

مطالعه رفتار میوزی و باروری دانه گردد در زیره سبز (*Cuminum cyminum*) تحت شرایط تنش خشکی و نانوذره دی اکسید تیتانیوم

Study of meiotic behavior and fertility of pollen seed in Cumin (*Cuminum cyminum*) under drought stress and titanium dioxide nanoparticles

سید محمد مهدی مرتضویان^{*}، سمیرا بکان^۱، سید احمد سادات نوری^۱، مریم نوروزی^۲

۱- بهتریت دانشیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- استادیار، گروه باگبانی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Mortazavian SMM^{*1}, Bakan S¹, Sadat Noori SA¹, Norouzi M²

1- Assistant Professor, Graduated MSc Student, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Science, College of Aburaihan University of Tehran, Tehran-Pakdasht, Iran

2- Assistant Professor, Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mortazavian@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۱/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* و متعلق به خانواده Apiaceae به دلیل خواص دارویی فراوانی که دارد، در طب سنتی از اهمیت بالایی برخوردار است. تنش خشکی می‌تواند سبب کاهش عملکرد دانه در زیره سبز به خصوص در کشت بهاره شود. در مطالعات گذشته نقش مثبت نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر عملکرد دانه زیره سبز نشان داده شده است. در این تحقیق برای اولین بار رفتار میوزی و نیز قدرت باروری دانه گرده این گیاه تحت شرایط تنش خشکی آخر فصل (مرحله زایشی) و اعمال نانوذره دی اکسید تیتانیوم برای بررسی بیشتر از دیدگاه ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی مراحل مختلف میوزی و تعیین ناهنجاری‌های میوزی، گل آذین نارس گیاه زیره که تحت تنش خشکی و سطوح مختلف نانوذره قرار گرفته بود، جمع آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. انواع ناهنجاری‌ها شامل چسبندگی، توهدای شدن کروموزوم‌ها، کروموزوم سازمان نیافته، پل آنافازی، کروموزوم تأخیردار، کروموزوم پیشو، تاخیر آنافازی، میکرونوکلنوس، سه‌قطبی، سین‌سایت و عدم تفرق صحیح کروموزومی در تمامی سطوح مورد بررسی قرار گرفت. قدرت باروری دانه گرده نیز با توجه به اندازه آن ارزیابی شد. دانه‌های گرده رنگ شده با اندازه طبیعی، به طور بالقوه بارور و طبیعی در نظر گرفته شد. بیشترین کاهش درصد باروری به میزان ۱۳/۳۳ درصد در شرایط غلظت ۰/۰۳ درصد نانوذره به همراه تنش خشکی و کمترین آن به میزان ۰/۰۶۹ درصد در نمونه تحت غلظت ۰/۰۱۵ درصد نانوذره به همراه تنش خشکی مشاهده شد. نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده اثر متقابل تنش خشکی و نانوذره بر صفات میوزی بوده و به طور کلی تاثیر مثبت نانوذره بر افزایش عملکرد بیشتر به صورت غیر مستقیم بوده و به طور مستقیم باروری دانه گردد را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

تقسیم کاهشی

تنش غیرزنده

گیاه دارویی

ناهنجاری کروموزومی

مقدمه

Obeidi et al. (2013) در بررسی مراحل مختلف تقسیم میوزی گیاه مشگک (*Ducrosia anethifolia*)، ناهنجاری‌های میوزی شامل چسبندگی کروموزومی، کروموزوم تأخیردار، مهاجرت زودهنگام کروموزوم‌ها، توده‌ی کروماتینی و میکرونوكلتوس را با فراوانی کم مشاهده کردند. با توجه به شکل‌گیری بی‌والانت طبیعی در بیشتر سلول‌های مطالعه شده و بالا بودن شاخص میوزی، رفتار میوزی گونه طبیعی و رنگ‌پذیری دانه گرده ۹۷ درصد ارزیابی شد (Obeidi et al. 2013). در مطالعه‌ای که بر روی ۱۳ جمعیت رازیانه صورت گرفت، ضمن اعلام تعداد کروموزوم پایه ($x=11$) در تمامی جمعیت‌ها، حالت‌های بی‌والانت و کوادری‌والانت نیز مشاهده شد. طبق این گزارش، تشکیل هر دو نوع بی‌والانت حلقوی و میله‌ای در مرحله دیاکینز در جمعیت‌ها مشاهده شد (Sheidai et al. 2007). بنابر مطالعات انجام شده بر روی دو جنس *Seseli* و *Oenanthe* از خانواده چتریان همبستگی بالایی میان فراوانی پایین کیاسما و ناهنجاری‌های میوزی و ناباروری دانه گرده مشاهده شد (Hore 1981). اثر مثبت نانوذرۀ اکسیدتیتانیوم مبنی بر کاهش اثر منفی تنفس خشکی در گیاه زیره سبز به اثبات رسیده است (Mansouri et al. 2017). با توجه به اثر تنفس خشکی و نانوذرۀ دی‌اکسید تیتانیوم بر خصوصیات مورفو‌لوزی و عملکرد و اجزای عملکرد زیره سبز، لازم است تا اثر آن‌ها از منظر ژنتیکی بر تفکیک کروموزوم‌ها و نحوه برهمکنش آن‌ها طی مراحل تقسیم سلولی مشخص شود تا در برنامه‌ریزی‌های بهنژادی و توصیه‌های بعدی دقت بیشتری لحاظ شود. لذا این پژوهش برای نخستین بار به منظور بررسی نحوه تاثیر تنفس خشکی و نانوذرۀ دی‌اکسیدتیتانیوم در سطح کروموزومی بر مراحل تقسیم میوز زیره سبز و باروری دانه گرده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم (۰/۰۱۵، ۰/۰۲) درصد و شاهد) و تیمار آبی (آبیاری نرمال در حد FC و تنفس FC ۴۰ درصد در مرحله آغاز رشد زایشی) بر روی اکوتیپ منتخب در میان خراسان جنوبی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در مزرعه پژوهشی

