Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.3, Fall 2018, P. 419-427
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۴۲۷-۴۱۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA بر برخی عناصر غذایی و خصوصیات رشدی گیاه اسفناج (*Spinacea oleracea*)

صبا نجاتی زاده[۱]- سعید ملک زاده شفارودی[۲*]- علیرضا آستارایی[۳]- نسرین مشتاقی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۶

چکیده

با توجه به افزایش روزافزون کاربرد نانومواد در صنایع مختلف بخصوص نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) و افزایش این ماده در خاک و آب و باتوجه به اثرات این مواد بر روی گیاهان به عنوان اولین زنجیره غذایی، بررسی و مطالعه‌ی اثرات آن بسیار حائز اهمیت می‌باشد. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به دلیل خاصیت فتوکاتالیستی[۵] خود دارای توانایی تأثیرگذاری بر سیستم‌های رشدی گیاهان می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به همراه کلاتEDTA[۶] بر غلظت عناصر غذایی نیتروژن، فسفر، پتاسیم، درصد پروتئین و همچنین برخی ویژگی‌های رشدی اسفناج به عنوان گیاه دارویی انجام شد. آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سه سطح TiO_2 (صفر= T_1، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر= T_2، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر= T_3) و دو سطح EDTA (صفر= E_1 و ۱۳۰ میلی‌مولار=E_2) با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۲ انجام شد و نمونه‌برداری از بافت برگی گیاه یک هفته پس از محلول‌پاشی و قبل از ورود گیاه به فاز زایشی انجام پذیرفت. بر اساس نتایج، تیمارهای T_1E_2,T_2E_1,T_2E_2 موجب افزایش وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی و سطح برگ شدند. همچنین نتایج نشان داد اثرات متقابل بین نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA درخصوص درصد نیتروژن، درصد پروتئین و درصد پتاسیم معنی‌دار بود، بطوری‌که بیشترین میانگین‌ها در سطوح T_2E_2 در مقایسه باT_1E_2 و T_3E_2 مشاهده شد که بیانگر تأثیر مثبت EDTA بر کاهش فعالیت سوء نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در این غلظت از نانوذره می‌باشد. کمترین غلظت نیتروژن و درصد پروتئین گیاه مربوط به تیمارهای T_1E_2, T_3E_2, T_3E_1 بود. لذا با در نظر گرفتن تأثیر مطلوب تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم به همراه ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA بر روی غلظت نیتروژن، پتاسیم، فسفر، درصد پروتئین و همچنین خصوصیات رشدی اندام هوایی گیاه، کاربرد این تیمار جهت بهبود خصوصیات رشدی گیاه اسفناج توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، تیتانیوم، سطح برگ، نانومواد، نیتروژن

مقدمه

گسترش نانوتکنولوژی در جنبه‌های مختلف زندگی بشر بخصوص در سیستم‌های کشاورزی موجب افزایش نگرانی‌هایی در رابطه با اثرات سوء احتمالی آن بر زنجیره غذایی و سلامت انسان و نهایتا محیط زیست شده است. این نانومواد با اهداف مختلفی تولید، ارایه و استفاده می‌شوند که نتیجه‌ی آن، آزادسازی میزان زیادی از این مواد در اکوسیستم‌های زیستی است (۴ و ۱۲).

نانومواد با دامنه اندازه ۱۰۰-۱ نانومتر دارای بیشترین سطح مؤثر جهت فعالیت و تسهیل ویژگی‌های جذبی کودها و حشره‌کش‌ها هستند (۱۷). نانوذرات حاوی تیتانیوم، روی، آهن، آلومینیوم و نقره می‌توانند جهت افزایش فراهم‌سازی عناصر در ریشه و شاخساره گیاهان استفاده شوند (۱۵).

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم[۷] دارای خاصیت فتوکاتالیستی[۸]، فعالیت اکسایش و کاهش و بنابراین تولیدکننده و غیرفعال کننده رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن در سطح خود می‌باشد (۱۴). خاصیت فتوکاتالیستی نانوذره TiO_2 ارتباط نزدیکی با سیستم فتوسنتزی اسفناج دارد. این مواد نه تنها باعث بهبود جذب نوری، تبدیل انرژی نوری به انرژی الکتریکی و انرژی شیمیایی می‌شوند بلکه باعث افزایش

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی و دانشیاران گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: malekzadeh-s@um.ac.ir
۳- دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
DOI: 10.22067/jhorts4.v32i3.67146

