگونال برای مقایسه تأثیر نانو اکسید روی با بالک آن استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که افزایش غلظت نانو و بالک اکسید روی تأثیر منفی بر تعداد و وزن گره‌های ریزوبیومی شبلیله داشته است ($P < 0/05$). به‌طور واضح اثر بازدارندگی نانو اکسید روی بر وزن گره ریزوبیومی بیش‌تر از بالک آن بود ($P < 0/05$). افزایش غلظت نانو و بالک اکسید روی باعث افزایش غلظت روی و کاهش غلظت فسفر در ریشه و اندام هوایی شبلیله گردید. گروه نانو اکسید روی در مقایسه با بالک آن غلظت فسفر ریشه را به‌میزان بیش‌تری کاهش داد. غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید باعث افزایش طول ساقه ولی غلظت ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش طول ساقه گردید. طول ساقه در همه غلظت‌های بالک کاهش نشان داد ($P < 0/05$). وزن خشک ریشه در غلظت ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی و فقط در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بالک کاهش نشان داد. بر اساس مقایسه گروهی نانو در مقابل بالک از نظر وزن خشک ریشه اختلافی مشاهده نشد، با وجود این‌که غلظت روی ریشه گروه نانو بیش‌تر از گروه بالک بود. وزن خشک اندام

* مسئول مکاتبه: falah1357@yahoo.com

هوایی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و بالاتر نانوآکسید روی و در تمام غلظت‌های بالک کاهش یافت. وزن خشک اندام هوایی در گروه تیمار بالک کم‌تر از تیمار نانو بود و بر عکس غلظت روی اندام هوایی تیمار بالک اکسید روی بیش‌تر از تیمار نانوآکسید روی بود.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی نتایج نشان داد برخلاف آنچه انتظار می‌رفت سمیت نانوآکسید روی برای رشد گیاه شنبلیله مشابه ذرات بالک این عنصر بود اما برای گره‌های ریزوبیومی و غلظت فسفر ریشه گیاه، سمیت نانوذرات اکسید روی بیش‌تر از ذرات بالک بود و این مسأله نگرانی اثرات نانوذرات در بوم‌نظام‌های کشاورزی را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌توده، سمیت گیاهی، سمیت نانو، گره ریزوبیومی

مقدمه

علم نانو تکنولوژی به سرعت در حال پیشرفت است و به‌عنوان یک صنعت تریلیون دلاری تلقی می‌شود (۲۷) علوم پزشکی، مواد و الکترونیک از جمله علمی هستند که از نانو تکنولوژی استفاده زیاد و سود می‌برند (۱۳). علاوه بر این، امروزه پژوهش‌گران از زوایای دیگری سعی دارند که کاربردهای بالقوه نانو را در بخش کشاورزی نیز مشخص نمایند (۳۰). یکی از مهم‌ترین پیامدهایی که قبل از استفاده گسترده از نانوذرات و نانوکپسول‌ها در کشاورزی باید در نظر گرفته شود، سمیت احتمالی آن‌ها می‌باشد (۲۸). از طرف دیگر، از آن‌جا که نانوذرات کاربردهای رو به رشدی دارند، به‌طور حتمی وارد بوم‌نظام‌ها می‌شوند و پیش‌بینی می‌شود که خاک‌ها و رسوبات مخزن نهایی برای ورود این مواد باشد (۱۲).

اگرچه غلظت‌های محیطی بیش‌تر نانوذرات ناشناخته است، مدل‌های نشان می‌دهد که غلظت نانوذرات در خاک بیش‌تر از غلظت آن‌ها در آب و یا هوا است، بنابراین، خاک می‌تواند یک مخزن مهمی از نانوذرات آزاد شده به محیط باشد (۱۲). مسیر دیگر ورود، از طریق بیوسالیدها (لجن فاضلاب) تیمار شده در تصفیه‌خانه‌های مرسوم (۴) می‌باشد. با توجه به

این‌که بخشی از این مواد در زمین‌های کشاورزی به‌کار می‌روند (۳۸)، بیوسالیدهای حاوی نانوذرات وارد خاک خواهند شد (۲۷). در خاک، نانوذرات می‌توانند توسط ریشه گیاهان جذب و به اندام هوایی گیاهان انتقال پیدا کنند و در نهایت وارد زنجیره غذایی شوند و مصرف‌کننده‌ها را تهدید کنند (۷). بنابراین درک رفتار انتقال نانوذرات در خاک و گیاه برای کاهش خطرات بالقوه برای محیط زیست و سلامت انسان‌ها نقش خواهد داشت.

نانوذرات به‌عنوان موادی با ابعاد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند و در مقیاسی بین مولکول‌های منفرد و مواد بالک (ترکیبات با اندازه ذرات میکرومتر) مربوط به آن‌ها می‌باشند و بنابراین مشخصاً ویژگی‌های منحصر به فرد متفاوت از مولکول و انواع بالک خود دارند (۳۷). از ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات، سطح ویژه بسیار بالا و انرژی سطحی بالا می‌باشد. این ویژگی‌های غیرمعمول منجر به رفتار و سرنوشتی متفاوت از نظر محیطی نسبت به انواع بالک آن‌ها می‌شود.

گیاهان یک جزء محیطی اصلی در همه بوم‌نظام‌ها می‌باشند و از طریق جذب و تجمع زیستی نقش مهمی در سرنوشت و انتقال نانوذرات در محیط دارند

مورد نیاز است (۳۲)، در غلظت‌های بالا باعث ایجاد اثرات بازدارنده رشد گیاه می‌شود. دامنه غلظت‌های بازدارنده روی بین ۴۳-۹۹۶ میلی‌گرم بر لیتر بسته به گونه گیاهی گزارش شده است (۲۹). همچنین گزارش شده است که غلظت‌های ۱۰۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک گیاه در گیاهان مختلف منجر به کاهش رشد گیاه می‌شود (۶).

در کشور ایران سبزیجات در اراضی مجاور شهرها کشت می‌گردد، بنابراین فاضلاب صنعتی و حتی خانگی در اغلب موارد در آب آبیاری این محصولات وجود دارد و بالطبع وجود نانوذرات در در چنین سیستم‌هایی محتمل است. از این‌رو، در این مطالعه اثرات نانوآکسید روی و بالک آن بر گیاه شنبليله به‌عنوان یکی از سبزیجات خوراکی در معرض نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

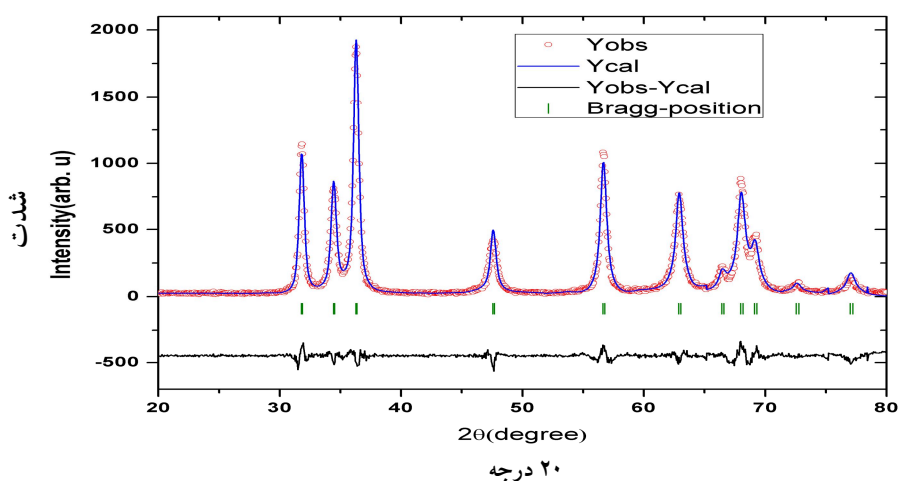
این آزمایش به‌صورت دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. در آزمایش اول ۴ غلظت از نانوذرات اکسید روی شامل ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در آزمایش دوم بالک اکسید روی در ۴ غلظت متناظر با نانوآکسید روی به‌کار برده شد. عدم کاربرد نانو و بالک اکسید روی نیز به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد.