تیله بزرگ چتریان که به تیره جعفری نیز معروف است، شامل ۱۵۰ جنس و در حدود ۳۰۰۰ گونه گیاهی است که عموماً در مناطق معتدل‌هه دو نیمکره، به‌ویژه نیمکره شمالی رویش دارند (Kafi et al. 2006). وجود گل‌آذین چتری و برگ‌های اغلب مرکب از بریدگی‌های باریک و نازک، آن‌ها را از سایر گیاهان به خوبی متمایز می‌سازد. این خانواده، گیاهان دارویی متعدد و مهمی را شامل می‌شود که زیره سبز یکی از مهم‌ترین آن‌هاست. گیاه زیره سبز که به عنوان یکی از سردمداران گیاهان دارویی از نیز شناخته می‌شود بعد از فلفل دومین گیاه دارویی مهم در دنیاست (Mortazavian et al. 2018). اسانس موجود در بذور این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدانفخ، ضدبacterی و ضدغفونی کننده می‌باشد (Kafi et al. 2006). هرچند بیشتر مناطق کشت زیره سبز که ایران مربوط به مناطق خشک و نیمه خشک است؛ تحقیقات مختلف نشان‌دهنده کاهش عملکرد دانه این گیاه در صورت مواجهه با تنفس کم‌آبی بخصوص در مراحل گلدهی است (Safari et al. 2017). امروزه به کارگیری روش‌های نوین در کاهش اثرات مخرب تنفس خشکی در دست تحقیق و بررسی اولیه است. نانوذرات دی‌اکسید تیتانیونیم از جمله موادی است که در مطالعات مختلف اثر التیام بخش آن بر تنفس خشکی از طریق تقویت زنجیره انتقال الکترون، افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردکتاز، کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گزارش شده و در زیره سبز مورد بررسی قرار گرفته است (Zheng et al. 2007; Mansouri et al. 2017). علی‌رغم خواص دارویی فراوان گونه‌های متعلق به خانواده Apiaceae مطالعات سیتوژنتیکی انجام شده در این خانواده محدود بوده و اغلب به شمارش کروموزومی گیاهان شناخته شده مربوط است (Ioven et al. 2008). در مطالعه‌ای که بر روی زیره سیاه تحت تأثیر نانوذرۀ سولفیدمیس و کادمیوم صورت گرفت، ضمن مشاهده تغییرات سیتوژنتیک، مشخص شد که نانوذرات دارای اثرات جهش‌زاوی متشابه با جهش‌زاوی متعارف مانند تابش گاما و متیل‌سولفونات می‌باشند. در برخی مطالعات گزارش شده تیمارهای نانوذرات، میزان تشکیل بذر را به دلیل اختلال در فرایندهای نموی بذر کاهش می‌دهد (Kumbhakar et al. 2016).

ناهنجاری‌های کروموزومی (شامل چسبندگی، توده‌ای شدن، کروموزوم سازمان‌نیافته، پل آنافازی، کروموزوم تاخیردار، کروموزوم پیشرو، تاخیر آنافازی، میکرونوكلئوس، سه قطبی، سین سایت و عدم تفرق صحیح کروموزومی) و نحوه تشکیل اتصالات کروموزومی در مرحله دیاکینز میوز مورد مطالعه قرار گرفت. میانگین وقایع سلوی نظیر فراوانی تشکیل کیاسما انتها، کیاسما کل و میانگین توزیع انواع کیاسما در پروفاز میوز یک مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد به کمک نرم‌افزار Minitab (ver.18) مورد بررسی قرار گرفت.

در این مرحله گل آذین‌های رسیده گیاه زیره سبز (۰/۹ تا ۱/۳ سانتی‌متر) در اوخر اردیبهشت‌ماه، جمع‌آوری و مراحل ثبت و نگهداری طبق روش فوق دنبال شد. به‌منظور تعیین قدرت باروری دانه گرده به روش کلاسیک، ۳۰۰-۵۰۰ دانه گرده به مدت یک ساعت در محلول رنگی استواورسین یک درصد و روغن گلیسرول به نسبت ۳:۱، رنگ آمیزی و فراوانی دانه‌های گرده رنگ شده با اندازه طبیعی ثبت شد (Obeidi et al. 2013).

اندازه‌گیری قطر دانه گرده به کمک نرم‌افزار image tools version 2.0 بر روی ۱۰۰ دانه گرده به صورت تصادفی انجام شد و باروری دانه گرده مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج و بحث

بررسی رفتار کروموزومی و ناهنجاری‌های میوزی در گیاهان شاهد (آبیاری نرمال، بدون اعمال نانوذره) تمامی مراحل میوز به صورت نرمال مشاهده و ثبت شد (شکل ۱). در این مطالعه عدد پایه کروموزومی در گیاه زیره سبز مانند اکثر گیاهان متعلق به خانواده چتریان $n=x=7$ مشاهده شد؛ هرچند در خانواده چتریان تعداد کروموزوم‌های پایه $11, 10, 9, 7 = x$ مشاهده شده است. در کلیه سلول‌های مورد بررسی اعم از سلول‌های شاهد و تحت تیمار، در مرحله دیاکینز، انواع بی‌والنت (حلقوی و میله‌ای)، یونی‌والنت و کوادری‌والنت با فراوانی‌های مختلف مشاهده شد. تجزیه واریانس منابع تغییر حاکی از عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد بین منابع تغییر به جز متغیرهای هگزاوالنت، کیاسما میانی و فراوانی