5- Photocatalyst

۶- اتیلن دی آمین ترا استیک اسید

7- TiO_2
8- Photocatalysis

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم روبیسکو در اسفناج شده است. مطالعات صورت گرفته توسط گائو و همکاران (۱) افزایش فعالیت روبیسکو تحت تأثیر تیمارهای این نانوذرات را نشان دادند. افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو کربوکسیلاز و افزایش میزان فتوسنتز باعث بهبود رشد در اسفناج می‌شود (۱). با توجه به مطالعات سگر و همکاران (۱۶)، هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری در غلظت‌های کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دو گونه از نانوذره TiO_2 برروی تعرق، رشد و کارایی درختان بید مشاهده نشده است. اثرات سمی نانوذرات TiO_2 با اندازه ۱۰۰ نانومتر در دو گیاه پیاز (*Allium cepa*) و توتون (*Nicotiana tabacum*) گزارش شده و حاکی از آن است که نانوذرات TiO_2 موجب افزایش احتمال آسیب به DNA، بازدارندگی از رشد و پراکسیداسیون لیپیدی در ریشه گیاه پیاز در غلظت ۴ میلی‌مولار و آسیب به DNA در برگ توتون در غلظت ۲ میلی‌مولار شده است (۲). علاوه براین، کلانیک و همکاران (۷) گزارش کردند که نانوذرات TiO_2 با اندازه ۱۵ نانومتر تأثیری برروی اندازه‌های ماکروسکوپی مانند تعداد ریشه در هر پیاز، میانگین طول ریشه‌ها و میزان کل سیستم ریشه‌ای در هر پیاز نداشته و اندازه‌های میکروسکوپی مانند فازهای متوتیک، انحراف کروموزومی در پیاز در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشده، اما اثراتی در شاخص میتوزی در نوک ریشه داشته است (۷).

تحقیقات انجام شده روی اثرات نانوذره TiO_2 در اسفناج نشان داد که نانوذرات TiO_2 موجب افزایش فتوسنتز، بهبود رشد، قدرت جوانه‌زنی زیاد و سنتز بیشتر کلروفیل شدند. لی و همکاران (۱۰) دریافتند که نانوذرات TiO_2 موجب افزایش رشد و فتوسنتز در گیاه اسفناج، افزایش جذب و تبدیل انرژی نورانی خورشید به الکتریکی و سپس انرژی فعال شیمیایی می‌شود. بررسی‌ها نشان داده که نانوذرات TiO_2 به طور قابل ملاحظه‌ای می‌توانند نه‌تنها موجب بهبود چرخه انتقال الکترون، فعالیت احیای نوری فتوسیستم II، تبدیل O_2 و فعالیت فتوفسفوریلاسیون در کلروفیل تحت نور مرئی می‌شود، بلکه توسط انرژی حاصل از الکترون نانوذرات TiO_2 وارد شده در کلروفیل، تحت نور فرابنفش و انتقال آن به زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، احیای NADP به NADPH و فسفوریلاسیون نوری، موجب برانگیخته شدن انرژی الکترون به ATP می‌شود (19). EDTA از جمله کلات کننده‌های یون‌های فلزی بوده و به گروهی از ترکیبات مصنوعی تعلق دارد که به عنوان یک پلی‌آمینوکربوکسیلیک‌اسید دارای یون‌هایی با بارمنفی زیاد بوده و به عنوان یک آنیون عمل کرده و می‌تواند با انواع کاتیون‌ها تشکیل پیوند دهد (۱۱). برقراری پیوند بین یون‌های فلزی با این مواد جهت استفاده گیاهان برای رشد در محیط خاکی یا آبی و جهت سهولت پایداری و حرکت آن‌ها در راستای سلامت گیاه مورد توجه است (۱۱).

با توجه به اثرات مفید این نانوذره، در این تحقیق تأثیر سه سطح نانوذرات TiO_2 و دو سطح EDTA بر خصوصیات رشدی و ترکیبات شیمیایی و درصد پروتئین گیاه اسفناج به صورت تیمار خاکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمارهای نانوذرات TiO_2 [1] در سه سطح (صفر= T_1، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر= T_2، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر= T_3) و دو سطح EDTA (صفر= E_1 و ۱۳۰ میلی‌مولار=E_2) بودند که در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد درآبان ماه سال ۱۳۹۲ انجام شد. بذور اسفناج در گلدان‌هایی با حجم ۴ کیلوگرم خاک کشت شدند. شرایط دمائی ۱۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد در طول دوره کشت برای کلیه تیمارها به صورت یکنواخت فراهم شد. قبل از کاشت، نمونه‌برداری خاک از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی انجام و پس از ارسال به آزمایشگاه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱)، که حاکی از مناسب بودن عناصر خاک بوده است. کلیه گلدان‌ها قبل از کاشت با آب مقطر به حالت ظرفیت زراعی رسانده شد (روش وزنی). در روز بعد بذور اسفناج[2] پس از ۲۴ ساعت خیساندن در آب جهت تسهیل در امر جوانه‌زنی، در سطح خاک قرار داده و سپس با ماسه بادی پوشش داده شدند. کلیه تیمارها در آب مقطر تهیه شدند و سپس جهت همگن کردن آن‌ها، محلول‌های آزمایشی در آزمایشگاه گروه صنایع غذایی مورد التراسونیک [3] قرار گرفتند و بلافاصله محلول‌پاشی گیاهچه‌ها در مرحله شش برگی (۲۴ روز پس از کشت بذور) انجام شد. یک هفته پس از محلول‌پاشی، نمونه‌های گیاهی جهت بررسی اجزای عملکرد و تعیین غلظت‌های عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم و درصد پروتئین کل در مرحله قبل از فاز زایشی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های گیاهی از قسمت طوقه گیاه جدا شده و در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و پس از آسیاب کردن به روش هضم خشک برای تعیین عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم گیاه استفاده شدند.