نانوذرات اکسید روی به روش زندی و همکاران (۲۰۱۱) در آزمایشگاه دانشگاه صنعتی مالک‌اشتر تولید گردید. نمونه به‌دست آمده توسط دستگاه XRD در دامنه زاویه $2\theta=20^{\circ}-80^{\circ}$ مشخصه‌یابی شد. شکل ۱ الگوی XRD نمونه را با الگوی تجزیه ریتولد (Rietveld) با استفاده از برنامه FULLPROF نشان

(۲۳). در سال‌های اخیر مقالاتی برهمکنش نانوذرات با گیاهان را بررسی کرده‌اند (۱۹ و ۲۲). نانوتیوب کربنی تک‌جداره (SWCNTs) به‌طور معنی‌داری طولیل شدن ریشه گوجه‌فرنگی، کلم، هویج و کاهو را در ۲۴ تا ۴۸ ساعت زمان تماس به‌طور منفی تحت تأثیر قرار داد (۵). از بین ۶ گونه آزمایش شده گوجه‌فرنگی بیش‌ترین درجه حساسیت به SWCNTs را نشان داد. نشان داده شده است که نانوذرات اکسیدهای فلزی (مثل اکسید روی) در مراحل مختلف نمو گیاه هم‌چون جوانه‌زنی و طولیل شدن ساقه بازدارنده است (۱۹ و ۴۱). در ارتباط با نانوذرات فلزی، نانوذرات مس برای دو گونه ماش و گندم از طریق کاهش رشد گیاهچه سمی بود (۱۸). ماش حساس‌تر از گندم بود و پژوهش‌گران این پدیده را به تفاوت در ریخت‌شناسی و ساختار ریشه نسبت دادند. یک مطالعه دیگر سمیت نانوذرات اکسید روی را بر گیاه *Lolium perene* نشان داد و این پژوهش‌گران در آزمایش خود پی بردند که سمیت نمی‌تواند از طریق حل شدن نانوذرات اکسید روی ایجاد شده باشد (۲۰). به‌طور مشابه سمیت نانوذرات اکسید روی برای آرابیدوپسیسی شدیدتر از محلول‌های حاوی همان غلظت از روی محلول بود (۱۶). در مطالعه‌ای مواد بالک نقره و مس منجر به کاهش زیست‌توده در مقایسه با شاهد شد، اما گیاهان مواجه شده با نانوذرات درجه بیش‌تری از کاهش را نشان دادند (۳۵). این پیامد نشان می‌دهد که اگرچه اثر سمیت مربوط به اثر سمی یون روی حل شده از نانوذرات بوده است ولی حداقل بخشی از سمیت مربوط به خود نانوذرات می‌باشد. با وجود این‌که روی یک عنصر ریزمغذی برای رشد گیاه است و در فرایندهایی مانند تولید هورمون و در ساختار بیش از ۲۰۰ آنزیم

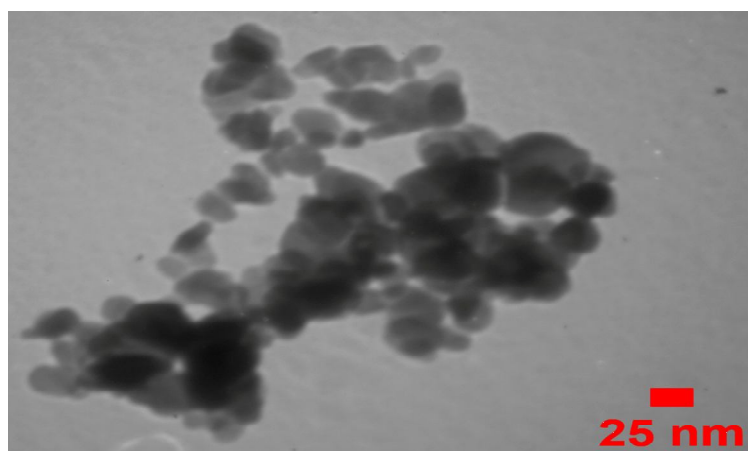
بذر شنبلیله از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. از بذور تهیه شده یک آزمون جوانه‌زنی استاندارد برای ارزیابی آزمون قوه نامیه به عمل آمد. متوسط میزان جوانه‌زنی بیش‌تر از ۹۸ درصد بود. برای تلقیح باکتری همزیست *Rhizobium melliloti* به گیاه شنبلیله، باکتری خالص به‌صورت فریز خشک از مرکز کلکسیون فارچ و باکتری‌های ایران تهیه و در اتاقک استریل فعال و در محیط کشت TSB به مدت ۵ روز بر روی شیکر ۱۸۰ دور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت گردید.

می‌دهد. متوسط اندازه ذرات d ، از ذرات نمونه با استفاده از فرمول شرر محاسبه گردید. میکروگراف میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopic، TEM) در شکل ۲ نشان داده شده است. میکروگراف TEM نشان می‌دهد که توزیع اندازه ذرات تقریباً همگن بود. متوسط اندازه ذرات ۱۸ نانومتر می‌باشد که با متوسط اندازه ذرات محاسبه شده از گسترش خط XRD قابل مقایسه است.



شکل ۱- الگوی XRD و خلوص Rietveld نانوذرات اکسید روی سنتز شده.

Figure 1. X-ray diffraction pattern and the corresponding Rietveld refinement of ZnO nanoparticles.



شکل ۲- میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نانوذرات اکسید روی.

Figure 2. TEM micrograph of ZnO nanoparticles.

۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اکسید روی) اعمال گردید. برای جلوگیری از هم‌آوری نانوذرات، آب مقطر به این ذرات اضافه و توسط دستگاه التراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه پراکنده و سپس به بستر کشت اضافه شدند.

در هنگام برداشت (۶۰ روز پس از کاشت)، پلاستیک‌ها را از گلدان خارج نموده و هر ۳ گیاهچه داخل گلدان به آرامی در آب شسته شد تا ریشه آن‌ها بدون هیچ آسیبی از بستر کشت جدا گردد. بعد از شستشوی کامل بخش هوایی از ریشه جدا و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد و طول اندام هوایی و ریشه نیز با یک خط‌کش اندازه‌گیری شد. گره‌های ریزوبیومی ریشه با استفاده از یک انبرک جدا و شمارش و توزین شدند. وزن خشک بخش هوایی و ریشه نیز بعد از خشک کردن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد آون ثابت گردید. غلظت روی ریشه و اندام هوایی نیز به‌دنبال هضم اسیدی نمونه‌های خشک شده در آون به روش میلر (۲۲) توسط دستگاه ICP-OES تجزیه شدند. از عصاره اسیدی گرفته شده در بخش قبل برای اندازه‌گیری غلظت فسفر نیز استفاده گردید. برای تعیین میزان فسفر از روش مولیبدات زرد استفاده شد. اندازه‌گیری غلظت فسفر عصاره‌ها به کمک رنگ‌سنجی و با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۵ نانومتر انجام شد (۲۸).

داده‌های آزمایش توسط نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. از مقایسه‌های ارتوگونال برای مقایسه تأثیر نانوآکسید روی با بالک آن استفاده شد.

سوسپانسیون باکتری با رسیدن به تراکم نوری (۸) در آب مقطر استریل حاوی ۱ درصد کربوکسی متیل سلولز تهیه شد. بعد از آماده‌سازی سوسپانسیون سویه باکتری، به‌منظور انجام تلقیح بذر با باکتری، بذور به مدت ۲ ساعت در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شد. بذور تلقیح‌شده به سینی‌های نشا ۷۲ حجره‌ای با حجم ۲/۵ اینچ، که از قبل با پیت: کوکوپیت به نسبت حجمی ۱:۱ پر شده بودند انتقال داده شد. پس از کشت بذور نیز ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در کنار هر بذر تزریق شد. سینی‌های نشا در گلخانه با متوسط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و برای تأمین رطوبت مورد نیاز روزانه با میزان مناسب آبیاری می‌شدند.

