

# کاربرد نانوذرات $TiO_2$ صنعتی و بیولوژیک و باکتری حل کننده فسفات بر تولید دیوزژنین در گیاه شبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

زهرا کرمانی مجاور<sup>۱</sup>، علی گنجعلی<sup>۲\*</sup>، منصور مشرقی<sup>۳</sup>

۱- دانشجو، کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
۲- عضو هیات علمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
\* نویسنده مسئول: E-mail: ganjeali@um.ac.ir

## چکیده

پاسخ گیاهان به نانوذرات متفاوت است، اما توجه کمتری به شبلیله شده است. این آزمایش با هدف بررسی تأثیر  $TiO_2$ NPs سنتز شده و صنعتی، بر تولید دیوزژنین در شبلیله، به صورت کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. نیمی از بذور شبلیله به سودوموناس رشد یافته آلوده شده و نیمی دیگر مستقیماً کشت شد. نمک تیتانیوم به صورت محلول وارد خاک شده و غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره از طریق اسپری در اختیار گیاه قرار گرفت. گیاهان در مرحله گلدهی برداشت شدند. بررسی ها تایید کرد که کاربرد نانوذره با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین تأثیر را داشت. اما کاربرد توام باکتری با غلظت ۱۵۰ و یا ۵۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره، باعث کاهش معنی دار ماده دیوزژنین شد ( $P \leq 0.05$ ).

## مقدمه

شبلیله گیاهی یک ساله متعلق به خانواده Fabaceae از راسته Fabales است. بررسی ها موید این است که میتوان از گیاه شبلیله هم به عنوان یک ماده غذایی و هم به عنوان یک منبع غنی از دیوزژنین در صنایع دارو سازی استفاده کرد (Fazli and Hardman, 1968). دیوزژنین، یک ساپونین استروئیدی متعلق به تری ترین ها و یک متابولیت با ارزش است که از بعضی از گیاهان از جمله *Smilax china*، *Dioscorea* spp. (مارچوبه ی چینی) و شبلیله جدا شده است. دی اکسید تیتانیوم به گیاه کمک میکند تا مواد مغذی بیشتری را در خود جای داده، متابولیت های بیشتری را سنتز کرده و به نوبه خود رشد آنها را افزایش دهد (Mishra et al., 2014; Yang et al., 2007). گونه های سودوموناس پوتیدا، ریزوباکتری های گرم منفی که میتوانند با طیف گسترده ای از گیاهان کلنی تشکیل دهند (Fernandez Pinar et al., 2012). ترکیبات بهینه میکروارگانسیم ها میتوانند به افزایش متابولیت های ثانوی گیاهان کمک کنند.

## مواد و روش ها

بذور شبلیله پس از ضد عفونی در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، نیمی به سودوموناس رشد یافته در فاز لگاریتمی آلوده شده و نیمی دیگر مستقیماً در گلدان های حاوی خاک استریل کشت شدند. مقدار ۴۰ میلی لیتر از نمک تیتانیوم ۱ میلی مولار برای ۱ کیلو گرم خاک، در ۴۵ روز پس از رشد، به صورت محلول به اطراف ریشه تزریق شد. غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر  $TiO_2$ NPs، از طریق اسپری به برگ ها به هنگام بعد از ظهر، در دو نوبت ۵۰ و ۵۷ روز پس از رشد، به صورت مستقیم در اختیار گیاه قرار گرفت. و سپس در ورود گیاه به مرحله گلدهی، برداشت صورت گرفت.

دیوزژنین مطابق روش (Baccou et al., 1977; Uematsu et al., 2000) با کمی تغییر تعیین شد. قسمت های هوایی گیاه خشک و سپس پودر شدند. ۳ میلی گرم ماده گیاهی پودر شده با ۲/۵ میلی لیتر n-hexan به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. نمونه ها کاملاً خشک شده و به ۳ میلی گرم پودر خشک شده ۳ میلی لیتر متانول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. آنگاه فیلتر شده و ۲۰۰ میکرو لیتر عصاره متانولی در ۲ میلی لیتر اتیل استات و سپس ۱ میلی لیتر از محلول ۰/۵ میلی لیتر ۴- متوکسی بنز آلدئید در ۹۹/۵ میلی لیتر اتیل استات، و ۱ میلی لیتر از محلول ۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ در ۵۰ میلی لیتر اتیل استات، کاملاً حل شد. عصاره متانولی مخلوط شده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۶۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس خنک شد و جذب نمونه ها در طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد و از اتیل استات به عنوان کنترل استفاده شد.