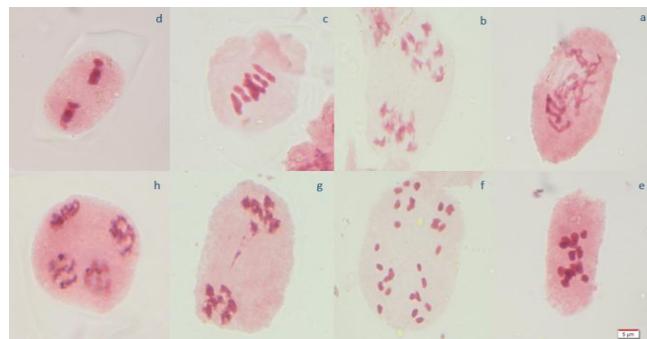
پر دیس ابو ریحان دانشگاه تهران واقع در پاکدشت اجرا شد. اکوتیپ مورد آزمایش براساس مطالعات قبلی (Mansouri et al. 2017) از میان اکوتیپ‌های موجود در بانک ژن پر دیس ابو ریحان دانشگاه تهران تهیه شد. با توجه به نیاز آبی زیره سبز، آبیاری تا زمان اعمال تنفس آبی با فاصله‌ی ۱۲ روز یک بار انجام گرفت. تنفس گیاه همزمان با شروع دوره‌ی گلدهی گیاه اعمال گردید. زمان محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسید‌تیتانیوم نیز دو روز قبل از اعمال تنفس خشکی انجام شد. در کرت‌های شاهد محلول‌پاشی با آب عاری از نانوذره صورت گرفت. با توجه به نتایج مطالعات گذشته محلول‌پاشی نانوذرات فقط در یک مرحله صورت گرفت. از هر کرت آزمایشی حدود ۵۰ گل آذین نارس گیاه زیره سبز در سه مرحله مختلف رشدی شامل اندازه گل کوچک، متوسط و بزرگ (به ترتیب صفر تا ۰/۵، ۰/۵ تا ۰/۹ و ۰/۹ تا ۱/۳ سانتی‌متر)، از اوایل اردیبهشت ماه تا اوخر اردیبهشت ماه، جمع‌آوری و بلا فاصله به داخل محلول ثبت کننده کارنوی (اتانول: اسید استیک به نسبت ۱:۳) انتقال داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق ثبت و پس از خارج کردن گل آذین و شستشو با آب مقطمر، در الكل ۷۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Obeidi et al. 2013). به‌منظور رنگ آمیزی، از محلول رنگی استواورسین ۱ درصد استفاده شد. بدلیل کوچک بودن چترها و عدم دسترسی آسان به بساک گیاه زیره، ابتدا تعدادی از چترها با پنس درون پتری دیش قرار گرفته و مقداری الكل ۷۰ درصد روی آن ریخته شد. سپس زیر دستگاه استریو میکروسکوپ قرار گرفته و با استفاده از سوزن تشریح و اسکالاپل بساک‌ها جدا شده و روی لام قرار داده شد. سپس یک قطره رنگ استواورسین اضافه شد و پوسته بساک و قسمت‌های اضافی حذف شدند. در مرحله بعد لام روی نمونه قرار داده شد و بین دولایه‌ی کاغذ صافی با فشار جزئی عمل اسکواش انجام شد تا رنگ اضافی جذب کاغذ شود. در نهایت اسلامید آماده شده برای مدت چند ثانیه روی حرارت چراغ الکلی قرار گرفت تا رنگ استواورسین بهتر جذب سلول‌های میوزی شود. تصویربرداری لام‌ها به‌وسیله سیستم مانیتورینگ متصل به فنومیکروسکوپ (Olympus BX51) انجام گرفت. در مجموع، تعداد ۲۰۰ سلول میوزی (میوسیت) جهت تعیین مطالعه رفتار میوزی و تعیین میزان

al. 2017). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر این سطح از تنفس منجر به افزایش کیاسماهی میانی به میزان ۶۰ درصد نسبت به شاهد (آبیاری نرمال بدون اعمال نانوذره) شده است، شاید بتوان به این نتیجه رسید که اعمال تنفس مذکور بر نوترکیبی ژن‌های واقع در این ناحیه مؤثر بوده و سبب افزایش عملکرد شده است.

چسبندگی کروموزوم^۱ها به یکدیگر با ماهیت ناشناخته ممکن است از ایجاد انتهاهای چسبناک بین دو یا چند کروموزوم و شکل پل‌های چسبناک در آنافاز ناشی شود (Shabraghi et al. 2010). هر چه تراکم کروموزوم‌ها بیشتر باشد تشخیص چسبندگی آن‌ها آسان‌تر است؛ لذا در متافاز I و II بیشتر چسبندگی‌ها قابل تشخیص‌اند. بسته به شدت چسبندگی، انواع چسبندگی از چسبندگی ساده دو کروموزوم به یکدیگر تا توده‌ای شدن و درهم رفتگی همگی کروموزوم‌ها و یا کشیدگی و بدریختی قابل بررسی است (Shabraghi et al. 2010). براساس نتایج تجزیه واریانس، برهمکنش متقابل تنفس آبی در نانوذره برای کلیه صفات به‌جز کروموزوم سازمان نیافته، کروموزوم تاخیردار و کروموزوم پیشرو در آنافاز I به شدت معنی‌دار بود (جدول ۳). کمترین و بیشترین فراوانی ناهنجاری چسبندگی کروموزوم به ترتیب در مرحله متافاز I و II در شرایط تنفس خشکی و اعمال نانوذره با غلظت ۰/۰۱۵ مشاهده شد (جدول ۴). به همین ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی ناهنجاری چسبندگی کروموزوم به ترتیب در مرحله متافاز I و II در شرایط آبیاری نرمال و اعمال نانوذره با غلظت ۰/۰۱۵ مشاهده شد. به عبارت دیگر در سطح ثابت غلظت ۰/۰۱۵ نانوذره فراوانی این ناهنجاری در شرایط تنفس خشکی در متافاز II افزایشی (۱۲ درصد بیشتر نسبت به شاهد) و در متافاز I کاهشی (۵/۵ درصد کمتر نسبت به شاهد) است (شکل ۲ و جدول ۴).

^۱ Stickiness

کیاسماهی کل بود (جدول ۱). بین تیمارهای مختلف نانوذره هگزاوالت‌ها فقط در نمونه‌های سطح ۰/۰۳ درصد نانوذره و تنفس خشکی، سطح ۰/۰۱۵ درصد نانوذره و عدم تنفس خشکی و تیمار شاهد (آبیاری نرمال و بدون اعمال نانوذره) مشاهده شد (جدول ۲). فراوانی کیاسماهی میانی و کیاسماهی کل تحت تاثیر نانوذره قرار گرفته و تنها بر همکنش معنی‌دار بین نانوذره و تیمار آبی در مورد فراوانی وقوع هگزاوالت‌ها مشاهده شد (جدول ۱).