شن ریز (کم‌تر از ۲ میلی‌متر) ضدعفونی شده با متیل بروماید (به‌دلیل محدودیت دسترسی به اتوکلاو و اختلال بارش در ضدعفونی با تابش خورشیدی از این ماده استفاده شد) و پرلیت با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط شد. در گلدان‌های پلاستیکی نیم کیلوگرمی که از قبل در زهکش گلدان مقداری شن قرار داده شده بود. یک پلاستیک که در ته آن ۲۰ سوراخ ۵ میلی‌متری ایجاد شده بود در داخل گلدان قرار داده شد و سپس ۴۰۰ گرم از بستر کشت داخل قرار داده شد. در هر گلدان سه عدد گیاهچه شنبلیله که در مرحله ۴ برگگی بودند نشاء شد. هر گلدان نیز با ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند (با نصف غلظت) آبیاری می‌شد. گلدان‌ها در تمام طول آزمایش در گلخانه با متوسط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از اطمینان از استقرار گیاهچه‌های نشاء شده (یک هفته پس از نشاکاری)، تیمار بالک و نانوذرات اکسید روی بر اساس غلظت‌های موردنظر (صفر،

نتایج و بحث

غلظت و جذب روی در ریشه و اندام هوایی
شنبلیله: همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تأثیر نانو و بالک اکسید روی بر غلظت روی در ریشه و اندام هوایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. با افزایش غلظت نانو اکسید روی در خاک، غلظت روی در ریشه و اندام هوایی نیز به صورت صعودی افزایش پیدا کرده است (جدول ۲). میزان افزایش غلظت روی در ریشه در سطوح ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب ۱/۴، ۱/۸۸، ۲/۹۹ و ۳/۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و برای غلظت روی در اندام هوایی به ترتیب ۰/۴۶، ۱/۶، ۲/۱۷ و ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم است. برای بالک اکسید روی نیز روند افزایش تقریباً مشابه با نانو اکسید روی مشاهده شد (جدول ۲). تیمارهای ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بالک اکسید روی غلظت روی در ریشه را در مقایسه با شاهد به ترتیب به میزان ۰/۶، ۰/۸۲، ۱/۳۹ و ۲/۵۴ برابر و غلظت روی در اندام هوایی را به ترتیب به میزان ۱/۳۱، ۲/۲۷، ۳ و ۴/۲۴ برابر افزایش داده است.

بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها تأثیر نانو و بالک اکسید روی بر جذب روی در ریشه معنی‌دار نبود (جدول ۱). اما مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف نانو اکسید روی و غلظت‌های بالک آن داشت (جدول ۲). علاوه بر این جذب روی در اندام هوایی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نانو و بالک اکسید روی قرار گرفت (جدول ۱). کم‌ترین جذب روی مربوط به شاهد و با افزایش غلظت نانو و بالک اکسید روی جذب

عنصر روی افزایش داشت (جدول ۲). مقایسه گروهی نانو در مقابل بالک اکسید روی نیز نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری از نظر غلظت روی در ریشه و اندام هوایی و عامل انتقال روی وجود دارد (جدول ۲)، اما جذب روی در ریشه و اندام هوایی بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشتند. گروه تیمار نانو اکسید روی به میزان ۶۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم میزان بیش‌تری روی در ریشه در مقایسه با گروه بالک آن تجمع داده در حالی‌که به میزان ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی کم‌تری در اندام هوایی تجمع داده است (جدول ۲). به احتمال زیاد اندازه کوچک‌تر نانوذرات جذب بیش‌تر را نسبت به بالک القا می‌کند و بنابراین روی بیش‌تری در ریشه تجمع یافته است. در مطالعه‌ای جذب روی ریشه بیش‌تر در تیمار نانوذرات در مقایسه با بالک اکسید روی مشاهده شد، با وجود این‌که حل شدن بالک اکسید روی بیش‌تر از نانو اکسید روی در خاک بود (۳). نتایج مخرجه و همکاران (۲۵) نشان داد که غلظت روی در برگ تیمارهای نانو بیش‌تر از تیمار بالک بود. عامل انتقال روی گروه تیمار بالک اکسید روی به اندازه ۰/۳۲ بیش‌تر از گروه تیمار نانو اکسید روی بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که در تیمارهای بالک نسبت به تیمارهای نانو، روی بیش‌تری به اندام هوایی انتقال پیدا کرده است. مطالعات دیگری نیز نشان داده‌اند که تجمع روی در بافت گیاهی با افزایش غلظت تیمارهای نانو و بالک اکسید روی افزایش می‌یابد (۱۷). اما آن‌ها بر خلاف نتایج ما نشان دادند که عامل انتقال نانوذرات نسبت به بالک اکسید روی بیش‌تر بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نانو و بالک اکسید روی بر غلظت و جذب روی ریشه و اندام هوایی و عامل انتقال روی در گیاه شنبلیله.

Table 1. Analysis of variance of ZnONPs and bulk effect on Zn concentration and uptake in the root and shoot and Zn translocation factor in fenugreek.

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	غلظت روی در ریشه Zn conc. in root	غلظت روی در اندام هوایی Zn conc. in shoot	عامل انتقال روی Translocation factor of Zn	جذب روی در ریشه Zn uptake in root	جذب روی در اندام هوایی Zn uptake in shoot
N نانو اکسید روی ZnO NPs	4	11323**	3125**	0.02*	0.001	0.0009**
خطای آزمایشی Error	10	2115	85	0.005	0.0005	0.0001
B بالک اکسید روی ZnO bulk	4	6408**	4019**	0.06*	0.0007	0.001*
خطای آزمایشی Error	10	579	134	0.01	0.0002	0.0003
N در مقابل B N vs. B	1	9142** (+61)	1497** (-15)	0.13** (+0.3)	0.0008 (+0.023)	0.0004 (-0.003)

* و ** به ترتیب بیانگر معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشد.

اعداد داخل پرانتز میانگین نانو منهای میانگین بالک را نشان می دهد.

* and ** indicate significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.
Values within parenthesis indicate difference ZnONPs minus bulk.

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان غلظت و جذب روی و عامل انتقال روی در گیاه شنبلیله تحت تأثیر نانو و بالک اکسید روی.

Table 2. The mean comparison of Zn concentration and uptake and translocation factor in fenugreek affected by ZnO NPs and bulk.

تیمار Treatment	0 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	375 mg/kg	500 mg/kg
غلظت روی در ریشه (میلی گرم بر کیلوگرم) Zn concentration in root (mg/kg)					
نانو اکسید روی ZnONPs	48.5 ^b	119.6 ^{ab}	140.1 ^a	189.4 ^a	202.1 ^a
بالک اکسید روی ZnO bulk	48.5 ^b	81.8 ^{bc}	88.7 ^{bc}	116.1 ^b	171.9 ^a
غلظت روی در اندام هوایی (میلی گرم بر کیلوگرم) Zn concentration in shoot (mg/kg)					
نانو اکسید روی ZnONPs	22.6 ^c	33.0 ^c	60.7 ^b	71.8 ^b	103.7 ^a
بالک اکسید روی ZnO bulk	22.6 ^b	52.3 ^c	74.1 ^b	90.9 ^b	118.6 ^a
عامل انتقال روی Zn translocation factor					
نانو اکسید روی ZnONPs	0.47 ^{ab}	0.29 ^c	0.44 ^{ab}	0.38 ^c	0.53 ^a
بالک اکسید روی ZnO bulk	0.47 ^b	0.67 ^a	0.69 ^a	0.85 ^a	0.79 ^a

ادامه جدول ۲-

Continue Table 2.

تیمار Treatment	0 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	375 mg/kg	500 mg/kg
جذب روی در ریشه (میلی گرم بر گلدان) Zn uptake in root (mg/pot)					
نانو اکسید روی ZnONPs	0.029 ^b	0.062 ^{ab}	0.073 ^a	0.078 ^a	0.083 ^a
بالک اکسید روی ZnO bulk	0.029 ^b	0.042 ^{ab}	0.039 ^b	0.053 ^b	0.070 ^a
جذب روی در اندام هوایی (میلی گرم بر گلدان) Zn uptake in shoot (mg/pot)					
نانو اکسید روی ZnONPs	0.034 ^c	0.053 ^b	0.070 ^{ab}	0.067 ^a	0.079 ^a
بالک اکسید روی ZnO bulk	0.034 ^c	0.051 ^b	0.068 ^{ab}	0.079 ^{ab}	0.086 ^a

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Means followed by the same letters in a row are not significantly different at P=0.05 according to LSD.