صفات بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری درصد نیتروژن از ماکروکجلدال مدل PDV-500 استفاده شد (۳). پتاسیم در نمونه‌های گیاهی، با هضم خشک

۱- شرکت sigma-Aldrich، خلوص ۹۹/۵ درصد، اندازه ذرات ۲۰ نانومتر

۲- رقم *VIROFLAY*

3- Ultrasonic

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها در ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد انجام و پس از هضم خاکستر حاصل در اسید فلورئیک ۲ نرمال، توسط دستگاه فلیم‌فتومتر مدل 310c digitale قرائت شد (۱۸). جهت اندازه‌گیری فسفر، خاکستر نمونه‌ها از روش اسیدآسکوربیک و قرائت با اسپکتروفتومتر مدل ۲۱۰۰ با طول موج ۶۶۰ نانومتر استفاده شد و درصد فسفر موجود در نمونه گیاهی بدست آمد (۱۸).

صفات زراعی

اندام‌هوایی گیاه از ناحیه طوقه ۲۳ روز پس از کاشت گیاه برداشت شده و جهت اندازه‌گیری سطح برگ، وزن‌تر گیاه و طول ساقه به آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی گروه زراعت دانشگاه فردوسی انتقال یافت. سطح برگ با استفاده از دستگاه سنجش سطح برگ مدل LI-3100 اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌های هوایی در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شده و با ترازوی دیجیتالی ۰/۰۰۱ گرم وزن شدند.

داده‌های این آزمایش توسط نرم‌افزار JMP8 مورد واکاوی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیائی خاک مورد استفاده

Table 1- Chemical properties of the used soil

pH	هدایت الکتریکی EC (d.s/m)	کربن آلی O.C (%)	درصد آهک TNV (%)	K (ppm)	P (ppm)	N (%)
6.5	0.58	2.1	0.35	263.1	16.66	0.18

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از تأثیر تیمارهای آزمایشی بر غلظت نیتروژن گیاه و درصد پروتئین نشان داد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار درصد نیتروژن (۱۳/۵ درصد) و درصد پروتئین (۹/۴۸ درصد) گیاه شده است (جدول ۲). تحقیق صورت گرفته توسط ژنگ و همکاران (۱۹) ثابت کرد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌توانند محتوای پروتئین LHCII غشای تیلاکوئید اسفناج را افزایش دهند. بنابراین نور بیشتری را به دام انداخته و در نتیجه میزان فتوسنتز اسفناج را افزایش دهند. با توجه به ارتباط تنگاتنگ بین اسیمیلاسیون دی‌اکسید کربن و اسمیلاسیون نیترات در گیاه، احتمالا تأثیر بر مسیرهای فتوسنتزی می‌تواند بر میزان فعالیت و بیان ژن نیترات‌ردوکتاز به عنوان اولین آنزیم این مسیر تاثیرگذار باشد و در نتیجه محتوای نیتروژن و درصد پروتئین گیاه افزایش پیدا کند. اما در سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کاهش درصد نیتروژن و پروتئین گیاه بترتیب معادل ۲۱ و ۱۹/۵۷ درصد ، نسبت به شاهد (تیمار فاقد نانوذره و EDTA) معنی‌دار بود. مطالعات لاوار و همکاران (۹) بر روی تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم‌های کاتالیکی و همچنین جوانه‌زنی بذر گیاه پیاز (*Allium cepa*) نشان دهنده کاهش جوانه‌زنی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز شد که احتمالا به علت انباشتگی نانوذرات و عدم واکنش‌دهی مناسب آن یا افزایش میزان هیدروژن پراکسید[1] و بازداری از فعالیت آنزیم‌های مورد نظر بوده است. در بررسی‌های ما نیز این کاهش در غلظت نیتروژن و درصد پروتئین با افزایش غلظت نانوذره مشاهده شد. در رابطه با فسفر گیاه، در هر دو سطح نانوذرات تیتانیوم (۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به سطح صفر آن، کاهش در فسفر گیاه (به ترتیب ۱۳/۶۱ و ۱۷/۷ درصد) مشاهده شده که این کاهش در سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به‌مراتب بیشتر بود (جدول ۲). غلظت پتاسیم گیاه در سطح ۰/۰۵میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ۶/۶۳ درصد افزایش داشت، اما در سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر این تیمار غلظت فسفر گیاه نسبت به شاهد ۱۲ درصد کاهش نشان داد (جدول ۲). در رابطه با اثر ساده تیمار EDTA، کاربرد ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA، موجب افزایش معنی‌دار درصد نیتروژن گیاه (۵/۹۵ درصد) و همچنین درصد پروتئین (۱/۹٪) گیاه شد، در حالی‌که غلظت عناصر فسفر و پتاسیم گیاه اسفناج نسبت به شاهد (سطح صفر آن) کاهش معنی‌داری (به ترتیب ۸/۷ درصد و ۵/۶۵ درصد) نشان دادند.