شکل ۱- مراحل میوز نرمال در نمونه شاهد در زیره سبز:
-a- پروفاز b- پروفاز c- متافاز d- متافاز e- آنافاز f- آنافاز g- متافاز I
-h- متافاز II

میزان کیاسماهی میانی با اعمال نانوذره افزایش یافت. با افزایش غلظت نانوذره فراوانی کیاسماهی میانی و کیاسماهی کل افزایش یافت به نحوی که بیشترین درصد افزایش میزان کیاسماهی میانی و کیاسماهی کل نسبت به شاهد (به ترتیب ۵۷ درصد و ۱۱ درصد) در سطح ۰/۰۳ درصد نانوذره مشاهده شد (جدول ۲). در مجموع تاثیر نانوذره بر تغییر فراوانی کیاسماها بیشتر از تاثیر تنفس خشکی بود. گاندھی در سال ۱۹۹۴ اعلام داشت دما تاثیر مستقیمی بر کاهش میزان تشکیل کیاسما در دو جنس *Clataria* دارد. Shabraghi et al. (2010) نیز به کاهش قابل توجه در میزان کیاسماهی انتهایی در کلزا و ذرت تحت تاثیر میدان‌های مغناطیسی اشاره کردند. فراوانی کیاسما به صورت ژنتیکی کترل می‌شود. وقوع کیاسماهی میانی می‌تواند نوترکیبی ژن‌های میانی را افزایش داده و بر افزایش تنوع ژنتیکی موثر باشد (Fadaei et al. 2010). براساس مطالعه منصوری و همکاران با تیمارهای مشابه، سطح ۰/۰۱۵ درصد از نانوذره به همراه تنفس خشکی منجر به افزایش ۱۶ درصدی عملکرد دانه نسبت به شاهد شده است (Mansouri et al. 2010).

جدول ۱- تجزیه واریانس (مقادیر p) جفت شدگی کروموزوم‌ها در مرحله دیاکینز در زیره سبز

Source منابع تغییر	DF درجه آزادی	Ring Bivalent بی‌والنت حلقوی	Rod Bivalent بی‌والنت میله‌ای	Univalent یونی‌والنت	Quadrivalent کواردی‌والنت	Hexavalant هگزا‌والنت	Intercalary Chiasma کیاسماهی میانی	Terminal Chiasma کیاسماهی انتهایی	Total Chiasma کیاسماهی کل
rep تکرار	29	0.236	0.545	0.747	0.578	0.000	0.497	0.622	0.125
Water تیمار آبی	1	0.159	0.186	0.498	0.526	0.584	0.105	0.966	0.344
Nanoparticle تیمار نانوذره	2	0.420	0.640	0.500	0.364	0.720	<u>0.018</u>	0.223	<u>0.023</u>
Water*Nano برهمکش	2	0.204	0.962	0.547	0.787	<u>0.035</u>	0.081	0.734	0.501

موارد معنی دار در سطح پنج درصد و یک درصد در داخل جدول با اعداد زیر خطدار مشخص شده‌اند.

جدول ۲- جفت شدگی کروموزوم‌ها در مرحله دیاکینز در زیره سبز

کیاسماهی کل	کیاسماهی انتهایی	کیاسماهی میانی	هگزا‌والنت	کواردی‌والنت	یونی‌والنت	بی‌والنت میله‌ای	بی‌والنت حلقوی	نوع جفت شدن	تیمار آبی	تیمارهای نانوذره (درصد)
نرمال	0.03	2.06±0.25	3.41±0.32	0.96±0.25	0.51±0.10	0	1.68±0.11	8.24±0.24	9.51±0.40	
تنش	0.03	2.00±0.32	3.10±0.28	1.24±0.37	0.55±0.12	0.06±0.04	1.69±0.21	8.48±0.39	10.17±0.49	
نرمال	0.015	1.56±0.20	3.60±0.25	1.33±0.24	0.57±0.13	0.06±0.02	1.00±0.07	8.46±0.29	9.46±0.32	
تنش	0.015	2.33±0.23	3.23±0.23	1.13±0.26	0.43±0.09	0	1.70±0.21	8.23±0.21	9.93±0.31	
تنش	بدون نانوذره	1.92±0.23	3.48±0.30	1.72±0.35	0.36±0.12	0	0.88±0.16	7.88±0.24	8.76±0.30	
نرمال	بدون نانوذره	1.65±0.23	3.65±0.29	1.24±0.28	0.41±0.09	0.03±0.01	1.06±0.22	7.89±0.31	8.96±0.40	

جدول ۳- تجزیه واریانس (مقادیر p) ناهنجاری‌های کروموزومی در مرحله دیاکینز در زیره سبز.

منابع تغییر	DF	Stickiness %	Stickiness %	Clumping %	Clumping %	Disorganized % chromosome	Stickiness %	Laggard chromosome %	Laggard chromosome %
	درجه آزادی	چسبندگی	چسبندگی	توده‌ای شدن	توده‌ای شدن	کروموزوم سازمان نیافه	چسبندگی	کروموزوم تاخیردار	کروموزوم تاخیردار
		I آنفاز	II آنفاز	I آنفاز	II آنفاز	I آنفاز	I آنفاز	I آنفاز	II آنفاز
rep تکرار	4	0.433	0.893	0.265	0.370	0.772	0.265	0.955	0.766
Water تیمار آبی	1	<u>0.001</u>	0.459	0.095	<u>0.000</u>	0.425	<u>0.000</u>	0.759	<u>0.000</u>
Nanoparticle تیمار نانوذره	2	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.023</u>	<u>0.000</u>	0.300	<u>0.000</u>	0.886	<u>0.000</u>
Water*Nano برهمکنش	2	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.001</u>	<u>0.000</u>	0.214	<u>0.000</u>	0.204	<u>0.000</u>

ادامه جدول ۳- تجزیه واریانس (مقادیر p) ناهنجاری‌های کروموزومی در مرحله دیاکینز در زیره سبز.