(جدول ۳). افزایش غلظت بالک اکسید روی باعث کاهش معنی‌دار غلظت فسفر در ریشه در سطوح ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با شاهد به ترتیب به میزان ۲۴، ۲۵ و ۳۷ درصد شده است (جدول ۴). بر اساس مقایسات گروهی نانو در مقابل بالک اکسید روی (جدول ۳)، غلظت و جذب فسفر در ریشه در گروه تیمار نانو اکسید روی به ترتیب ۰/۳۵۸ میلی‌گرم بر گرم و ۰/۱۵ گرم در گلدان کم‌تر از گروه تیمار بالک آن بوده است، در حالی که جذب فسفر در اندام هوایی در گروه تیمار نانو اکسید روی به میزان ۰/۷۵ گرم در گلدان بیش‌تر از گروه بالک آن بوده است. از نظر غلظت فسفر در اندام هوایی نیز اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه تیماری مشاهده نشد (جدول ۳). بحث فسفر در خاک‌های آلوده به روی از موارد جالب توجه بوده است، به دلیل این‌که برهمکنش روی-فسفر در صورتی که غلظت هر یک از آن‌ها از حد فراتر رود، بر قابلیت دسترسی یکدیگر

غلظت و جذب فسفر در ریشه و اندام هوایی شنبلیله: نتایج نشان داد که تأثیر نانو اکسید روی بر غلظت و جذب فسفر در ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). به طوری که غلظت و جذب فسفر در ریشه در تمام سطوح نانو اکسید روی به طور معنی‌داری کم‌تر از شاهد بود (جدول ۴). میزان کاهش غلظت فسفر در ریشه در سطوح ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی در مقایسه با شاهد به ترتیب ۳۴، ۳۶، ۴۹ و ۴۸ درصد بود. بر اساس نتایج تجزیه واریانس غلظت و جذب فسفر در اندام هوایی تحت تأثیر غلظت نانو اکسید روی به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد قرار گرفته است (جدول ۳). بالاترین غلظت نانو اکسید روی (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به طور معنی‌داری باعث کاهش غلظت فسفر در اندام هوایی شد (جدول ۴). بالک اکسید روی بر غلظت و جذب فسفر در ریشه و جذب فسفر اندام هوایی تأثیر معنی‌داری داشته است

برای گیاه تأثیر می‌گذارند (۱۱). در خاک‌های دارای میزان زیاد روی، ممکن است سوخت‌وساز و جذب فسفر کاسته شود (۳۴). در مورد نانوذرات اکسید روی تاکنون گزارشی از اثر بر غلظت و جذب فسفر گزارش نشده است. ولی از آن‌جا که تأثیر نانوذرات اکسید روی بر غلظت و جذب فسفر ریشه بیش‌تر از بالک آن است، شناخت اثر نانوذرات در مطالعات آینده باید مدنظر قرار گیرد.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر نانو و بالک اکسید روی بر غلظت و جذب فسفر در گیاه شنبلیله.

Table 3. Analysis of variance of ZnONPs and bulk effect on phosphorus concentration and uptake in fenugreek.

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	غلظت فسفر		جذب فسفر	
		در ریشه P conc. in root	در اندام هوایی P conc. in shoot	در ریشه P uptake in root	در اندام هوایی P uptake in shoot
N نانواکسید روی ZnO NPs خطای آزمایشی Error	4	0.891**	0.135*	0.533**	5.62**
	10	0.118	0.047	0.035	0.174
	4	0.408*	0.403	0.361**	3.30**
B بالک اکسید روی ZnO bulk خطای آزمایشی Error	10	0.087	0.055	0.045	0.310
	1	0.285* (-0.358)	0.083 (-0.023)	0.152** (-0.15)	3.26** (0.752)

* و ** به ترتیب بیانگر معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

اعداد داخل پرانتز میانگین نانو منهای میانگین بالک را نشان می‌دهد.

* and ** indicate significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.
Values within parenthesis indicate difference ZnONPs minus bulk.

جدول ۴- مقایسه میانگین میزان غلظت و جذب فسفر در گیاه شنبلیله تحت تأثیر نانو و بالک اکسید روی.

Table 4. The mean comparison of phosphorus concentration and uptake in fenugreek affected by ZnO NPs and bulk.

تیمار Treatment	0 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	375 mg/kg	500 mg/kg
غلظت فسفر در ریشه (میلی‌گرم بر گرم) P concentration in root (mg/g)					
نانواکسید روی ZnONPs	2.69 ^a	2.0 ^b	1.71 ^{bc}	1.36 ^c	1.39 ^{bc}
بالک اکسید روی ZnO bulk	2.69 ^a	2.18 ^{ab}	2.03 ^b	2.01 ^b	1.68 ^b
غلظت فسفر در اندام هوایی (میلی‌گرم بر گلدان) P concentration in shoot (mg/g)					
نانواکسید روی ZnONPs	3.18 ^a	3.30 ^a	3.03 ^{ab}	2.96 ^{ab}	2.75 ^b
بالک اکسید روی ZnO bulk	3.18 ^a	3.17 ^a	3.09 ^a	2.95 ^a	2.93 ^a

ادامه جدول ۴-

Continue Table 4.

تیمار Treatment	0 mg/kg	125 mg/kg	250 mg/kg	375 mg/kg	500 mg/kg
جذب فسفر در ریشه (میلی‌گرم بر گلدان) P uptake in root (mg/pot)					
نانو اکسید روی ZnONPs	1.58 ^a	1.04 ^b	0.90 ^{bc}	0.561 ^{cd}	0.56 ^d
بالک اکسید روی ZnO bulk	1.58 ^a	1.17 ^b	0.89 ^{bc}	0.93 ^{bc}	0.67 ^c
جذب فسفر در اندام هوایی (میلی‌گرم بر گلدان) P uptake in shoot (mg/pot)					
نانو اکسید روی ZnONPs	4.86 ^a	5.33 ^a	3.55 ^b	2.75 ^c	2.10 ^c
بالک اکسید روی ZnO bulk	4.86 ^a	3.15 ^b	2.88 ^{bc}	2.59 ^{bc}	2.10 ^c

در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Means followed by the same letters in a row are not significantly different at P=0.05 according to LSD.

کاهش تعداد گره در غلظت ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بالک اکسید روی نیز به ترتیب ۳۲، ۴۴ و ۳۶ درصد بود. مقایسه گروهی نانو در مقابل برای تعداد گره ریشه شنبلیله نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود ندارد. با اینحال تیمار بالک به میزان ۱/۶ گره بیش‌تری نسبت به تیمار نانو داشتند (جدول ۵).

اثر نانو و بالک اکسید روی نیز بر وزن گره ریشه معنی‌دار بوده است (جدول ۵). مقایسه میانگین تیمارها در شکل ۴ A نشان می‌دهد که افزایش غلظت نانو اکسید روی باعث کاهش معنی‌دار وزن گره ریشه شده است. به طوری که میزان کاهش وزن گره در غلظت ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی به ترتیب ۳۴، ۳۸، ۶۴ و ۷۳ درصد بود. پایین‌ترین غلظت بالک اکسید روی (۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اختلاف معنی‌داری از نظر وزن گره ریشه با شاهد نداشت. بالک اکسید روی در غلظت ۲۵۰ به بالا باعث کاهش معنی‌دار وزن گره ریشه نسبت به شاهد گردید. به طوری که در غلظت ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بالک به ترتیب ۲۱، ۴۶ و ۵۴

تعداد و وزن گره ریزویومی: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، غلظت نانو اکسید روی به طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۱ درصد) بر تعداد گره ریشه تأثیر گذاشته است (جدول ۵). در شکل ۳ A مشاهده می‌شود که تعداد گره ریشه با افزایش غلظت نانو اکسید روی کاهش پیدا کرده است. حتی پایین‌ترین غلظت نانو اکسید روی باعث کاهش معنی‌دار تعداد گره ریشه در مقایسه با شاهد شده است. میزان کاهش تعداد گره در غلظت ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی به ترتیب ۲۴، ۲۹، ۵۴ و ۵۰ درصد بود. به عبارتی بیش‌ترین کاهش تعداد گره ریشه در غلظت ۳۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی اتفاق افتاد.

تأثیر بالک اکسید روی نیز بر این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۵). به طوری که پایین‌ترین غلظت بالک اکسید روی (۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنی‌دار تعداد گره ریشه نسبت به شاهد به میزان ۳۹ درصد شد (شکل ۳ B). در حالی که این غلظت از نظر تعداد گره ریشه اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌های بالک نداشت.

درصد وزن گره ریشه را کاهش داده است (شکل ۴). مقایسه گروهی نانو در مقابل بالک برای وزن گره ریشه نشان داد که اختلاف معنی داری بین این دو گروه وجود دارد. تیمار بالک اکسید روی به اندازه ۰/۰۲۵ گرم وزن گره بیشتری نسبت به تیمار نانو اکسید روی داشتند. به عبارتی تیمار نانو اکسید روی سمیت بیشتری برای وزن گره نسبت به تیمار بالک آن داشت.