اثرات متقابل نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA بر غلظت عناصر نیتروژن، فسفر و درصد پروتئین گیاه اسفناج نشان داد که سطح صفر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم همراه سطح ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA کاهش معنی‌دار در نیتروژن (۲۴/۵۵ درصد)، پروتئین (۲۷ درصد)، فسفر (۰/۸۴ درصد) و پتاسیم (۲۳/۷۲ درصد) گیاه نسبت به سطح صفر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم همراه با سطح صفر EDTA (گیاه شاهد) نشان دادند (جدول ۳).

1- H_2O_2

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- اثر ساده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA بر غلظت برخی عناصر پرمصرف و درصد پروتئین گیاه اسفناج

Table 2- Simple effect of titanium dioxide nanoparticles and EDTA on concentration of some chemical elements and protein content in spinach

تیمار Treatment	پتاسیم Potassium (%)	فسفر Phosphorus (%)	پروتئین Protein (%)	نیتروژن Nitrogen (%)
T_1	1.3703 b	0.1332 a	2.1140 a	0.3330 b
T_2	1.4612 a	0.1142 b	2.3430 a	0.3783 a
T_3	1.2052 c	0.1081 c	1.7210 b	0.2633 c
E_1	1.3847 a	0.1238 a	2.0489 a	0.3156 a
E_2	1.3064 b	0.1130 b	2.0873 a	0.3344 a

در هر ستون (تیمارهای T_1-T_3 و E_1-E_2 بصورت جداگانه) میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD)، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

صفر= T_1، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_2، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_3و صفر= E_1 و ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA= E_2

Numbers followed by the same letter in each colume (T3-T1 and E2-E1 treatments separately) are not significantly different ($p<0.05$) based on LSD's test (T_1=0, T_2=0.05, T_3=0.1 mg/l TiO2 and E_1=0, E_2=130 mM EDTA)

در حالی‌که سطح ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم همراه با سطح ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA افزایش معنی‌دار نیتروژن (۱۴ درصد)، پروتئین (۶/۸ درصد) و پتاسیم (۱۵ درصد) را نسبت به غلظت‌های آن در گیاه شاهد و ۱۹/۹ کاهش فسفر را نشان دادند (جدول ۳). در سطح ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم همراه با سطح ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA، ۲۵/۴۴ درصد نیتروژن، ۲۶/۷۵ درصد پروتئین، ۲۷/۸ درصد فسفر و ۳۹/۲۲ درصد پتاسیم گیاه نسبت به سطح صفر (شاهد) کاهش معنی‌داری مشاهده شد.

با مقایسه جدول ترکیبات شیمیایی گیاه اسفناج یک هفته پس از محلول‌پاشی، افزایش درصد نیتروژن و پروتئین تنها در تیمار T_2E_2 مشاهده شد. گزارش شده است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم دارای سطح بالای انرژی شکاف- باند و در نتیجه برانگیختگی توسط نور فرابنفش و امکان بازیابی الکترون- حفره می‌باشند (۱۳). جهت بهبود فعالیت فتوکاتالیکی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم آن را با فلزات و نافلزات دوپه می‌کنند. EDTA به عنوان یک منبع نیتروژن برای دوپه کردن با نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بکار می‌رود. مطالعات کیم و چو (۶) نشان دهنده افزایش جذب نور مرئی تا ۵۵۰ نانومتر با قرارگیری EDTA برروی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بود. احتمالا EDTA با بهبود خواص فتوکاتالیکی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر، با بهبود خواص فتوکاتالیکی نانوذره سبب افزایش جذب نور مرئی و در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز و متعاقب آن افزایش اسیمیلاسیون نیتروژن و افزایش درصد پروتئین در گیاه در تیمار T_2E_2 شده است. بررسی‌های صورت گرفته بر روی داده‌های بیوشیمیایی حاکی از این است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر تأثیر مثبتی بر غلظت‌های نیتروژن، پتاسیم و همچنین پروتئین اسفناج داشته است. کمترین غلظت‌های نیتروژن، فسفر، پتاسیم و پروتئین گیاه در اثر ساده سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مشاهده شد که به ترتیب کاهش معنی‌داری معادل ۲۱، ۷/۱۷، ۱۲ و ۱۹/۵۷ درصد نسبت به گیاه شاهد داشتند که مشابه نتایج گزارش شده توسط مطالعه اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی سه ژن (*TAT,RAS,PAL*) درگیر در مسیر بیوسنتزی رزمارنیک اسید در گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) در پنج غلظت (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) توسط کمالی و همکاران (۵) است. سطح ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بیشترین غلظت‌های نیتروژن، پتاسیم گیاه و پروتئین را موجب شده که به ترتیب افزایش معنی‌داری معادل ۱۳/۵، ۶/۶۳ و ۹/۴۸ درصد نسبت به تیمار شاهد داشتند که مشابه نتایج گزارش شده توسط زنگ و همکاران (۱۹) است. در رابطه با اثر متقابل تیمارها با EDTA (جدول ۳) کمترین میزان نیتروژن و پروتئین مربوط به تیمارهای T_2E_2، T_3E_1، T_3E_2 و T_1E_2 بودند. بیشترین کاهش میزان فسفر و پتاسیم در رابطه با تیمار T_3E_2 مشاهده شد. T_2E_2 تأثیر افزایشی بر میزان پتاسیم اسفناج نسبت به گیاه شاهد و سایر تیمارها داشت.