منابع تغییر	DF	Leader chromosome% کروموزوم پیشرو	Leader chromosome% کروموزوم پیشرو	Delays anaphase% فاز تاخیری	Micronucleus% میکرونکلئوس	Tripolar% سهقطبی	Syncyte% سین سایت	Nondisjunction chromosome% عدم تفرق صحیح کروموزوم	% Pollen fertility دانه گرده بارور
	درجه آزادی	I آنفاز	II آنفاز	II آنفاز	II تلوفر				
rep تکرار	4	0.854	0.86	0.937	0.698	0.514	0.227	0.430	0.714
Water تیمار آبی	1	0.557	<u>0.04</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	0.249	<u>0.001</u>	0.173
Nanoparticle تیمار نانوذره	2	0.970	<u>0.00</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.014</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>
Water*Nano برهمکنش	2	0.102	<u>0.04</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.000</u>	<u>0.001</u>

موارد معنی دار در سطح پنج درصد و یک درصد در داخل جدول با اعداد زیرخط دار مشخص شده‌اند.

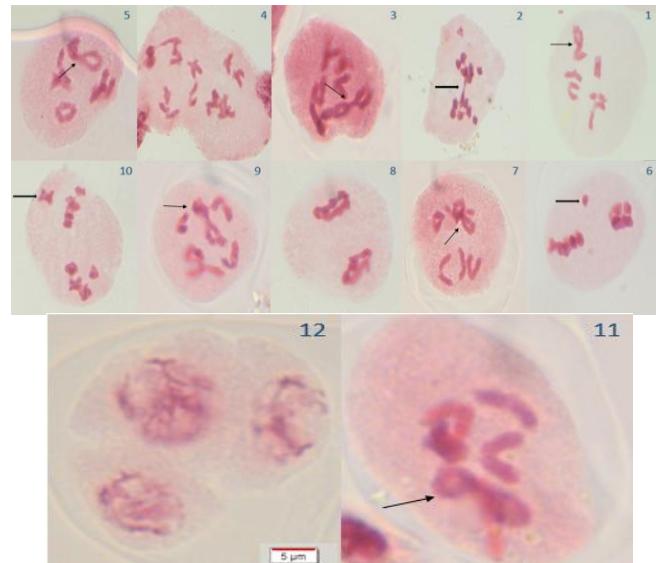
جدول ۴- ناهنجاری کروموزوم‌ها در مراحل تقسیم میوز در زیره سبز

Water treatment تیمار آبی	Nanoparticle treatment (percentage) تیمارهای نانوذره (درصد)	Pairing type نوع جفت شدن	Stickiness % چسبندگی	Stickiness % چسبندگی	Laggard chromosome کروموزوم تأخیردار %	Leader chromosome کروموزوم پیشرو %	Micronucleus میکرونوکلئوس %	Delays anaphase فاز تاخیری %	Nondisjunction chromosome عدم تفرق صحیح کروموزوم %	Tripolar سهقطی %	Syncyte سین سایت %	Pollen دانه گرده بارور % fertility
		متافاز I	متافاز II	آنافاز II	آنافاز II	تلوفاز II	آنافاز II					
Normal نرمال	0.03 .0.03	2.71 ^{bc}	10.06 ^b	2.17 ^b	1.81 ^a	5.23 ^{bc}	8.33 ^a	0.35 ^b	9.86 ^a	17.54 ^a	90.23 ^{bc}	
Stress نشش	0.03 .0.03	2.86 ^{bc}	0 ^c	0.20 ^b	0.53 ^{ab}	22.28 ^a	0.00 ^b	0.40 ^b	10.97 ^a	6.40 ^c	84.60 ^c	
Normal نرمال	0.015 .0.015	13.83 ^a	0 ^c	0.18 ^b	0.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^b	0.15 ^b	0.28 ^b	7.52 ^c	86.74 ^c	
Stress نشش	0.015 .0.015	0.36 ^c	17.07 ^a	0.18 ^b	0.00 ^b	4.28 ^{bc}	0.00 ^b	0.15 ^b	0.28 ^b	14.04 ^{ab}	96.93 ^a	
Stress نشش	No nanoparticle بدون نانوذره	11.44 ^a	0 ^c	0.15 ^b	0.00 ^b	6.19 ^b	0.62 ^b	0.36 ^b	0.89 ^b	9.49 ^{bc}	95.72 ^{ab}	
Normal نرمال	No nanoparticle بدون نانوذره	5.69 ^b	5.01 ^{bc}	7.88 ^a	0.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^b	6.03 ^a	11.38 ^a	7.71 ^c	97.61 ^a	

حرروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

کروموزوم‌های چسبنده می‌توانند نتیجه عملکرد ناقص یک یا دونو از پروتئین‌های غیرهیستونی اختصاصی درگیر در سازماندهی کروموزومی باشند که برای تفکیک کروماتید ضروری هستند. تغییر عملکرد این پروتئین‌ها می‌تواند به دلیل جهش در ژن‌های ساختاری رمزکننده آن‌ها در نتیجه عامل جهش‌زا باشد (Gaulden 1987).

کروموزوم‌های تاخیردار یا سرگردان^۱ به یک یا چند کروموزوم اطلاق می‌شود که از تفکیک صحیح آنافازی عقب افتاده باشند. در مقابل، اصطلاح کروموزوم پیشرو^۲ به یک یا چند کروموزوم اطلاق می‌شود که حرکت زودهنگام در آنافاز را نشان بدنه و زودتر از سایر کروموزوم‌ها به قطبین برسند (Sheidai et al. 1999). برهمکنش تنش آبی و نانوذره در کروموزوم‌های تاخیردار در مرحله آنافاز II از نوع تغییر در مقدار بوده و در همه سطوح مورد بررسی تنش آبی، با افزایش غلظت نانوذره از فراوانی این نوع کروموزوم‌ها کاسته می‌شود. تاثیر نانوذره بر فراوانی این نوع ناهنجاری در شرایط نرمال بیشتر از شرایط تنش خشکی است و به طور کلی تنش خشکی سبب کاهش چشمگیر این نوع ناهنجاری شده است. هرگونه نقص در تشکیل کیاسما و وقوع کراسینگاور می‌تواند باعث تشکیل کروموزوم تاخیردار شود. این کروموزوم‌ها طی مراحل بعدی میوز یا ازبین می‌رونند و یا به طور تصادفی به قطبین مهاجرت می‌کنند (Pagliarini 2000). کروموزوم‌های پیشرو و تاخیری می‌توانند نتیجه ظهور یونی‌والنت‌ها در انتهای مرحله آنافاز یا فعال شدن ژن دسیناپس و پیدایش یونی‌والنت‌ها در مرحله متافاز میوز I باشند. با توجه به نفوذ ناقص این ژن‌ها عوامل محیطی از جمله تنش خشکی می‌تواند بر شدت بیان آن‌ها اثرگذار باشد (Bione et al. 2000) برهمکنش متقابل تنش آبی و نانوذره درخصوص متغیرهای کروموزوم‌های پیشرو در آنافاز II و کروموزوم تاخیردار در آنافاز II نیز از نوع تغییر در مقدار بوده و غلظت $0.03\text{ }\mu\text{g}$ درصد نانوذره و عدم تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار این نوع ناهنجاری کروموزومی ($100\text{ }\mu\text{g}$ درصد) و از سوی دیگر کاهش معنی‌دار ناهنجاری کروموزوم تاخیردار ($70/43\text{ }\mu\text{g}$ درصد) شد (شکل ۲ و