جدول ۵- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نانو و بالک اکسید روی بر تعداد و وزن گره ریزوبیومی، طول ریشه و اندام هوایی، وزن تر ریشه و اندام هوایی شنبلیله.

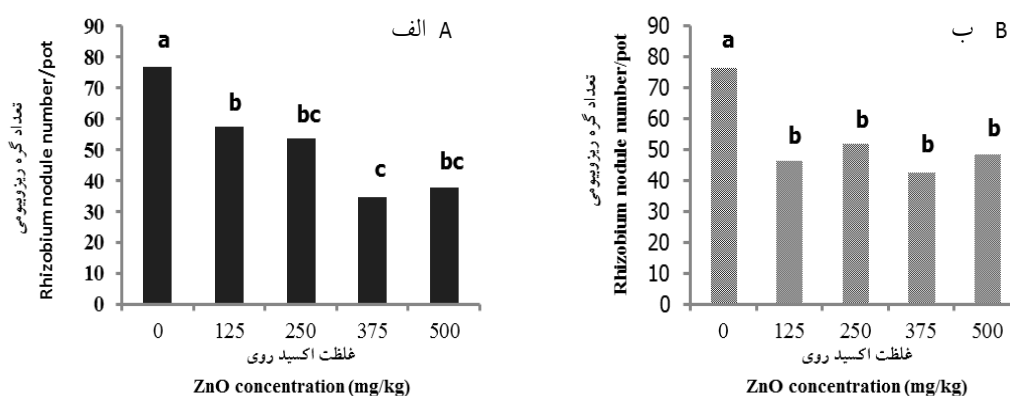
Table 3. Analysis of variance (mean square) of ZnONPs and bulk effect on number and biomass of nodule, length of root and shoot, and weight of root and shoot of of fenugreek.

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد گره Nodule number	وزن گره Nodule biomass	طول ریشه Root length	طول ساقه Shoot length	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن تر اندام هوایی Shoot fresh weight
N نانو اکسید روی ZnO NPs	4	860**	0.0026**	5.17 ^{ns}	164**	12**	26**
	10	215	0.0001	3.2	8	1	1
B بالک اکسید روی ZnO bulk	4	544**	0.0023**	1.87 ^{ns}	28*	7*	19*
	10	93	0.0030	3.4	8	2	4
B در مقابل N N vs. B	1	15 ^{ns} (-1.61)	0.002** (-0.025)	6.6 ^{ns} (+1.04)	288** (+6.9)	5.4 ^{ns} (-0.95)	16.4** (+1.65)

* و ** به ترتیب بیانگر معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی داری را نشان می دهد.

اعداد داخل پرانتز میانگین نانو منهای میانگین بالک را نشان می دهد.

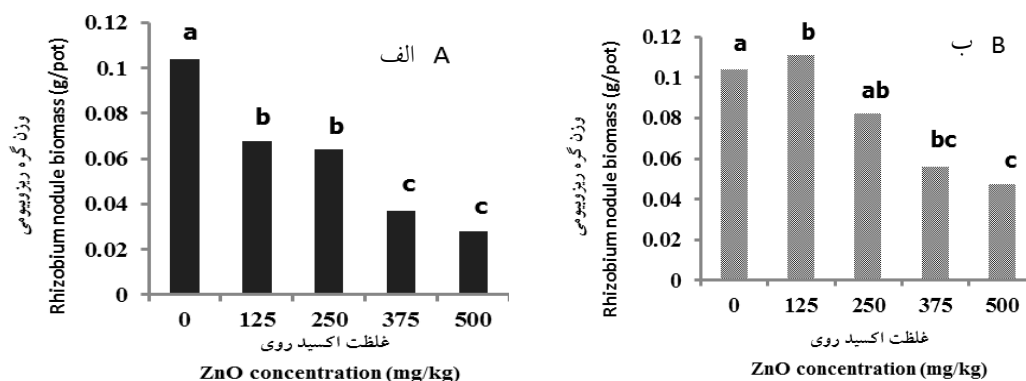
* and ** indicate significant at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively and ^{ns} indicated non significant. Values within parenthesis indicate difference ZnONPs minus bulk.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک اکسید روی (B) بر تعداد گره ریزوبیومی در گیاه شنبلیله.

میانگین های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵ درصد می باشند.

Figure 3. Mean comparison of rhizobium nodule number affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P<0.05$).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک اکسید روی (B) بر وزن گره ریزوبیومی در گیاه شنبلیله.

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Figure 4. Mean comparison of rhizobium nodule biomass affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).

این فرایندها بر قابلیت دسترسی آن تأثیر می‌گذارد (۱۵). با این وجود مطالعاتی نشان داد که نانوذرات اکسیدهای فلزی در خاک از رشد باکتری‌های خاک در هر دو خاک معدنی و آلی جلوگیری می‌کند (۳۳). سمیت بیش‌تر نانوذرات اکسید روی برای وزن گره ممکن است به دلیل کاهش بیش‌تر غلظت و جذب فسفر ریشه برای این گروه تیماری نسبت به بالک آن باشد، به این دلیل که فرایند تثبیت نیتروژن به دلیل نیاز بالای انرژی نیاز بالایی به فسفر دارد (۳۹). همچنین گزارش شده که کمبود فسفر زیست‌توده گره را بیش‌تر از رشد گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۱ و ۳۹).

طول ریشه و ساقه شنبلیله: در مطالعات سمیت‌شناسی گیاه، انتخاب شاخص مناسب یکی از متغیرهایی است که باید به آن توجه شود. طول‌شدن ریشه یکی از شاخص‌های استاندارد سمیت‌شناسی گیاهی می‌باشند که توسط USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) پیشنهاد شده است. همان‌طور که در نتایج تجزیه واریانس مشاهده می‌شود تأثیر نانوآکسید روی و بالک آن بر طول ریشه گیاه شنبلیله معنی‌دار نبوده است (جدول ۵)، این در حالی است دیگر پژوهش‌گران بازدارندگی طول‌شدن ریشه هویج

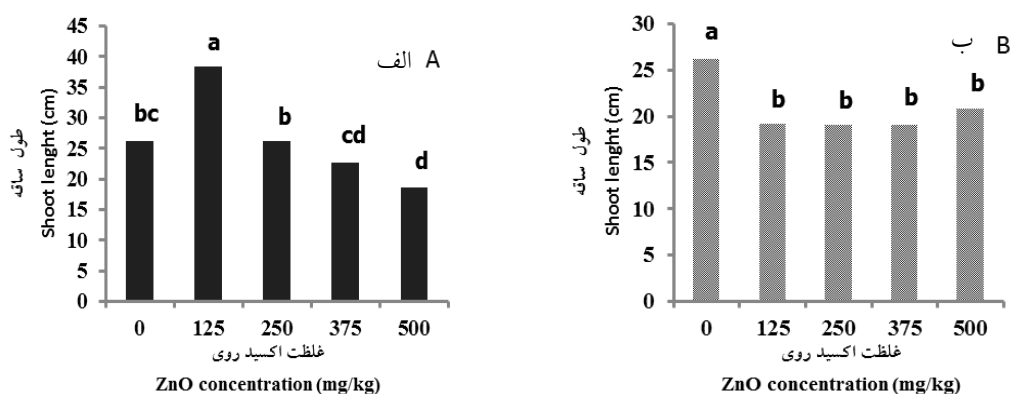
تعداد گره و وزن گره به‌عنوان شاخصی از رشد باکتری می‌باشد. نتایج باندیوپادای و همکاران (۳) نشان داد که نانوذرات اکسید روی و اکسید سریم پتانسیل اثرات منفی بر رشد *Sinorhizobium meliloti* در پتری‌دیش داشتند. آن‌ها نشان دادند که نانوذرات اکسید روی سمیت بیش‌تری نسبت به تیمار یونی و بالک اکسید روی بر باکتری داشت. در مطالعه دیگری نیز برهمکنش نانوذرات با اجتماع همزیست گیاه-باکتری بررسی شد (۳۱). این مطالعه نشان داد که نانوآکسید سریم روی تثبیت نیتروژن توسط باکتری را در گره‌های ریشه سویا کاهش داد، اما نانوذرات اکسید روی علی‌رغم اثر منفی بر رشد سویا تأثیری بر تثبیت نیتروژن/ گره‌زایی نداشت (۳۱). کاهش معنی‌دار گره‌زایی با افزایش غلظت نانوآکسید روی در آزمایش بر خلاف نتایج پرستر و همکاران (۴۳) ممکن است به دلیل تفاوت در بستر کشت باشد، به این دلیل که بر اساس مطالعات، ویژگی‌های خاک از جمله ماده آلی بر قابلیت دسترسی نانوذرات تأثیر می‌گذارد. وقتی نانوذرات اکسید فلزی به درون خاک رها می‌شوند ممکن است دچار فرایندهایی هم‌چون هم‌آوری، جذب سطحی، حل شدن و جابجایی شوند که همه

شاهد شده است (شکل ۵ A). به نظر می‌رسد که کم‌ترین غلظت نانواکسید روی باعث تحریک رشد طول اندام هوایی می‌شود. بالک اکسید روی در همه غلظت‌ها باعث کاهش معنی‌دار طول ساقه در مقایسه با شاهد گردید (شکل ۵ B).