## نتایج و تحلیل

مطالعات تأیید کردند که نانوذرات با القای مسیرهای مختلف انتقال سیگنال سلولی میتوانند به عنوان عامل ایجاد کننده متابولیت ثانوی در گیاهان عمل کنند. برعکس، اثرات منفی و سمی  $TiO_2$ NPs نیز تأیید شده و وابسته به غلظت و زمان است. به عنوان مثال غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر  $TiO_2$ NPs باعث بهبود متابولیسم ثانوی در گیاه *S. officinalis* شد (Ghorbanpour, 2015). و افزایش غلظت بالاتر از ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر  $TiO_2$ NPs منجر به کاهش تدریجی روغن های اسانسی در گیاه نعنای شد (Ahmad et al., 2018). علاوه بر این، باکتری *E. coli* منجر به بیان ژن های *HMGR* و *CAS* شد (Shaikh et al., 2020). بنابراین ظاهراً بیوسنتز دیوزژنین، با واسطه مسیر *HMGR-CAS* فعال میشود. اما بررسی ها تایید کردند که غلظت های بالای نانوذرات تعادل سیستم های آنتی اکسیدانی درون سلولی باکتری را از بین برده و فعالیت سلولی آنرا به میزان قابل توجهی مهار میکند (Ouyang et al., 2020).

## نتیجه گیری

بررسی محتوی دیوزژنین در تیمارهای مختلف تأیید کرد که باکتری سودوموناس پوتیدا، تیمار بالک و همچنین  $TiO_2$ NPs باعث افزایش مقدار دیوزژنین شد. باکتری به تنهایی یا به همراه تیمار بالک، نانوذرات با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و تیمار بالک، هر یک به تنهایی باعث افزایش محتوی دیوزژنین در گیاه شدند. بیشترین تأثیر بر محتوی دیوزژنین گیاه را نانوذرات  $TiO_2$  با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر داشت. اما نانوذرات با غلظت ۵۰ یا ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر به همراه باکتری سودوموناس تأثیر معنی داری بر کاهش دیوزژنین داشتند.

## منابع

- Ahmad, B., Shabbir, A., Jaleel, H., Masroor, M., Khan, A., & Sadiq, Y. (2018). Efficacy of titanium dioxide nanoparticles in modulating photosynthesis, peltate glandular trichomes and essential oil production and quality in *Mentha piperita* L.. *Current Plant Biology*, 13, 6-1.
- Baccou, J.C., Lambert, F., & Sanvaire, Y. (1997). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. *Analyst*, 102, 458-466.
- Fazli, FRY., & Hardman, R. (1968). The spice, fenugreek, (*Trigonella foenum-graecum* L.): its commercial varieties of seed as a source of diosgenin. *Tropical Science*, 10, 66-78.
- Fernandez Pinar, R., Espinosa Urgel, M., Dubern, JF., Heeb, S., Ramos, JL., & Camara, M. (2012). Fatty acid-mediated signaling between two pseudomonas species. *Environmental Microbiology Reports*, 4, 417-423.
- Ghorbanpour, M. (2015). Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20, 249-256.
- Mishra, V., Mishra, R.K., Dikshit, A., & Pandey, A.C. (2014). Interactions of nanoparticles with plants: an emerging prospective in the agriculture industry, in: P. Ahmad, S. Rasool (Eds.). *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Biological Techniques*, 1, 159-180.
- Ouyang, K., Mortimer, M., Holden, P.A., Cai, P., Wu, Y., Gao, C., & Huang, Q. (2020). Towards a better understanding of *Pseudomonas putida* biofilm formation in the presence of ZnO nanoparticles (NPs): role of NP concentration. *Environment International*, 137, 105485.
- Shaikh, S., Shriram, V., Khare, T., & Kumar, V. (2020). Biotic elicitors enhance diosgenin production in *Helicteres isora* L. suspension cultures via up-regulation of *CAS* and *HMGR* genes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 593-604.
- Uematsu, Y., Hirata, K., & Saito, K. (2000). Spectrophotometric determination of saponin in *Yucca* extract used as food additive. *Journal of AOAC International*, 83, 1451-1454.
- Yang, F., Liu, C., Gao, F., Su, M., Wum, Z., Zheng, L., Hong, F., & Yang, P. (2007). The Improvement of Spinach growth by nano-anatase  $TiO_2$  treatment is related to nitrogen photo-reduction. *Biological Trace Element Research*, 119, 77-88.