شکل ۲- دیاکینیز و ناهنجاری‌های میوزی در زیره سبز

۱ و ۲- کوادری والنت (پیکان نازک)، پل کروماتیدی (پیکان توپر) در تیمار آبیاری نرمال و $0.03\text{ }\mu\text{g}$ درصد نانوذره ۳ و ۴ - کوادری والنت (پیکان نازک)، سین سایت در شرایط اعمال تنش خشکی و $0.03\text{ }\mu\text{g}$ درصد نانوذره ۵ و ۶- کوادری والنت (پیکان نازک)، کروموزوم تاخیری در مرحله متافاز II (پیکان توپر) در شرایط آبیاری نرمال و $0.15\text{ }\mu\text{g}$ درصد نانوذره ۷ و ۸- کوادری والنت (پیکان نازک)، توده‌ای شدن در تیمار تنش خشکی و اعمال $0.015\text{ }\mu\text{g}$ درصد نانوذره ۹ و ۱۰ - کوادری والنت (پیکان نازک)، کروموزوم پیشرو (پیکان توپر) در نمونه شاهد. ۱۱ و ۱۲- کوادری والنت (پیکان نازک)، سه قطبی در شرایط تنش خشکی.

وجود پل‌های کروموزومی که ناشی از چسبنده‌گی کروماتیدی می‌باشد، سبب خواهد شد که در نسل آینده، برخی از نتاج، فاقد یک کروموزوم یا قطعه‌ای از کروموزوم شوند و با جستجوی دقیق‌تر در این نتاج، به پایه‌های ژنتیکی متنوعی خواهیم رسید. احتمال بقای سلول‌های دارای کروموزوم‌های چسبنده کم است زیرا به طور عمده تفکیک این کروموزوم‌ها در آنافاز با تاخیر چند مرحله‌ای در میوز مواجه می‌شود. این ناهنجاری منجر به دو برابر شدن ژن‌ها در یک قطب و حذف ژن‌ها در قطب دیگر می‌شود (Shabrange et al. 2010). چسبنده‌گی کروموزومی می‌تواند در اثر عوامل ژنتیکی یا محیطی مانند اشعه ایکس، اشعه گاما، حشره‌کش‌ها و عناصر شیمیایی موجود در خاک (Bione et al. 2000) و یا برهمکنش عوامل ژنومی و محیطی (Ruediger 2009) نیز ایجاد شود.

¹ Laggard chromosome

² Leader chromosome

وقفه در جدا شدن کروموزومها در آنافاز II یا جدا نشدن کروموزومی در یک قطب آنافازی منجر به پدیده تاخیر آنافازی^۲ می شود؛ به طوری که در یکی از دو سلول مجاور در مرحله آنافاز II کروموزومها کاملاً تفکیک شده اند اما کروموزومهای سلول دیگر هنوز در استوای سلول قرار دارند. از بین کلیه تیمارهای مورد بررسی عدم تفرق صحیح کروموزومها^۳ تنها در نمونه شاهد مشاهده شد. به عبارت دیگر کلیه تیمارهای اعمال شده اعم از تنش خشکی یا تیمار نانوذره بصورت جداگانه یا همراه با هم سبب کاهش فراوانی این ناهنجاری شده است. مشاهده عدم تفرق صحیح کروموزومها در نمونه شاهد می تواند نشانه احتمال حضور کروموزومهای B در این گونه باشد. همچنین ناهنجاری تاخیر آنافازی تنها در نمونه تحت تنش خشکی و غلظت ۰/۰۳ درصد از نانوذره رویت شد. نقش کینه توکور را در تفکیک کروموزومها و اتصال رشته دوک به سانترومر مورد بررسی قرارداد و عامل اصلی در این دو ناهنجاری را غیرفعال شدن یکی از کینه توکورها در یکی از رشته های خواهری و عدم اتصال رشته دوک به سانترومر دانست (Sybenga 2014). با توجه به بررسی های انجام شده شاید بتوان این طور نتیجه گرفت که نانوذره و تنش خشکی بر روی کینه توکور اثر گذاشته و آن را غیرفعال کرده است. در نتیجه، اتصال رشته دوک به سانترومر ممکن نبوده و باعث تاخیر در آنافاز شده است.

ناهنجاری سه قطبی^۴ شامل تشکیل تریاد به جای تتراد در مرحله تلوفاژ II است که به جای وجود چهار قطب کروموزومی در تلوفاژ II، سه قطب در تشکیلات میکروسپوری دیده می شود. هر گونه اختلال در فعالیت رشته های دوک منجر به ایجاد تریپولار یا سه قطبی می شود. این پدیده عامل مهمی در ایجاد گامت های نابارور و پلی پلولیتی شناخته می شود (Veilleux 1985; Bretagnolle and Thompson 1995). در این مطالعه تمام سطوح تنش اعم از تنش خشکی و نانوذره منجر به کاهش این ناهنجاری گردیده است؛ با نگاهی به روند تغییرات، به طور کلی تنش خشکی سبب کاهش این ناهنجاری شده است. با کاهش فراوانی این ناهنجاری باوری دانه گرده با مشکل کمتری مواجه

جدول ۴). مطالعات در گیاهان متفاوت نشان داده است که کاهش تولید دانه با اختلالات میوزی همبستگی مستقیم دارد و تمامی اختلالات رفتاری کروموزومها، تقسیم میوزی طبیعی و در نتیجه باوری دانه گرده را تحت تأثیر قرار می دهد (Pagliarini 2000). کروموزومهای تاخیردار و پیشرو در بسیاری از گیاهان از جمله (Koobaz 2000) Avena (Sheidai 1991) Asparagus (Mirzaei 2004) Aloe (Fadai 2005) Bromus Aegilops 2016 (Ranjbar 2012) Onobrychis Ducrosia گزارش شده است. کروموزومهای تاخیردار در صورتی که نتوانند در زمانی که باید در تلوفاژ به قطب ها برسند، می توانند میکرونوكلئوس تولید کنند که به تشکیل دانه های گرده کوچک و شاید گامت هایی با تعداد کروموزومهای نامتعادل منجر شوند. این حالت را می توان در گامت های آنیوپلوبیتید مشاهده کرد (Souza et al. 2006).