مقایسه گروهی نانو در مقابل بالک برای طول ساقه شنبلیله نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود دارد. تیمار نانواکسید روی به اندازه ۶ سانتی‌متر طول ساقه بلندتری نسبت به تیمار بالک اکسید روی داشتند (جدول ۵). این در حالی است که مطالعه‌ای نشان داد نانواکسید روی تغییری در طول اندام هوایی ایجاد نکرد ولی تیمار متوسط بالک اکسید روی (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد ایجاد کرد (۳).

(۱۴)، تربچه و ری گراس (۱۹) و کلزا (۲۴) را در تماس با سوسپانسیون غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی در پتری‌دیش در گیاه گندم در بستر شن (۹) و در سویا در بستر خاک (۳۱) گزارش کرده‌اند. برخی مطالعات نیز حتی افزایش طول ریشه را با نانو و بالک اکسید روی گزارش کردند (۲۵). مقایسه‌های گروهی نانو در مقابل بالک نیز نشان داد که گروه تیمار نانو تفاوت معنی‌داری با گروه تیماری بالک اکسید روی از نظر طول ریشه نداشتند.

طول ساقه گیاه شنبلیله به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر نانو و بالک اکسید روی قرار گرفت (جدول ۵). کم‌ترین غلظت نانواکسید روی (۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث افزایش معنی‌دار طول اندام ساقه گردید. این در حالی است که غلظت ۳۷۵ به بالا باعث کاهش معنی‌دار طول ساقه نسبت به



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک اکسید روی (B) بر طول ساقه شنبلیله.

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Figure 5. Mean comparison of shoot length affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).

غلظت (۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیز نسبت به شاهد باعث کاهش وزن تر ریشه شده است (شکل ۶ A). این در حالی است که وزن خشک ریشه در غلظت ۳۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانواکسید روی کاهش معنی‌دار نشان داده است (شکل ۷ A).

وزن تر و خشک و درصد رطوبت ریشه شنبلیله: تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که اثر نانواکسید روی بر وزن تر و خشک ریشه معنی‌دار می‌باشد، ولی بر میزان رطوبت ریشه معنی‌دار نبود (جدول‌های ۵ و ۶). وزن تر ریشه در همه غلظت‌های نانو نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشته است و حتی پایین‌ترین

آزمایش نیز بر درجه سمیت نانوذرات تأثیر می‌گذارد. مقایسه گروهی نانو در مقابل بالک برای وزن تر و خشک و درصد رطوبت ریشه شبلیله نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری از نظر وزن تر و خشک ریشه وجود ندارد اما از نظر میزان رطوبت ریشه اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه تیمار مشاهده شد. چنان‌که تیمار بالک اکسید روی به‌میزان ۰/۴ درصد رطوبت ریشه بیش‌تری نسبت به تیمار نانو اکسید روی داشته است (جدول‌های ۵ و ۶). به‌عبارتی نانو اکسید روی باعث کاهش درصد رطوبت ریشه نسبت به بالک آن شده است. تخریب مسیرهای (کانال‌های) انتقال آب و عناصر غذایی یک مکانیسم مهم برای ایجاد خسارت توسط نانوذرات پیشنهاد شده است (۲ و ۲۰).

بالک اکسید روی بر اساس تجزیه واریانس تأثیر معنی‌داری بر وزن تر ریشه داشته است، اما تأثیر آن بر وزن خشک و میزان رطوبت ریشه معنی‌دار نبوده است. (جدول‌های ۵ و ۶). این در حالی است که مقایسه‌های میانگین‌ها نشان داد که وزن تر ریشه از غلظت ۳۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داده است (شکل ۶ B) و بالاترین غلظت بالک اکسید روی وزن خشک ریشه را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داده است (شکل ۷ B). کاهش رشد و بیومس ریشه در اثر نانوذرات اکسید روی در هماهنگی با نتایج مطالعات قبلی است (۱۹ و ۳۱). در مطالعه دیمپا و همکاران (۸ و ۹) طول ریشه گندم در کشت شن کاهش نشان داد اما در محیط خاک کاهش نشان نداد. این یافته‌ها از این نکته حمایت می‌کند که شرایط

جدول ۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر نانو و بالک اکسید روی بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی، میزان رطوبت ریشه و اندام هوایی و نسبت ریشه به اندام هوایی شبلیله.

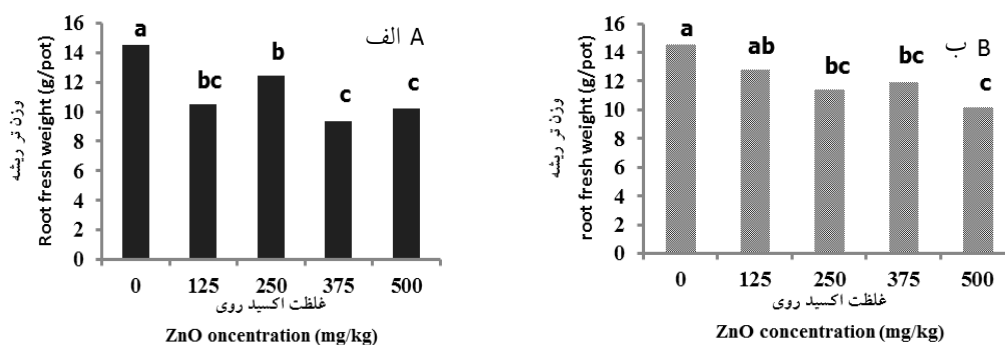
Table 3. Analysis of variance (mean square) of ZnONPs and bulk effect on number and biomass of nodule, length of root and shoot, and weight of root and shoot of of fenugreek.

	منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	میزان رطوبت ریشه Root moisture	میزان رطوبت اندام هوایی Shoot moisture	نسبت وزن ریشه به اندام هوایی Root/Shoot ratio
N	نانو اکسید روی ZnO NPs	4	0.019*	0.407**	0.45	1.3	0.018**
	خطای آزمایشی Error	10	0.004	0.005	0.61	1.2	0.002
B	بالک اکسید روی ZnO bulk	4	0.018	0.28**	0.07	1.7	0.017
	خطای آزمایشی Error	10	0.009	0.038	0.35	0.8	0.016
	B در مقابل N N vs. B	1	0.0001 (+0.005)	0.32** (+0.23)	1.09* (-0.42)	2.3 (-0.63)	0.061* (-0.101)

* و ** به ترتیب بیانگر معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

اعداد داخل پرانتز میانگین نانو منهای میانگین بالک را نشان می‌دهد.

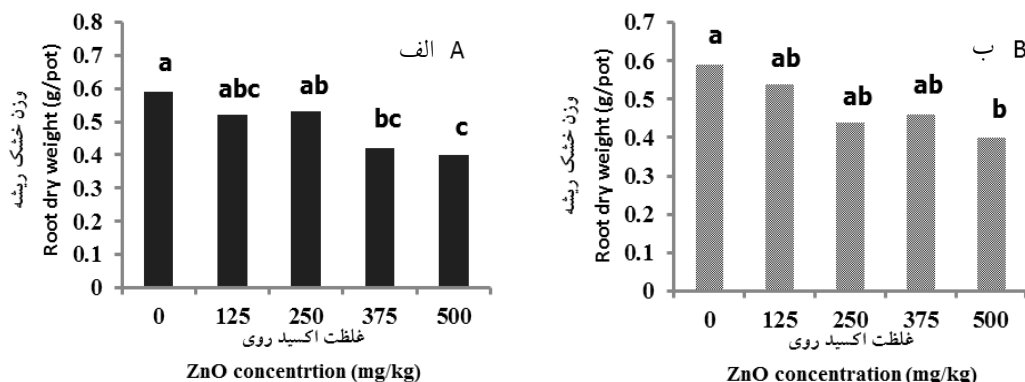
* and ** indicate significant at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.
Values within parenthesis indicate difference ZnONPs minus bulk.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک (B) اکسید روی بر وزن تر ریشه شبلیله.