نتایج جدول ۴ نشان داد که تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار وزن‌خشک و تر اندام‌هوایی گیاه اسفناج و همچنین سطح‌برگ نسبت به شاهد (سطح صفر آن) شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- اثر متقابل تیمارهای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم × EDTA بر برخی عناصر پرمصرف و درصد پروتئین گیاه اسفناج

Table 3- Interaction effect of Titanium Dioxide nanoparticles ×EDTA treatments on concentration of some chemical elements and protein content in spinach

TiO_2 (mg/l)	EDTA (mM)	پتاسیم Potassium (%)	فسفر Phosphorus (%)	پروتئین Protein (%)	نیتروژن Nitrogen (%)
T_1	E_1	1.5550 [b]	0.1427 [a]	2.4750 [ab]	0.3800 [ab]
	E_2	1.1860 [d]	0.1217 [b]	1.8060 [c]	0.2867[cd]
T_2	E_1	1.1340 [e]	0.1140 [c]	2.0417[bc]	0.3233[bc]
	E_2	1.7890 [a]	0.1143 [ab]	2.6433 [a]	0.4333 [a]
T_3	E_1	1.4650 [c]	0.1147[bc]	1.6300 [c]	0.2433 [d]
	E_2	0.9450 [f]	0.1030 [d]	1.8127 [c]	0.2833 [cd]

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD)، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

صفر= T_1، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_2، ۰/۱ میلی گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_3و صفر= E_1 و ۱۳۰ میلی مولار EDTA= E_2

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$) based on LSD's test (T_1=0, T_2=0.05, T_3=0.1 mg/l TiO2 and E_1=0, E_2=130 mM EDTA)

در حالی‌که ارتفاع ساقه در هر دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم افزایش معنی‌داری نشان داد. حضور EDTA با سطح ۱۳۰ میلی‌مولار تأثیر معنی‌داری را بر وزن‌تر و خشک اندام هوایی نداشت. سطح برگ نیز تفاوت معنی‌داری در حضور EDTA نشان نداد. اما ارتفاع ساقه اسفناج در سطح ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA افزایش معنی‌داری نشان داد.

جدول ٤-اثر ساده تیمارهای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA بر برخی از صفات رشدی اندام هوایی اسفناج

Table 4- Simple effect of titanium dioxide nanoparticles and EDTA on some of the growth parameters in spinach

تیمار Treatment	وزن‌تر اندام هوایی (mg/plant) Plant fresh weight	وزن‌خشک اندام هوایی (mg/plant) Plant dry weight	سطح برگ LAI (cm^3)	طول ساقه Shoot length (mm)
T_1	2.62 [b]	0.24 [b]	53.08 [b]	8.25 [a]
T_2	4.25 [a]	0.42 [a]	83.91 [a]	9.33 [a]
T_3	2.17 [b]	0.18 [b]	38.82 [b]	9.41 [a]
E_1	2.86 [a]	0.26 [a]	57.74 [a]	7.88 [a]
E_2	3.16 [a]	0.3 [a]	59.47 [a]	10.11 [a]

در هر ستون (تیمارهای T_1–T_3 و E_1–E_2 بصورت جداگانه) میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD)، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

صفر= T_1، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_2، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_3و صفر= E_1 و ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA= E_2

Numbers followed by the same letter in each column (T3-T1 and E2-E1 treatments separately) are not significantly different ($p<0.05$) based on LSD's test (T_1=0, T_2=0.05, T_3=0.1 mg/l TiO2 and E_1=0, E_2=130 mM EDTA)

نتایج بدست آمده از جدول ۵ در رابطه با اثر متقابل تیمارهای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA بر برخی از پارامترهای رشدی اندام هوایی نشان داد که تیمار T_2E_1 افزایش معنی‌داری بر وزن تر و خشک اندام هوایی اسفناج و همچنین سطح برگ این گیاه داشت. این تأثیر به صورت افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی نسبت به شاهد آن‌ها و همچنین افزایش چشمگیری در سطح برگ گیاه بود. در کلیه تیمارها بجز T_3E_2 سطح برگ نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت. طول ساقه در تیمارهای T_2E_2 و T_3E_2 به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (جدول ۵). محققان نشان دادند که تشکیل کمپلکس بین TiO_2 و الکترون دهنده‌های رایج (مانند متانول، اسید فرمیک، اسید استیک، تریتانول آمین و EDTA) که توانایی جذب نور مرئی را دارند، می‌توانند با ایجاد کمپلکس لیگاند– فلز انتقال شارژ را از خلال این مکانیسم انجام دهند (۶).