جدا شدن زودهنگام یونی والان ها یا عملکرد آنها به عنوان کروموزوم سرگردان در آنافاز باعث ایجاد میکرونوكلئوس^۱ در Kodura 1981 تلوفاژ می شود که معمولاً تا مرحله تتراد باقی می ماند (and Rao 1981). در این مطالعه هر کدام از غلظت های ۰/۰۳ نانوذره و تنش خشکی باعث افزایش معنی دار میکرونوكلئوس نسبت به شاهد شد. در همین حال، غلظت ۰/۰۳ درصد از نانوذره و تنش خشکی سبب بیشترین افزایش این نوع ناهنجاری شد (جدول ۴). سولفید کادمیوم و مس را در افزایش ناهنجاری Kumbhakar et al. 2016 میکرونوكلئوس در ذیره سیاه موثر دانستند (). کروموزومهایی که میکرونوكلئوس را طی میوز ایجاد می کنند، از میکروسپورهای میکروسیت جدا می شوند. میکرونوكلئوس ممکن است واجد دیواره میکروسپوری شده، نوعی برآمدگی را ایجاد کند. این میکروسیت های جدا شده منشاء ایجاد دانه گرده های نازا و کوچک خواهند بود (Pagliarini 2000). میکرونوكلئوس عاملی است که موجب حذف کروموزوم درون گونه ای می شود (Tjio and Levan 1950) و لذا از طریق تشکیل میکروسلول ها فراوانی دانه های گرده عقیم را افزایش می دهد (Techio et al. 2006).

² Delays anaphase

³ Nondisjunction chromosome

⁴ Tripolar

¹ Micronucleus

- به عنوان عامل مهم در پایی (Kim et al. 2009) *Chrysanthemum* پلوفیدی گزارش شده است.

بررسی دانه گرده

با درنظر گرفتن کلیه ترکیبات تیماری، بیشترین درصد کاهش باروری دانه گرده در ترکیب با بالاترین غلظت تیمار نانوذره مشاهده شد. بیشترین درصد باروری دانه گرده نیز در تیمارهای مشاهده شد. در مطالعه افراش ۱۶ درصدی عملکرد دانه را نسبت به تیمار شاهد Mansouri et al. (آبیاری نرمال بدون اعمال نانوذره) اعلام داشت (2016). با توجه به اینکه در سطح ۰/۰۱۵ درصد از نانوذره به همراه تنش خشکی، آفراش ۰/۰۳۰ درصد نانوذره مشاهده شد (شکل ۳ و جدول ۴). منصوری نیز در سطح ۰/۰۱۵ درصد از نانوذره به همراه تنش خشکی، افزایش ۰/۰۳۰ درصدی عملکرد دانه را نسبت به تیمار شاهد به همراه تنش خشکی میزان تشکیل کیاسماهی میانی نسبت به شاهد افزایش یافته لذا فراوانی کیاسماهی میانی نمی‌تواند دلیلی بر ناباروری دانه گرده باشد. باروری دانه گرده در شرایط تنش خشکی، نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول ۴) که آن را می‌توان با مقاوم بودن گیاه زیره به تنش خشکی مرتبط دانست و یا علت آن می‌تواند کاهش وقوع ناهنجاری سین‌سایت و سایر ناهنجاری‌های کروموزومی اشاره شده در مطالعه حاضر باشد. یکی از وقایع مهم طی تقسیم میوز، تشکیل کیاسما بین کروموزوم‌های همولگ است که دو اثر مهم دارد. نخست سبب نگهداری کروموزوم‌های همولگ در کنار هم تا آغاز مرحله آنافاز I می‌شود و دوم، باعث رفتار منظم و حرکت صحیح همولگ‌ها به سمت قطبین سلول خواهد شد.



شکل ۳- دانه گرده در ذیره سبز

۱ و ۲- به ترتیب دانه گرده نرمال و نابالغ در نمونه تحت تیمار آبیاری نرمال و نابالغ در نمونه تحت تیمار نانوذره ۰/۰۳ و ۰/۰۳- به ترتیب دانه گرده نرمال و نابالغ در نمونه تحت تیمار آبیاری نرمال و آبیاری نرمال ۷- دانه گرده نابالغ (پیکان) در کنار دانه گرده نرمال تحت شرایط تیمار با نانوذره در غلظت ۰/۰۱۵ درصد و تنش خشکی ۸ و ۹- به ترتیب دانه گرده بالغ و نابالغ در نمونه شاهد ۱۰ و ۱۱- به ترتیب دانه گرده نرمال و نابالغ در نمونه تحت تنش خشکی.

نتیجه گرفت که در یک سطح پلولنیدی برابر هر چقدر میزان وقوع ناهنجاری‌های کروموزومی چسبندگی کروموزومی، سه قطبی، سین سایت و میکرونوکلئوس بالاتر رود میزان باروری دانه گرده کاهش می‌یابد. اعمال نانوذره تأثیر بهسزایی در افزایش این ناهنجاری‌ها داشته است به صورتی که سطح $0/0^3$ درصد از نانوذره منجر به افزایش ناهنجاری میکرونوکلئوس شده است. با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که اعمال نانوذره اگرچه منجر به بهبود خصوصیات مورفولوژی گیاه زیره سبز گردیده et al. 2017) اما منجر به کاهش باروری دانه گرده می‌شود.