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Figure 6. Mean comparison of root fresh weight affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک (B) اکسید روی بر وزن خشک ریشه شبلیله.

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

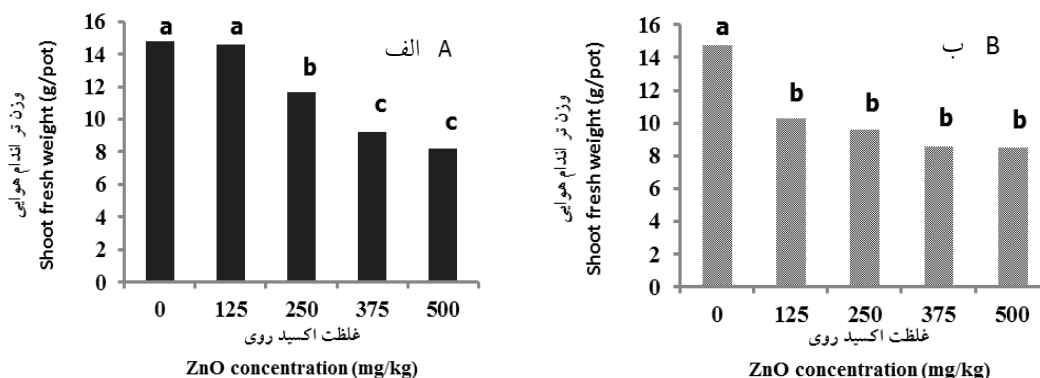
Figure 7. Mean comparison of root dry weight affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).

بالک اکسید روی از غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی نسبت به شاهد شد. غلظت ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بالک اکسید روی به ترتیب ۳۴، ۴۲ و ۴۲ درصد وزن تر اندام هوایی و به میزان ۳۳، ۳۸، ۴۳ و ۵۲ درصد وزن خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد کاهش داده است (شکل‌های ۸ و ۹). مقایسه گروهی نانو در مقابل بالک برای وزن تر و خشک و میزان رطوبت اندام هوایی شبلیله نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری از نظر میزان رطوبت اندام هوایی وجود ندارد. اما از نظر وزن تر و خشک اندام هوایی اختلاف معنی‌داری بین این دو

وزن تر و خشک و رطوبت اندام هوایی شبلیله: همان‌طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود اثر نانو اکسید روی بر وزن تر و خشک اندام هوایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است، ولی بر میزان رطوبت اندام هوایی معنی‌دار نبود. وزن تر و خشک اندام هوایی از غلظت ۲۵۰ به بالا نانو اکسید روی کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داده است (شکل‌های ۸ و ۹). به طوری که در غلظت ۲۵۰، ۳۷۵، ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو اکسید روی، وزن تر اندام هوایی به ترتیب به میزان ۲۱، ۳۷ و ۴۴ درصد و وزن خشک اندام هوایی به ترتیب به میزان ۲۳، ۳۹ و ۵۰ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان داده است.

حالی که بالک آن نه تنها باعث کاهش زیست‌توده اندام هوایی نگرددید بلکه میزان آن با افزایش غلظت نانو اکسید روی در بستر خاک افزایش پیدا کرد (۳). مطالعه دیگری نیز نشان داد که زیست‌توده اندام هوایی با افزایش غلظت نانو اکسید روی در خاک تغییر معنی‌داری نداشت (۳۱).

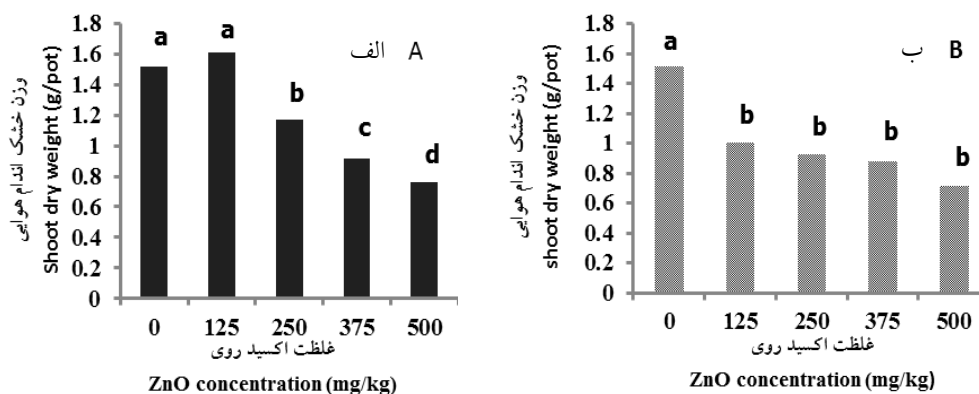
گروه تیمار مشاهده شد. چنان‌که تیمار بالک اکسید روی به ترتیب به میزان ۱/۶۵ و ۰/۲۳ گرم وزن تر و خشک اندام هوایی کم‌تری نسبت به تیمار نانو اکسید روی داشته است (جدول‌های ۵ و ۶). دیگر پژوهش‌گران گزارش کردند که نانو اکسید روی باعث کاهش معنی‌دار زیست‌توده اندام هوایی گردید در



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک (B) اکسید روی بر وزن تر اندام هوایی شنبله.

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Figure 8. Mean comparison of shoot fresh weight affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر غلظت نانو (A) و بالک (B) اکسید روی بر وزن خشک اندام هوایی شنبله.

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

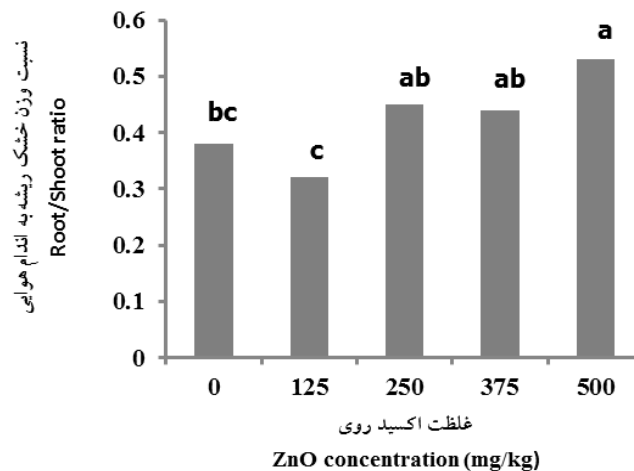
Figure 9. Mean comparison of shoot dry weight affected by ZnO NPs (A) and bulk (B). Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).

تأثیر معنی‌داری داشته است، این در حالی است که بالک اکسید روی تأثیر معنی‌داری بر این صفت نداشته است. در شکل ۸ ملاحظه می‌شود که بیش‌ترین نسبت

نسبت وزن ریشه به اندام هوایی: همان‌طور که در جدول ۶ نشان داده شده است نانو اکسید روی بر نسبت وزن ریشه به اندام هوایی در سطح احتمال ۱ درصد

کاهش وزن اندام هوایی بیش‌تر از کاهش وزن ریشه بوده است. این در حالی است که مطالعات قبلی اثر بازدرندگی بیش‌تر رشد ریشه نسبت به اندام هوایی گیاه در تماس با نانواکسید روی در گندم در مواجهه با نانواکسید روی (۸ و ۹) و نخود و سویا در مواجهه با نانواکسید روی (۱) را نشان داده بودند.

وزن ریشه به اندام هوایی در بالاترین غلظت نانواکسید روی وجود دارد و کم‌ترین نسبت در تیمار کم‌ترین غلظت نانواکسید روی مشاهده شده است. به عبارتی کم‌ترین غلظت نانواکسید با کاهش معنی‌دار ریشه نسبت به شاهد (شکل ۱۰) و عدم تغییر وزن اندام هوایی باعث کاهش نسبت وزن ریشه به اندام هوایی شده است. ولی در بالاترین غلظت نانواکسید روی



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر غلظت نانواکسید روی بر نسبت وزن ریشه به اندام هوایی شنبلیله. میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

Figure 10. Mean comparison of root/shoot ratio affected by ZnO NPs. Means with the same letter are not significantly different according to LSD ($P < 0.05$).

کشاورزی را افزایش می‌دهد. با این حال این مسأله با توجه به کاربردهای مثبت و مهم نانوتکنولوژی در علوم مختلف و به‌خصوص کشاورزی نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد که چالش ناشی از خطرات نانوذرات در کاربرد نانوتکنولوژی دقیق‌تر و با حساسیت بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مساعدت‌های مالی دانشگاه شهرکرد در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌نمائیم.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج بیانگر کاهش رشد و زیست‌توده گیاه شنبلیله و حتی گره‌های ریزوبیومی آن به‌عنوان جزء مهم گیاهان تثبیت‌کننده تحت‌تأثیر نانو و بالک اکسید روی بوده است. با این حال در مقایسه اثرات این دو ذره بر گیاه نشان داده شد که سمیت آشکار و بیش‌تر نانوذرات اکسید روی در مقایسه با ذرات بالک آن‌ها بر گیاه شنبلیله به‌جز برای گره‌های ریزوبیومی مشاهده نشد. تأثیر بیش‌تر بر گره‌های ریزوبیومی نیز به‌دلیل اهمیت بوم‌شناختی آن‌ها برای کشاورزی نیز نگرانی ورود نانوذرات به محیط به‌خصوص اراضی

منابع

1. Adhikari, T., Kundu, S., Biswas, A.K., Tarafdar, J.C. and Rao, A.S. 2012. Effect of copper oxide nano particle on seed germination of selected crops. *J. Agr. Sci. Technol.* 2: 815-23.
2. Asli, S. and Neumann, P.M. 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ.* 32: 577-84.
3. Bandyopadhyay, S., Plascencia-Villa, G., Mukherjee, A., Rico, C.M., José-Yacamán, M., Peralta-Videa, J.R. and Gardea-Torresdey, J.L. 2015. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Sci Total Environ.* 515-516: 60-69.
4. Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. and Surampalli, R.Y. 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge-evidence and impacts. *Waste Manage.* 30: 504-520.
5. Canas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E.H. and Olszyk, D. 2008. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon-nanotubes on root elongation of select crop species. *Nanomat. Environ.* 27: 1922-1931.
6. Chaney, R.L. 1993. Zinc phytotoxicity. P 135-144, In: A.D. Robson, Zinc in Soils and Plants, The University of Western Australia.
7. Dietz, K. and Herth, S. 2011. Plant Nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 16: 582-589.
8. Dimkpa, C.O., Latta, D.E., McLean, J.E., Britt, D.W., Boyanov, M.I. and Anderson, A.J. 2013. Fate of CuO and ZnO nano and micro particles in the plant environment. *Environ. Sci. Technol.* 47: 4734-42.
9. Dimkpa, C.O., McLean, J.E., Latta, D.E., Manango'n, E., Britt, D.W. and Johnson, W.P. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *J. Nanopart. Res.* 14: 1125.
10. Drevon, J.J. and Hartwig, U.A. 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta.* 201: 463-469.
11. Gildon, A. and Tinker, P.B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 95: 247-261.
12. Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W. and Nowack, B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9216-9222.
13. Hollister, P. 2002. Nanotechnology-The Tiny Revolution, CMP Cientifica. 35p.
14. Husler, B., Punnoose, A. and Serpe, M. 2014. Effects of zinc oxide nanoparticles on carrot root and arbuscular mycorrhizae. Undergraduate research and scholarship conference. Boise State University ScholarWorks. College of Arts and Sciences Presentations.
15. Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J. and Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 1825-1851.
16. Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J. and Alvarez, P.J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29: 669-75.
17. Lee, S., Kim, S., Kim, S. and Lee, I. 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 848-854.
18. Lee, W.M., An, Y.J., Yoon, H. and Kweon, H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to terrestrial plants *Phaseolus radiatus* (mung bean) and *Triticum aestivum* (wheat); plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 1915-1921.
19. Lin, D. and Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* 150: 243-50.
20. Lin, D. and Xing, B. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 42: 5580-5585.

21. Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hunson, J.S., Reid, M.L., Ratnikova, T., Rao, A.M., Lou, H. and Ke, P.C. 2009. Uptake, translocation and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small* 5: 1128-32.
22. Miller, R.O. 1998. Microwave digestion of plant tissue in an open vessel. P 85-88, In: Y.P. Krla (Ed.) *Handbook of Reference Methods for plant analysis*, CRC Press, Boca Raton, FL.
23. Monica, R.C. and Cremonini, R. 2008. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62: 161-165.
24. Mousavi Kouhi, S.M., Lahouti, M., Ganjeali, A. and Entezari, M.H. 2014. Comparative phytotoxicity of ZnO nanoparticles, ZnO microparticles, and Zn²⁺ on rapeseed (*Brassica napus* L.): investigating a wide range of concentrations. *Toxicol. Environ. Chem.* 96: 861-868.
25. Mukherjee, A., Peralta-Videa, JR., Bandyopadhyay, S., Rico, C.M., Zhao, L. and Gardea-Torresdey, J.L. 2014. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics*. 6: 132-138.
26. Nel, A., Xia, T., Moedler, L. and Li, N. 2006. Toxic potential of materials at nanolevel. *Sci.* 311: 622-627.
27. Nowak, B., Ranville, J.F., Diamond, S., Gallego-Urrea, J.A., Metcalfe, C., Rose, J., Horne, N., Koelmans, A.A. and Klaine, S.J. 2012. Potential scenarios for nanomaterials release and subsequent alteration in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 50-59.
28. Olsen, S.R. and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. P 403-430. In: Page, A.L. et al. (eds), *Methods of Soil Analysis, Part 2*, 2nd edn., Agron Monogr 9. ASA and ASSA, Madison WI.
29. Paschke, M.W., Perry, L.G. and Redente, E.F. 2006. Zinc toxicity thresholds for reclamation forb species. *Water Air Soil Pollut.* 170: 317-330.
30. Perez-de-Luque, A. and Rubiales, D. 2009. Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Manage. Sci.* 65: 540-545.
31. Priester, J.H., Ge, Y., Mielke, R.E., Horst, A.M., Moritz, S.C., Epinosa, K., Gelb, J., Walker, S.L., Nisbert, R.M., An, Y.J., Schimel, J.P., Palmer, R.G., Hernandez, J.A., Zhao, L., Gardea-torresdey, J.L. and Holden, P.A. 2012. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *PMAS PIUS*. 1: 1-6.
32. Rayner-Canham, G. 1999. *Descriptive Inorganic Chemistry*. Freeman press, New York, 768p.
33. Rousk, J., Ackermann, K., Curling, S.F. and Jones, D.L. 2012. Comparative toxicity of nanoparticulate CuO and ZnO to soil bacterial communities. *PLOS ONE* 7: 3. 1-8.
34. Safaya, N.M. 1976. P-Zn interaction in relation to absorption rates of P, Zn, Cu, Mn and Fe in com. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 40: 719-722.
35. Stampoulis, D., Sinha, S.K. and White, J. C. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9473-9479.
36. Sulieman, S., Schulze, J. and Tran, L.S. 2013. Comparative analysis of the symbiotic efficiency of *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* under phosphorus deficiency. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 5198-5213.
37. Taylor, R. and Walton, D.R.M. 1993. The chemistry of fullerenes. *Nature*. 363: 685-93.
38. US Environmental Protection Agency (USEPA). 2011. Introduction to the National Pretreatment Program Office of Wastewater Management, Environmental Protection Agency Washington, Dc.
39. Vadez, V., Beck, D.P., Lasso, J.H. and Drevon, J.J. 1997. Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N₂ fixation to limiting P nutrition in common bean. *Physiol. Plant.* 99: 227-232.
40. Wang, P., Menzies, N.W., Lombi, E., McKenna, B.A., Johannessen, B. and Glover, C.J. 2013. Fate of ZnO nanoparticles in soils and Cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Sci. Technol.* 47: 13822-30.

41. Yang, L. and Watts, D.J. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Letters*. 158: 122-32.
42. Zandi, S., Kameli, P., Salamati, H., Ahmadvand, H. and Hakimi, M. 2011. Microstructure and optical properties of ZnO nanoparticles prepared by a simple method. *Physica B*. 406: 3215-3218.
43. Zhao, L., Peralta-Videa, R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Micheld, H., Li, C., Zhang, J., Aguilera, R.J., Kellerf, A.A. and Gardea-Torresdeya, J.L. 2012. Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. *J. Hazard Mat.* 225-226: 131-138.