تیمارهای T_1E_2، T_2E_2 و T_2E_1 بیشترین افزایش وزن تر و خشک و سطح برگ را موجب شدند. در بررسی اثرات ساده غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تأثیرگذاری را بر این پارامترها داشته است. لی و همکاران (۱۰) و کائو و همکاران (۱) افزایش و بهبود رشد اسفناج را در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز گیاه تحت تأثیر تیمارهای حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم گزارش کردند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- اثر متقابل نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم × EDTA بر برخی از صفات رشدی اندام هوایی اسفناج

Table 5- The interaction of titanium dioxide ×EDTA nanoparticles on some growth parameters of spinach

TiO_2 (mg/L)	EDTA (mM)	وزن‌تر اندام هوایی Plant fresh weight (mg/plant)	وزن‌خشک اندام هوایی Plant dry weight (mg/plant)	سطح برگ LAI (cm^3)	طول ساقه Shoot length (mm)
T_1	E_1	2.380 [a]	0.0293 [a]	70.340 [ab]	6.333 [b]
	E_2	4.030 [a]	0.0463 [a]	96.370 [a]	9.250 [a]
T_2	E_1	2.660 [a]	0.0376 [a]	54.570 [b]	8.750 [a]
	E_2	1.730 [a]	0.0245 [a]	67.800 [ab]	4.750 [b]
T_3	E_1	3.670 [a]	0.0251 [a]	47.410 [b]	5.533 [b]
	E_2	2.610 [a]	0.0203 [a]	64.490 [ab]	8.250 [a]

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD)، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

صفر= T_1، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_2، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات تیتانیوم= T_3و صفر= E_1 و ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA =E_2

Numbers followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$) based on LSD's test (T_1=0, T_2=0.05, T_3=0.1 mg/l TiO2 and E_1=0, E_2=130 mM EDTA)

با توجه به محلول‌پاشی سطوح مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA در مرحله ۶ برگی گیاه اسفناج و برداشت نمونه‌های گیاهی ۷ روز بعد از محلول‌پاشی و نتایج بدست آمده در رابطه با خصوصیات رشدی اندازه‌گیری شده می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که در خصوص اثرات ساده نانوذرات تیتانیوم در سطح ۰/۰۵میلی‌گرم در لیتر اثرات افزایشی و مثبتی بر وزن تر و وزن‌خشک اندام هوایی و سطح برگ گیاه داشتند، اما افزایش سطح نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اثرات منفی خود را بر پارامترهای فوق‌الذکر نشان داد. بنابراین درخصوص محلول‌پاشی نانوذرات تیتانیوم برای گیاهان و سبزیجات برگی مانند اسفناج توصیه می‌شود که حداکثر غلظت کاربردی بیش از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نباشد که می‌تواند دارای اثرات سمی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم برروی گیاه باشد. اثر ساده EDTA بصورت محلول‌پاشی نشان داد که محلول‌پاشی ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA اگر چه تأثیر مثبتی بر وزن تر و خشک اندام هوایی و سطح برگ گیاه داشت اما معنی‌دار نشد که احتمالا بدلیل کوتاهی در فاصله زمانی برداشت گیاه باشد، همانطوری که گزارش شده EDTA نقش کمپلکس‌کنندگی داشته و از این طریق می‌تواند فراهمی و جذب برخی از عناصر غذایی را افزایش دهد که در این سطح مطالعه ۱۳۰ میلی‌مولار EDTA موجب افزایش درصد نیتروژن گیاه گردید و از آنجا که فراهمی نیتروژن در خاک می‌تواند دارای اثرات متقابل منفی با فسفر و پتاسیم را داشته باشد، بنابراین غلظت‌های فسفر و پتاسیم گیاه کاهش نشان دادند. در خصوص اثرات متقابل نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA لازم به ذکر است که افزایش EDTA در سطح کمترین نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (سطح صفر) موجب افزایش وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ گیاه شده، اما در سطوح بیشتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) افزایش EDTA موجب کاهش پارامترهای گیاهی شده که این امر می‌تواند بیانگر افزایش فراهمی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در نتیجه ایجاد کمپلکس با EDTA باشد که اثرات سوء خود را بر روی گیاه نشان داده است. اثرات متقابل بین نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و EDTA درخصوص درصد نیتروژن، درصد پروتئین و درصد پتاسیم نشان داد که بیشترین غلظت‌های یاد شده در سطوح T_2E_2 در مقایسه با T_1E_2 و T_3E_2 داشتند که بیانگر تأثیر مثبت EDTA بر کاهش فعالیت سوء نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌باشد.

منابع

1- Gao F ., Liu C., Qu C., Zheng L., Yang F., Su M., and Hong F. 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO2 treatment related to the changes of Rubisco activase? .Biometals, 21(2): 211-7.

2- Ghosh M., Bandyopadhyay M., and Mukherjee A. 2010. Genotoxicity of titanium dioxide TiO_2 nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. Chemosphere, 81: 1253-1262.

3- Jones J. B. 2001. Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis. CRC Press LLC, U. S.

4- Hood E. 2004. Nanotechnology, Looking as we leap. Environ. Health Perspect, 112:740 749.

5- Kamalizadeh M., Bihamta M., Peyghambari S A., and Hadian J. 2014. Expression of genes involved in Rosmarinic Acid biosynthesis pathway in dragonhead affected by Nanoparticles. Journal of G3M., 12(1): 3428-

www.SID.ir

Archive of SID

3437.
6- Kime G., and Wonyong Ch. 2010. Charge- transfer surface complex of EDTA-TiO_2 and its effect on photocatalysis under visible light. Environmental, 100: 77-83.
7- Klanc˘nik K., Drobne D., Valant J., Valant J., and Dolenc Koce N. 2011. Use of a modified Allium test withnanoTiO_2. Slovenia Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 85–92.
8- Kuamri M., Mukherjee A., and Chandrasekaran N. 2012. Effect of silver nanoparticle (SNPs) on protein and DNA content to tomato seed (*L. esculentum*), Cucumber (*Cucumis sativus*) and Maize (Zea mays). International Journal of Human Genetics Medical Biotechnology and Microbioligical Studies, 1:1
9- Laware S.L., and Raskar Sh. 2014. Effect of titanium dioxide nanoparticles on hydrolytic and antioxidant enzymes during seed germination in onion. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(7): 749-760.
10- Li W., Wang Y., Okamoto M., Crawford N.M., Siddiqi M.Y., and Glas A.D.M. 2007. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. Plant Physiolog, 143: 425–433.
11- Mansilla H. D., Bravo C., Ferreyra R., Litter M.I., Jardim W.F., Lizama C., Freer J., and Fern´andez J. 2006. Photocatalytic EDTA degradation on suspended and immobilized TiO2. Journal of Photochemistry and Photobiology, 118, 188–194.
12- Mukherjee M., and Mahapatra A. 2009. Effect of coinage metal nanoparticles and zwitterionic surfactant on reduction of [Co (NH3)5Cl] $(NO_3)_2$ by iron (III). Colloid Surface, 350: 1-7.
13- Nassoko D., Li Y., Wang H., Li J., Li Y., and Yu Y. 2012. Nitrogen-doped TiO_2 nanoparticles by using EDTA as nitrogen source and soft template: Simple preparation, mesoporous structure, and photocatalytic activity under visible light. Journal of Alloys and Compounds, 540: 228–235.
14- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.-J., Quigg A., Santschi P.H., and Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology, 17: 372-386.
15- Reynolds, GH. 2002. Forward to the future nanotechnology and the regulatory policy. Pacifice Research Institute, 1–23.
16- Sager T.M., Kommineni C., and Castranova V. 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. Part Fibre Toxicol, 5: 17
17- Sheykhbaglou R., Sedghi M., Tajbakhsh Shishvan M., and Seyed Sharifi R. 2010. Effect of nano iron particles on agronomic traits of soybean. Not Scientist Biology, 2(2): 112–113.
18- Waling I., Vark W.V., Houba V. J. G., and Van der Lee J. J. 1989. Soil and Plant Analysis, a Series of Syllabi, Part 7, Plant Analysis Procedures, Wageningen Agriculture University. The Netherlands.
19- Zheng L., Mingyu S., Xiao W., Chao L., Chunxiang Q., Liang C., Hao H., Xiaoqing L., and Fashui H. 2007. Effects of nano-anatase on spectral characteristics and distribution of LHCII on the thylakoid membranes of Spinach. Biological Trace Element Research Journal, 120: 273-283.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.3, Fall 2018, P. 419-427
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۴۲۷-۴۱۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Effects of Titanium Dioxide (TiO_2) and EDTA on Growth and Biochemical Properties of Spinach (*Spinacia oleracea*)