لذا عدم تشکیل کیاسما به عنوان یکی از دلایل مهم کاهش باروری و ناهنجاری‌های کروموزومی محسوب می‌شود (Hore 1981). منصوری اعلام داشت که اعمال تنفس خشکی منجر به کاهش عملکرد دانه به میزان ۴۵ درصد و استفاده از نانوذره منجر به Mansouri et al. 17 درصدی افت عملکرد دانه می‌شود (2017). شاید بتوان علت تغییرات فیزیولوژیک در تمامی سطوح تنفس خشکی و نانوذره را با تغییر درصد کیاسما میانی و کل مرتبط دانست.

نتیجه‌گیری کلی

از مجموع نتایج حاصل از بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی در مراحل گوناگون تقسیم میوز و میزان باروری دانه گرده می‌توان

منابع

- Ahirwar R and Verma RC (2015) Colchicine induced anapsitic chromosomal behavior at meiosis in *Allium cepa* L. The Nucleus 58:47-51.
- Bione NCP, Pagliarini MS and Ferraz de Toledo JF (2000) Meiotic behavior of several soybean varieties.
- Bretagnolle FA and Thompson JD (1995) Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. New Phytologist 129:1-22.
- Caetano-Pereira CM, Pagliarini MS and Brasil EM (1999) Cell fusion and chromatin degeneration in an inbred line of maize. Genetics and molecular biology 22:69-72.
- Fadaei F, Sheidai M, Asadi M (2010) Cytological study the genus *Arenaria* L. (Caryophyllaceae). Caryologia 63:149156.
- Falistocco E, Tosti T, Falcinelli M (1995). Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of the origin of 2n gametes. J Hered 89:448-53.
- Gaulden ME (1987) Hypothesis: Some mutagens directly alter specific chromosomal proteins thus produce chromosome stickiness. Mutagenesis 2:357365.
- Hore A (1981) Cytotypes within the family Umbelliferae with special reference to the genera *Seseli* L. and *Oenanthe* L. (subtribe Seselinae). Genetica 56:205-211.
- Iovene M, Grzebelus E, Carpoto D, Jiang J and Simon PW (2008) Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other Apiaceae. American Journal of Botany 95:793-804.
- Kafi M, Mohassel MR, Koocheki A, and Nassiri M (2006) Cumin (*Cuminum Cyminum*): production and processing, Science Publishers, Ferdowsi University of Mashhad.
- Kim JS, Oginuma K and Tobe H (2009) Syncyte formation in the microsporangium of *Chrysanthemum* (Asteraceae): a pathway to infraspecific polyploidy. Journal of Plant Research 122:439-444.

Kodura PRK, Rao MK (1981) Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. Theoretical and Applied Genetics 59:197-214.

Koobaz P (2000) Biosystematic study of species and populations of *Avena* L. in Iran, MsC thesis. Shahid Beheshti University.

Kumbhakar DV, Datta AK, Mandal A, Das D, Gupta S, Ghosh B, Halder S and Dey S (2016) Effectivity of copper and cadmium sulphide nanoparticles in mitotic and meiotic cells of *Nigella sativa* L. (black cumin)-can nanoparticles act as mutagenic agents?. Journal of Experimental Nanoscience 11:823-839.

Mansouri M, Akbari GA, Mortazavian SMM (2017) The effect of nanoparticles of titanium dioxide on yield and yield components of different ecotypes of cumin in drought stress conditions, Journal of Crops Improvement 19:461473.

Mortazavian SMM, Safari B, Sadat Noori SA, Foghi B (2018) Evaluation of Diverse Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Ecotypes for Seed Yield under Normal and Water Stress Condition. JAST. 20:359372.

Obeidi L, Mehrabi AA, Omidi M and Oladzad A (2013) Meiotic behavior and pollen viability of *Ducrosia anethifolia* (DC). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 20(1).

Pagliarini MS (2000) Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. Genetics and Molecular Biology 23:997-1002.

Rao MK and Koduru PRK (1978) Cytogenetics of a factor for syncyte formation and male sterility in *Pennisetum americanum*. Theoretical and Applied Genetics 53:1-7.

Ruediger HWR (2009) Genotoxic effects of radiofrequency electromagnetic fields. Pathophysiology 16:89-102.

Safari B Mortazavian SMM, Sadat Noori SA, Foghi B, (2017) Evaluation of drought tolerance in endemic ecotypes of cumin using tolerance indices. *Journal of Plant Production Research* 23:185-204.

Shabrange A, Sheidai M, Majd A, Nabiuni M, Dorranian D (2010) Cytogenetic abnormalities caused by extremely low frequency electromagnetic fields in canola. *Science Asia* 36:292-296.

Sheidai M (1991). Variations in meiotic chromosomes in *Asparagus L.* *Biovigyanum* 17:45-47.

Sheidai M, Saeed AM, Zehzad B (1999) Meiotic studies of some *Aegilops* (Poaceae) species and populations in Iran. *Edinburgh Journal of Botany* 56:405-419.

Sheidai M, Kalhor-Home N and Poorneydanei A (2007) Cytogenetic study of some populations of *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) in Iran. *Caryologia*, 3: 257-261.

Sjodin, J., 1970. Induced asynaptic mutants in *Vicia faba* L. *Hereditas* 66:215-32.

Souza MM, Martins ER, Pereira TNS and Olivera LO (2006) Reproductive studies on Ipecac (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich, Rubiaceae): Meiotic behavior and pollen viability. *Brazilian Journal of Biology* 66:151159.

Sybenga J (2014) Incomplete pole orientation of kinetochores in complex meiotic metaphase I configurations delays metaphase anaphase transition in *Secale*. *Journal of Genome* 57: 233238.

Techio VH, Davide LC and Pereira AV (2006) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology* 29:353362.

Tjio JH and Levan A (1950) The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *Anales Estacion Exper Aula Dei* (Spain) 2:2146.

Veilleux RE (1985) Diploid and polyploidy gametes in crop plants: mechanism of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breed. Rev* 3:253-288.

Zheng L, Su M, Liu Ch, Chen Li, Huang H, Wu X, Liu X, Yang Gao F, Hong F (2007) Effects of Nanoanatase TiO₂ on Photosynthesis of Spinach Chloroplasts Under Different Light Illumination. *Biological Trace Element Research* 119:68–76