S. Nejatie zadeh[1]- S. Malekzadeh Shafarodi[*2]- A. Astaraei[3]- N. Moshtaghi[4]

Received: 02-09-2017
Accepted: 07-07-2018

Introduction: An emerging field of nanotechnology in recent years is the use of nanoparticles and nanomaterials in agricultural systems which is due to their excellent mechanical, electrical, optical, surface properties, crop protection and nano-fertilizers. Titanium dioxide (TiO_2) is a class of nanoparticles which widely used in the food industry, cosmetics, papers, pharmaceuticals, plastics and industrial raw materials. The widespread industrial application of TiO_2 is due to its white pigment, ultraviolet blocking property, and chemical features commonly used to alleviate pollutants concentration in water, soil and air. Owing to its increasing use in the industry, a large part of TiO_2 residues are released into the environment, and currently, TiO_2 nanoparticles are being considered an emerging environmental contaminant. However, there have been a number of studies reporting beneficial effects of TiO_2 on growth and physiological traits of crops. It has been postulated that the TiO_2-induced improvement of crop growth is not merely related to the promotion of photosynthesis; other biochemical processes especially nitrogen metabolism are also involved in this event. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) is a widely used as a chelating agent, i.e., the chemical is able to sequester metal ions such as Ca^{2+} and Fe^{3+}. EDTA is used as nitrogen source for doping of TiO_2 nanoparticles which improves TiO_2 photocatalytic features. The present study was conducted to investigate the effects of TiO_2 nanoparticles and EDTA on growth indices and biochemical parameters in spinach (*Spinacia oleracea*). For detailed evaluation of treatment effects, different concentrations of TiO_2 nanoparticles were sprayed on spinach leaves and the samples were collected in a time course.

Materials and Methods: A factorial experiment was carried out in the form of completely randomized design (CRD) with three replications. Soil samples were taken before cultivation of spinach (*S. oleracea*) seeds (Var VIROFLAY) and analyzed for nutrients' concentration. Treatments include different levels of TiO_2 (T_1=0, T_2=0.05mg/l and T_3=0.1mg/l) and two concentrations of EDTA (E_1=0 and E_2=130mg/l) sprayed on spinach plants in research greenhouse of agriculture faculty, Ferdowsi University of Mashhad. Aqueous solutions of nanoparticles were treated by ultrasound for 10 min to enhance homogeneity. The solutions were sprayed on the plant at six- leaves stage. The plant samples were taken before reproductive phase for measurement of biochemical parameters. Nitrogen content of plant samples was measured by PDV 500 Macro- Kjeldahl device; Potassium content was determined by 310c flame photometer; phosphorus concentration in plant samples was measured by spectrophotometer model 2100. Chlorophyll and carotenoid contents were measured by the method proposed by Lichtenthaler (1978). For analysis of growth parameters, plant samples were taken a week after TiO_2 treatments and leaf area, shoot fresh/dry weight, stem length, internode length, root area, root fresh/dry weight and total root diameter were measured.

Results and Discussion: Application of 0.05mg/l of TiO_2 nanoparticles without EDTA resulted in 13.5% and 9.48% increase in nitrogen and protein; respectively, however by increasing nanoparticles to 0.1mg/l, nitrogen and protein content in the treated plants were respectively reduced to 21% and 19.57% of those of control group ($p<0.01$). Phosphorus content of the treated plants was decreased in both concentrations of TiO_2 with the higher reduction in 0.1mg/l of TiO_2. Potassium content showed a 6.63% increase by applying 0.05mg/l of TiO_2; however, by increasing TiO_2 to 0.1mg/l, potassium content was decreased to 12%. EDTA increased nitrogen and protein content by 5.95% and 1.9%, respectively; however phosphorus and potassium contents were reduced by 8.7% and 5.65%, respectively. Interaction of 0.05mg/l TiO_2 and 130mg/l EDTA resulted in increasing nitrogen, protein and potassium content (14%, 6.8% and 15%; respectively) and reduction of phosphorus (19.9%). Application of 0.1mg/l TiO_2 and 130mg/l EDTA decreased significantly nitrogen, protein, potassium and

1, 2 and 4- Former M.Sc. Student and Associate Professors, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, Respectively
(*- Corresponding Author Email: malekzadeh-s@um.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

www.SID.ir

Archive of SID

phosphorus to 25.44%, 26.75%, 39.22% and 27.8%; respectively. Interaction of TiO_2 and EDTA increased dry/fresh weight, diameter and total area of spinach plants. Our results are in agreement with those reported by others. Spinach shoot dry and fresh weights were enhanced by application of 0.05mg/l TiO_2; while stem length was increased at both 0.05mg/l and 0.1mg/l TiO_2 significantly. Interaction of TiO_2 and EDTA was also followed by increasing in growth parameters. This finding is according with the results reported by other authors. These contradictory results suggest that effects of TiO_2 on plant growth and physiology don't follow a clear-cut trend and other factors may play important roles in this story.

Conclusion: In this study, we investigated the influence of TiO_2 nanoparticles on growth and biochemical properties in spinach. In general, the results indicated that application of 0.05mg/l of TiO_2 has a significant promoting effect on the studied traits. Increasing TiO2 concentration to 0.1mg/l was followed by negative effects that may be attributed to poisonous effect of extra-concentration of this nanoparticle on DNA replication, enzymatic activity and cell proliferation. Coincidence of NR activity and growth changes supports the crucial role of nitrogen metabolism in mediating TiO2 effects on spinach growth. More notably, application of EDTA enhanced positive impacts of the nanoparticles. This synergy may be due to the fact that EDTA acts as an N-source and improves photocatalytic properties of TiO2 nanoparticles.

Keywords: Leaf area, Nanomaterials, Nitrogen, Protein, Titanium

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir