

اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر تحمل تنش شوری در گیاه زنیان (*Carum copticum* L.)

ریحانه عموآقایی\*، مینا مجیدی و صادق فرهادیان

گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷)

## چکیده

در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران، شوری آب و خاک تهدیدی مهم برای رشد گیاهان و کشاورزی محسوب می‌شود. ثابت شده است که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به رشد گیاهان کمک می‌کند و تحمل تنش در گیاهان را افزایش می‌دهد. بنابراین، در پژوهش حاضر، آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه سطح شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم کلرید) و پنج سطح محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک، وزن تر و خشک گیاه، میزان کلروفیل *a, b* و محتوای نسبی آب گیاه بطور معنی‌داری کاهش یافت، اما محتوای مالون دی‌آلدئید، کاروتنوئیدها، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و APX افزایش یافت. محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در غلظت‌های مناسب (اغلب ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد را بهبود داد و باعث افزایش میزان کلروفیل *a, b*، کاروتنوئید، محتوای نسبی آب، میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و APX شد و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها را کاهش داد. اثر کاربرد ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر پارامترهای رشد و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کمتر از اثر غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات بود و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها را تحت هر دو شرایط شور و غیرشور افزایش داد. در مجموع می‌توان گفت که غلظت مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از طریق افزایش پرولین و تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث حفاظت گیاه در برابر تنش اسمزی و اکسیداتیو ناشی از تنش شوری شده است.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین، تنش شوری، کلروفیل، محتوای نسبی آب

## مقدمه

می‌شود. علاوه بر این ورود یون‌های سمی نظیر سدیم و کلر به بافت‌های تحت تنش شوری، تمام فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند سنتز پروتئین، تنفس، متابولیسم لیپید و فتوسنتز را بطور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Vafadar et al., 2020; Munns and Tester, 2008). طی تنش شوری، اختلال در فرآیندهای تنفس و فتوسنتز موجب انحراف الکترون از زنجیره انتقال الکترون شده و با انتقال این الکترون‌ها به اکسیژن، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده و از طریق القای

در اکثر مناطق دنیا تنش شوری جز عمده‌ترین تنش‌های محیطی است که رشدونمو گیاهان را محدود می‌کند. کشور ایران پس از هند و پاکستان با دارا بودن ۶/۸ میلیون هکتار اراضی شور در صدر کشورهای آسیایی در معرض تهدید از نظر تنش شوری قرار گرفته است (رنجبر و پیرسته انوشه، ۱۳۹۴). تنش شوری با ایجاد پتانسیل اسمزی منفی در محیط، موجب کاهش جذب آب و در نتیجه کاهش تورگر سلول و افت رشد گیاه

\*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: rayhanehamooaghiae@yahoo.com

گرفته است. نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم کلیه خصوصیات دی‌اکسید تیتانیوم را دارا بوده و علاوه بر آن به دلیل کوچکی اندازه ذرات، سطح تماس آن با مواد افزایش یافته و کارایی و اثربخشی بیشتری دارد (Shi *et al.*, 2013). هر چند، براساس معیارها برای عناصر ضروری، تیتانیوم، یک عنصر ضروری برای تغذیه گیاه نیست، اما مقادیر کم آن برای گیاه سودمند است و می‌تواند جذب برخی عناصر نظیر نیتروژن، فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی را تحریک کند. استفاده تیتانیوم با غلظت کم از طریق ریشه‌ها یا برگ‌ها، با تحریک فعالیت آنزیم‌های مشخص، افزایش مقدار کلروفیل و فتوسنتز و بهبود جذب مواد غذایی، موجب افزایش عملکرد، بازده و کیفیت محصول و افزایش مقاومت در برابر تنش در گیاهان مختلف می‌شود (Lyu *et al.*, 2017). مکانیسم اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مشابه با اثرات ذکر شده برای تیتانیوم است (Chaudhary and Sing, 2020). گزارش‌هایی مبنی بر اثرات مثبت یا منفی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم روی رشد در شرایط بدون تنش و تحمل تنش در گیاهان وجود دارد (Rastogi *et al.*, 2017; Mingyu *et al.*, 2007; Tumburu *et al.*, 2017; Yang and Hong, 2006). مشاهدات قربانی و همکاران (۱۴۰۰) نشان داد که محلول‌پاشی با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، وزن خشک بخش هوایی، سطح برگ، شاخص کلروفیل، هدایت روزنه‌ای، طول، قطر، سطح و حجم ریشه گیاه نخود را تحت سه سطح خشکی (۴۰، ۶۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی) افزایش داد، اما با افزایش بیشتر غلظت نانوذرات این صفات روند کاهشی را نشان دادند. در پژوهش دیگری Shah و همکاران (۲۰۲۱) دریافتند که پرایمینگ دانه‌های ذرت در محلول ۶۰ پی‌پی‌ام نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، جوانه‌زنی دانه، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی دانه‌رست ذرت را تحت تنش شوری بهبود داد و با افزایش تجمع پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تنش اکسیداتیو ناشی از شوری را تعدیل کرد. یک مطالعه ترانس کریپتوم نشان داد که در پاسخ به تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، بسیاری از ژن‌های درگیر در فرآیند فتوسنتز و همچنین

تنش اکسیداتیو، موجب پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و غیرفعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌ها می‌شوند (Munns and Tester, 2008; Yang and Guo, 2018).

گیاهان، برای غلبه بر تنش اسمزی تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین را افزایش می‌دهند و برای پاکروبی گونه‌های فعال اکسیژن و محافظت در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو مخرب ناشی از شوری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گاپاکول پراکسیداز (POX)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، آسکوربات پراکسیداز (APX) را فعال می‌کنند (Munns and Tester, 2008). برخی پژوهش‌ها، نشان داده است که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مقاومت گیاهان در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از شوری را افزایش می‌دهد (Ghorbannejad and Amooaghaie, 2017; Khodabakhsh *et al.*, 2014; Vafadar *et al.*, 2020).

تاکنون روش‌های مختلفی نظیر اصلاح نباتات، مهندسی ژنتیک، مدیریت آب و خاک، استفاده از انواع محرک‌های بیولوژیکی و هورمون‌ها برای غلبه بر اثرات منفی تنش شوری بر گیاهان تجربه شده است. اما هر یک از این روش‌ها خود دارای محدودیت‌هایی هستند. فناوری نانو، امیدواری‌هایی را برای غلبه بر این تنگناها بوجود آورده است. اکنون، از پتانسیل استفاده از این فناوری برای ایجاد روش‌های مناسب و حسگرهای دقیق برای مدیریت تغذیه گیاهان در کشاورزی، مدیریت منابع طبیعی و تشخیص زودرس عوامل بیماری‌زا و آلاینده‌ها در گیاهان و محصولات غذایی، استفاده می‌شود. اخیراً استفاده از نانوذرات برای افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Saxena *et al.*, 2016). اثرات نانوذرات ممکن است در رابطه با یون‌های عنصری رها شده از آنها و یا مرتبط با خواص ویژه فیزیکوشیمیایی آنها از نظر حلالیت، بار سطحی، اثرات کوانتومی، تجمع‌پذیری و سطح ویژه بالا باشد و اثراتشان روی موجود زنده به اندازه، شکل و غلظت ذراتشان بستگی دارد (Farooqui *et al.*, 2016). در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به علت خواص فوتوکاتالیستی در کشاورزی مورد توجه قرار

معمولی استفاده شد. سپس تیمار شوری در سه سطح (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) از طریق افزودن نمک سدیم کلرید (Merck) به آب آبیاری گلدان‌ها اعمال شد. لازم به ذکر است که طبق بررسی منابع، تحمل شوری زنیان اغلب در سطوح شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار بررسی شده است. لیکن در این آزمایش علی‌رغم اینکه شوری آب کمتر بوده (۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر)، چون خاک رسی و هدایت الکتریکی اولیه خاک (۳/۱۱ دسی‌زیمنس بر متر) هم نسبتاً بالا بوده و تیمار با آب شور بطور مکرر انجام شده و معمولاً آب زیادی از گلدان خارج نمی‌شده است و از سوی دیگر شرایط گلخانه هم نسبتاً گرم و خشک بوده و میزان تبخیر آب زیاد بوده است، احتمال تجمع نمک در خاک زیاد بوده و بدیهی است که با شرایط فوق در عمل گیاه با سطوح شوری بالاتری در خاک مواجه بوده است.

همزمان با شروع تیمار شوری، محلول‌پاشی برگی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در پنج سطح (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر) انجام شد. لازم به ذکر است که پودر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم از کمپانی SigmaAldrich با سایز ۲۵ نانومتر و  $M=79/87 \text{ g/mol}$  خریداری شد. سوسپانسیون نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در آب، قبل از استفاده به مدت ۶۲۰ ثانیه به وسیله امواج اولتراسوند با قدرت ۹۰-۸۰ هرتز و دور ۱۰۰ سونیکیت شدند تا به راحتی قابل جذب برای گیاه باشد و از آگلوتینه شدن ذرات جلوگیری شود. بعد از گذشت ۱۰ روز از برگ تازه گیاهان هر تیمار نمونه برداری شد و در این نمونه‌ها، میزان رنگیزه‌ها، محتوای نسبی آب، میزان پراکسیداسیون لیپیدی، میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به شرح زیر اندازه‌گیری شد. در پایان گیاهان گلدان‌ها برداشت و فوراً وزن تر گیاهان اندازه‌گیری شد و سپس به آن ۷۰ درجه سانتیگراد منتقل و وزن خشک گیاهچه تعیین شد.

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌ها بافت تازه پهنک برگ در هاون به کمک استون ۸۰٪ سائیده شد و پس از صاف کردن، جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد

ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پاسخ‌های دفاعی در گیاهان فعال می‌شوند که بهبود رشد و مقاومت به تنش القا شده توسط این نانوذرات را توجیه می‌کند (Tumburu et al., 2017). به هر حال، استفاده از نانوذرات در زمینه‌های کشاورزی هنوز در ابتدای راه است و مکانیسم عمل نانوذرات در بهبود تحمل گیاهان دارویی در شرایط تنش تا حد زیادی ناشناخته مانده است و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

از آنجایی که میزان تولید گیاهان دارویی و معطر در طبیعت کم است نیاز به کشت و زرع این گیاهان به شدت افزایش یافته است. اغلب زمین‌های حاصلخیز به تولید غذا، علوفه و فیبر و دیگر الزامات اختصاص یافته‌اند و علاقه برای کشت گیاهان دارویی در چنین زمین‌هایی وجود ندارد. لذا اراضی حاشیه‌ای به‌ویژه آن‌هایی که تحت تأثیر مسائل شوری هستند و تولید دیگر محصولات کشاورزی در آنها بازده خوبی ندارد می‌تواند به کشت چنین گیاهان ارزشمندی اختصاص یابد (Ines et al., 2008). لذا باید راهکارهایی برای افزایش تحمل گیاهان دارویی به شوری پیدا کرد. گیاه زنیان با نام علمی *Carum copticum* (L.) یکی از گیاهان دارویی متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) است که اسانس بذر آن مصارف دارویی، بهداشتی و صنعتی دارد. در طب مدرن به‌عنوان ضد عفونی‌کننده قوی، تقویت جهاز هاضمه و در مصرف خارجی به‌منظور درمان روماتیسم بکار می‌رود (دوازده امامی و مجنون حسینی، ۱۳۸۷). براساس اطلاعات فوق، در پژوهش حاضر اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد و تحمل شوری در گیاه زنیان بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

بذر گیاه زنیان از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری و در هر گلدان پرشده با خاک رسی و کود حیوانی، ۲۰ بذر کاشته شد. گیاهان در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد، تحت رطوبت نسبی ۵۷ درصد، دمای روز/ شب ۲۸ و ۲۰ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۸/۱۴ روز/ شب رشد کردند. در ابتدا برای جوانه‌زنی بذر و تا استقرار اولیه گیاهچه دو برگگی از آب

و سپس میزان کلروفیل  $a, b$  و کاروتنوئیدها طبق فرمول‌های پیشنهادی Lichtenthaler (۱۹۸۷) محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ‌ها، چند دیسک برگ از گیاهان هر گلدان برداشت شد و وزن تر آنها تعیین شد. سپس دیسک‌ها در آب دیونیزه برای ۷ ساعت شناور شدند و پس از تورژسانس کامل، وزن تورگر (TW) دیسک‌های برگ از اندازه‌گیری شد. وزن خشک آن (DW) بعد از خشک‌شدن دیسک‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد آن به مدت ۷۲ ساعت تعیین شد و با رابطه زیر درصد محتوای نسبی آب برگ‌ها محاسبه گردید (Lara, et al., 2003).

$$RWC = \frac{FW-DW}{TW-DW} \times 100 \quad (1)$$

اندازه‌گیری پرولین به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) با استفاده از معرف نین‌هیدرین انجام شد. از تولوئن به عنوان بلانک استفاده شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد، تعیین گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار پرولین برحسب گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردیدند (Bates et al., 1973).

برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)، ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرو استیک (TCA)، ۰/۱ درصد سائیده شد و با استفاده از تیوباربیتوریک (TBA) طی مراحل یک کمپلکس قرمز رنگ حاصل شد. شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت از ضریب خاموشی معادل  $155 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$  استفاده شد (Heath and Packer, 1968).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، بافت برگ در بافر استخراج، ساییده و سانتریفوژ شد و روشن‌آور حاصل، برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مطابق با روش ارائه‌شده توسط Vafadar و همکاران (2020) براساس تبدیل نیتروبلو تترازولیوم (NBT) به فورمازان در حضور نور و ظهور رنگ تخمین زده شد. یک واحد فعالیت

SOD، معادل مقدار آنزیمی که ۵۰ درصد احیای نوری NBT را ممانعت می‌کند، تعریف شد. برای اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی حاوی آنزیم، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۱۰۰ میکرولیتر آسکوربات و ۴/۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید داخل کوت ریخته شد و تغییرات جذب نوری محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر، در فواصل ۳۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم بر مبنای میزان مصرف  $\text{H}_2\text{O}_2$  در دقیقه و با ضریب خاموشی  $2/6 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$  برآورد شد (Nakano and Asada, 1981). در نهایت میزان فعالیت ویژه هر دو آنزیم براساس واحد آنزیم بر میلی‌گرم وزن تر محاسبه و بیان گردید.

این آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد اجرا شد. فاکتورها شامل: شوری در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در پنج سطح (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود. آنالیز واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۲۰ و مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel رسم شد.

### نتایج

وزن تر و وزن خشک زنیان: با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) اثر ساده شوری و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و نیز اثر برهمکنش شوری و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر وزن تر و خشک گیاه زنیان در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود.

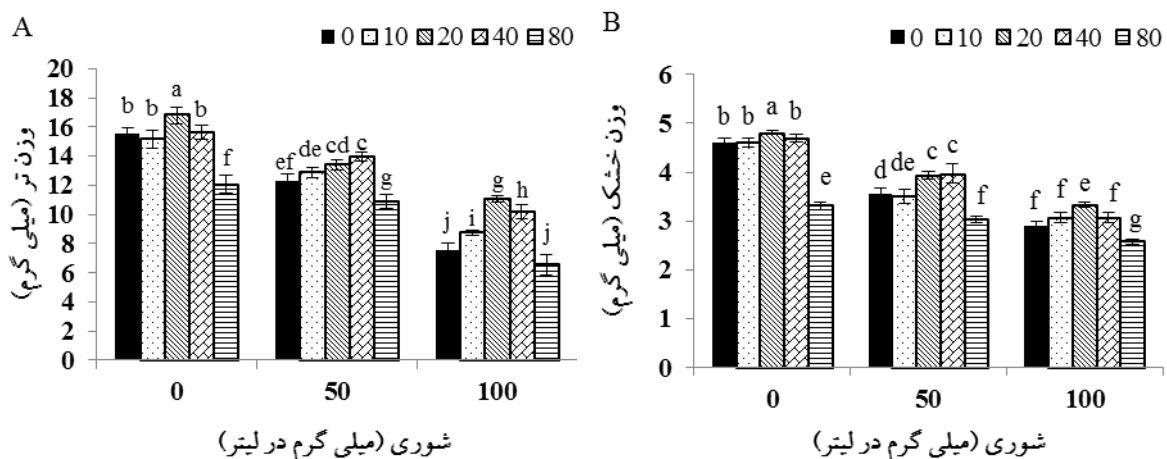
در شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر وزن تر گیاهچه به ترتیب ۱۵/۷۰٪ و ۴۱/۵۱٪ و وزن خشک گیاهچه به ترتیب ۱۸/۴۱٪ و ۳۲/۲۷٪ کاهش یافت که نسبت به شاهد کاملاً معنی‌دار بود (شکل ۱).

در شرایط عدم شوری، وزن تر و خشک گیاهچه، فقط با کاربرد غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم افزایش و با محلول‌پاشی غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۱). در شوری ۵۰ و

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و تنش شوری بر وزن تر و خشک گیاهچه و رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ گیاه زنیان

درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>	کاروتنوئید
شوری	۱۴۸/۸۹**	۷/۵۶**	۴/۷۱**	۱/۸**	۱۱/۳۶**
نانوذرات	۲۱/۰۰**	۱/۵۰**	۰/۶۵**	۰/۷۲**	۱/۳۱**
شوری × نانوذرات	۱/۴۹**	۰/۱۵**	۰/۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۳*	۰/۴۱**
خطا	۰/۱۴	۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۳
ضریب تغییرات	۳/۰۷	۳/۶۵	۶/۰۷	۶/۶۵	۷/۲۹

ns، \* و \*\* به ترتیب عدم معنی داری و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد



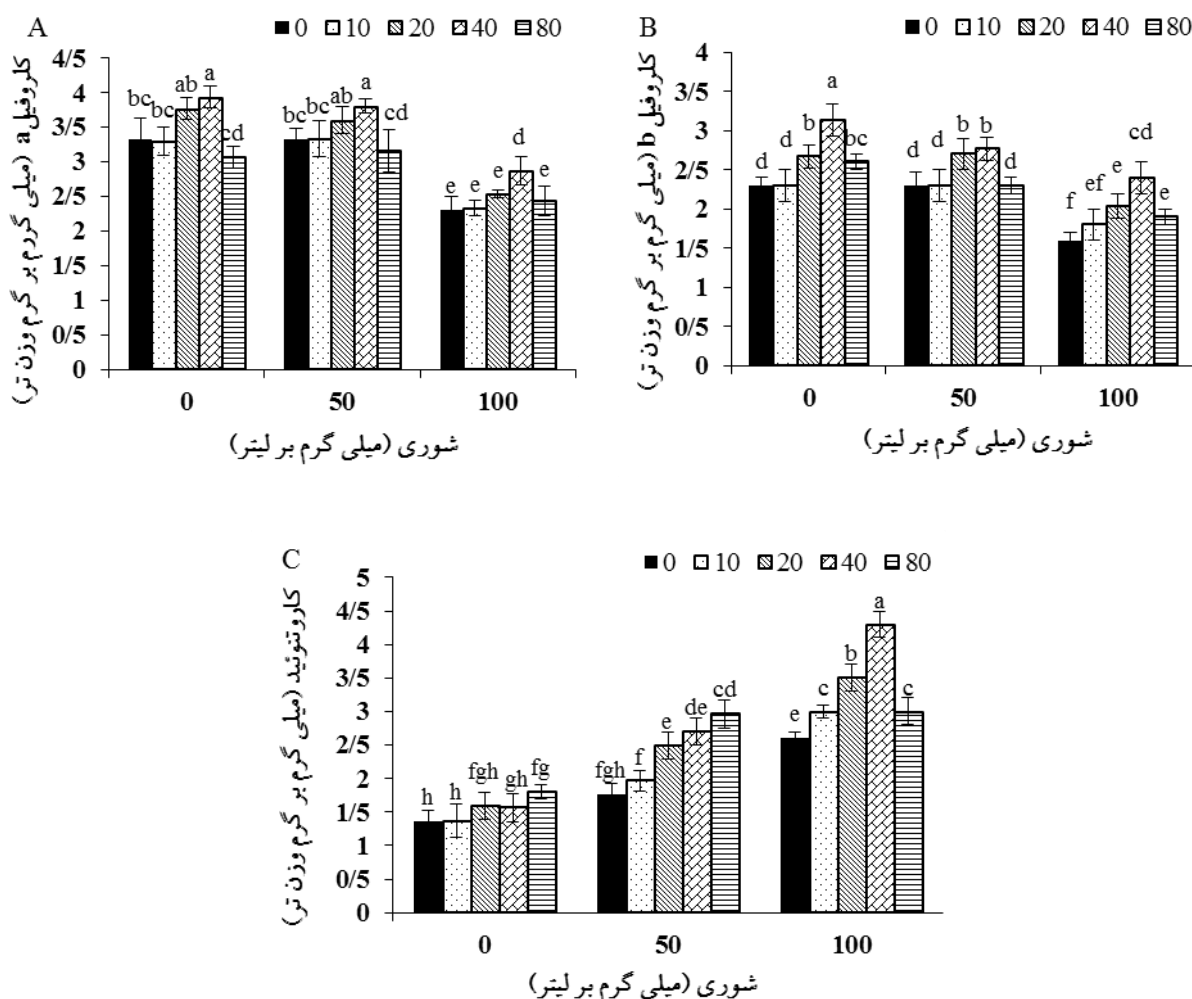
شکل ۱- اثر تنش شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر) بر وزن تر (A) و خشک (B) گیاه زنیان. ستون‌های دارای حروف مشترک بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با هم ندارند.

۲۵/۳۸٪ کاهش و محتوای کاروتنوئید ۵۳/۰۴٪ افزایش یافت (شکل ۲).

نتایج نشان داد در شرایط بدون شوری و نیز در حضور ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سدیم کلرید، فقط غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، باعث افزایش معنی دار محتوای کلروفیل *a* نسبت به شاهد هر گروه شد (شکل ۲A). چون پاسخ به نانوذرات در همه سطوح شوری مشابه بود، همانطور که نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان داد اثر برهمکنش شوری و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کلروفیل *a* معنی دار نشد.

۱۰۰ میلی گرم بر لیتر کلرید سدیم، وزن تر و خشک با کاربرد غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در حد معنی داری نسبت به شاهد این گروه‌ها افزایش و در مقابل با کاربرد ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در حد معنی داری (به استثنای وزن تر در شوری ۱۰۰) نسبت به شاهد این گروه‌ها کاهش یافت (شکل ۱).

رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ زنیان: در شوری ۵۰ میلی گرم بر لیتر، تغییرات محتوای کلروفیل *a* و *b* و کاروتنوئیدها نسبت به شاهد بدون شوری، معنی دار نبود. اما در شوری ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر محتوای کلروفیل *a* و *b* به ترتیب ۲۸/۴۴٪ و



شکل ۲- اثر تنش شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر) بر محتوای کلروفیل *a* (A) کلروفیل *b* (B) و کاروتنوئید (C) در برگ زینان. ستون‌های دارای حروف مشترک بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با هم ندارند.

در شرایط بدون شوری فقط غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث افزایش معنی دار محتوای کاروتنوئید نسبت به شاهد شد (شکل ۲C). در حضور ۵۰ میلی گرم در لیتر کلرید سدیم، بیشترین محتوای کاروتنوئید با کاربرد غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدست آمد. اما در شوری ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، محتوای کاروتنوئید غلظت ۸۰ کمتر از غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بود.

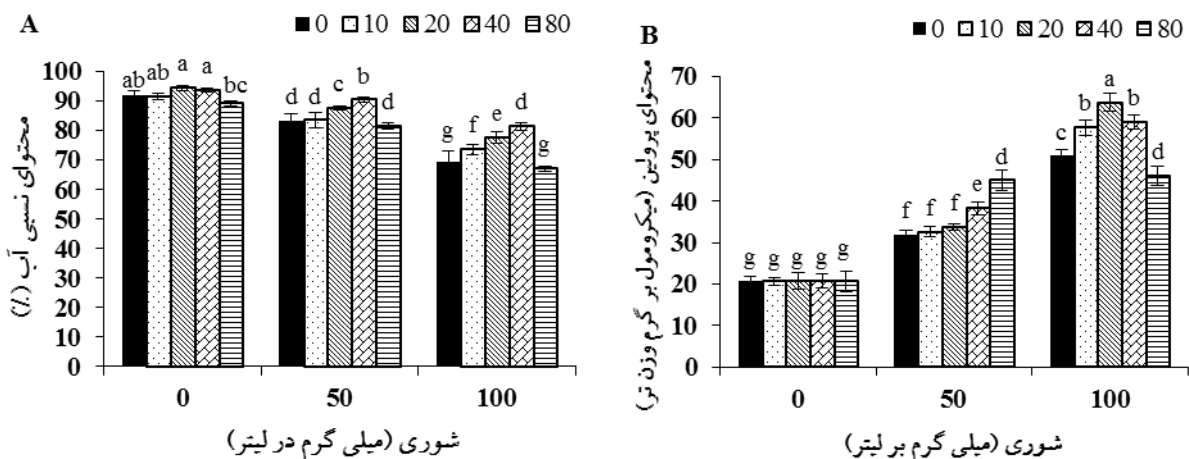
پرویلین و محتوای آب برگ: با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) اثر شوری و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اثر برهمکنش آنها بر محتوای نسبی آب و محتوای پرویلین برگ

بیشترین مقدار کلروفیل *b* تحت ترکیب تیمار بدون شوری × ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بدست آمد، در حالی که کمترین مقدار آن در ترکیب تیمار شوری ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر × عدم کاربرد نانوذره دی اکسید تیتانیوم بدست آمد. در کل بیشترین محتوای کلروفیل *b* در شرایط بدون شوری و در شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر با کاربرد غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بدست آمد و با کاربرد غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم محتوای کلروفیل *b* نسبت به غلظت‌های ۲۰، ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات در همه سطوح شوری کمتر بود (شکل ۲B).

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و تنش شوری بر محتوای نسبی آب (RWC)، محتوای پرولین، محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ زنیان

درجه آزادی	RWC	پرولین	MDA	SOD	APX
شوری	۵۷۸/۶۹**	۴۵۳/۴۳**	۳۹۲/۰۱**	۴۶۵/۴۴**	۴۶۳/۴۴**
نانوذرات	۱۲۴/۶۸**	۳۷/۶۳**	۳۷/۳۸**	۵۷۶/۶۰**	۹۲/۶۸**
شوری × نانوذرات	۱۴/۳۷*	۹۹/۳۲**	۵/۸۵**	۱۴۱/۷۴**	۳۷/۳۱**
خطا	۳/۰۴	۳/۱۱	۰/۵۹	۱/۵۰	۰/۸۸
ضریب تغییرات	۲/۰۸	۴/۷۱	۵/۲۷	۴/۶۶	۷/۵۰

\*\* و \* معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد



شکل ۳- اثر تنش شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) بر محتوای نسبی آب (A) و محتوای پرولین (B) در برگ زنیان. ستون‌های دارای حروف مشترک بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

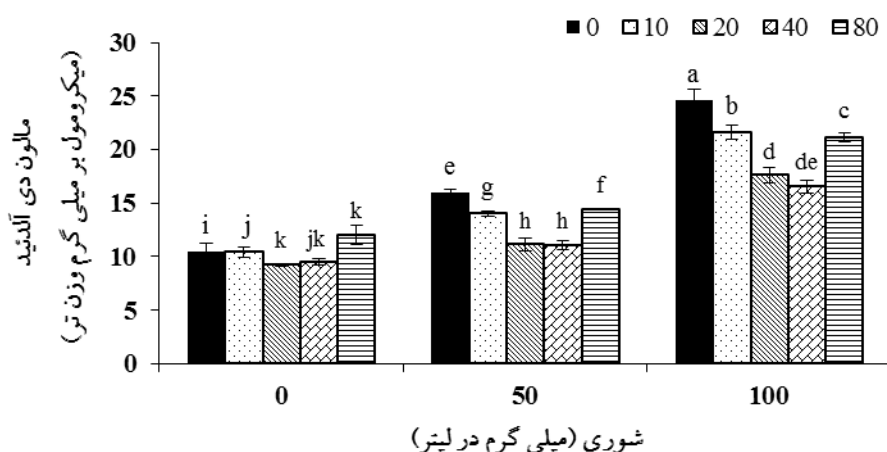
نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، افزایش معنی‌داری در محتوای نسبی آب نسبت به شاهد هر گروه مشاهده گردید ولی کاربرد غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، تفاوت معنی‌داری در محتوای نسبی آب نسبت به شاهد گروه خود ایجاد نکرد (شکل ۳A).

در حضور ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرید سدیم، محلول‌پاشی ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، باعث افزایش معنی‌دار (به ترتیب ۱۶/۸۰٪ و ۲۹/۲۰٪) محتوای پرولین نسبت به شاهد گروه خود گردید (شکل ۳B). در شوری ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم کلرید، محلول‌پاشی ۱۰، ۲۰ و ۴۰

گیاه زنیان در سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد معنی‌دار بود.

در شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرید سدیم، محتوای نسبی آب به ترتیب ۷/۴۳٪ و ۱۹/۸۶٪ کاهش (شکل ۳A) و محتوای پرولین ۱۶/۸۰٪ و ۲۹/۲۰٪ افزایش یافت (شکل ۳B) که این تغییرات نسبت به شاهد کاملاً معنی‌دار بود.

در شرایط بدون شوری، کاربرد هیچ کدام از غلظت‌های نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تفاوت معنی‌داری در محتوای نسبی آب (شکل ۳A) و محتوای پرولین (شکل ۳B) نسبت به شاهد این گروه ایجاد نکرد. در شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلرید سدیم، با کاربرد غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر



شکل ۴- اثر تنش شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر) بر محتوای مالون دی آلدئید (MDA) در برگ زنیان. ستون‌های دارای حروف مشترک بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در حضور شوری ۵۰ میلی گرم بر لیتر ۱۱/۳۰٪ و ۷۳/۳۰٪ و در شوری ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر ۳۳/۲۸٪ و ۶۸/۳۲٪ محتوای مالون دی آلدئید را نسبت به شاهد هر گروه کاهش داد. به هر حال در هر دو سطح شوری با کاربرد غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم محتوای مالون دی آلدئید، بطور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم اما کمتر از شاهد هر گروه بود (شکل ۴).

**فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی:** نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر ساده شوری و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نیز اثر برهمکنش شوری در نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان APX و SOD در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با افزایش سطح شوری، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان APX و SOD در حد معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت اما فعالیت APX در سطح شوری ۱۰۰ کمتر از ۵۰ میلی گرم بر لیتر بود (شکل ۵).

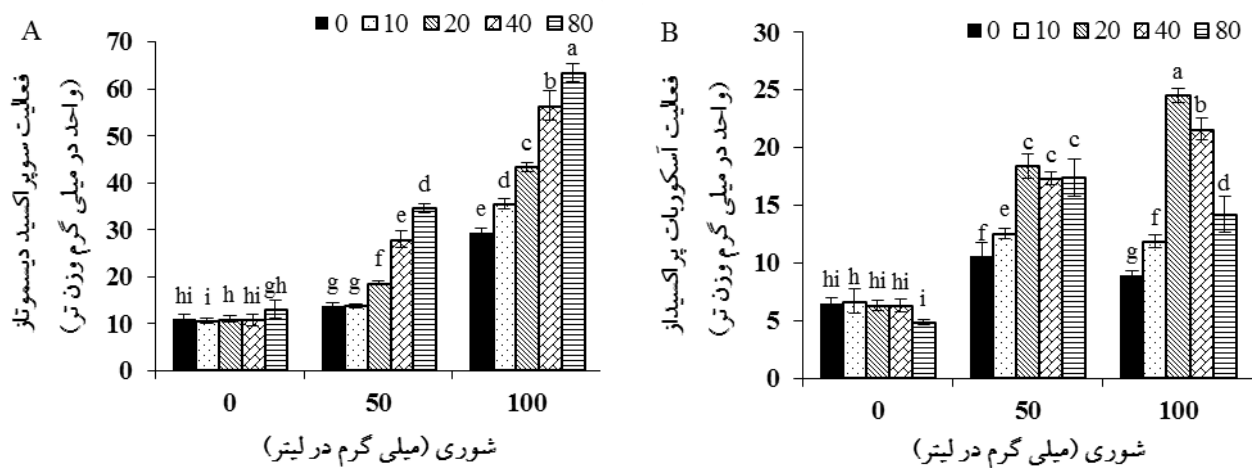
در شرایط بدون شوری هیچ‌کدام از غلظت‌های نانوذرات دی اکسید تیتانیوم تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX و SOD نسبت به شاهد این گروه ایجاد نکردند (شکل ۵). در حضور ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم کلرید، کاربرد

میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث افزایش معنی‌دار (به ترتیب ۷۹/۱۱٪، ۱۵/۲۰٪ و ۸۴/۱۳٪) در محتوای پرولین نسبت به شاهد گروه خود شدند و محلول‌پاشی ۸۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث کاهش معنی‌دار محتوای پرولین (۴۴/۹٪) نسبت به شاهد گروه خود شد (شکل ۳B).

**محتوای مالون دی آلدئید:** با توجه به نتایج آنالیز واریانس اثر ساده شوری و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و نیز اثر برهمکنش شوری و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر محتوای مالون دی آلدئید گیاه زنیان در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین نشان داد در شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر، محتوای مالون دی آلدئید نسبت به شاهد به ترتیب ۳۹/۲۲٪ و ۰۹/۴۹٪ افزایش یافت (شکل ۴).

بررسی اثر برهمکنش شوری و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم نشان داد که در تمام سطوح شوری، محلول‌پاشی ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث کاهش معنی‌دار محتوای مالون دی آلدئید نسبت به شاهد گروه خود شد (شکل ۴). در حضور شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر سدیم کلرید، بیشترین کاهش در محتوای مالون دی آلدئید نسبت به شاهد هر گروه با کاربرد ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مشاهده گردید. اسپری ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر





شکل ۵- اثر تنش شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) و غلظت نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ میلی گرم در لیتر) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (A) و آسکوربات پراکسیداز (B) در برگ زنیان. ستون‌های دارای حروف مشترک بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری با هم ندارند.

خشک گلخانه و همچنین آبیاری مکرر با آب شور و عدم خروج آب از گلدان، احتمالاً تجمع نمک در خاک رخ داده است و عملاً گیاه با سطح شوری بالاتر از این غلظت اسمی مواجه بوده است. علاوه بر این، چون شوری در مراحل اولیه استقرار گیاهچه اعمال شده است، گیاه در این مرحله حساسیت زیادی نسبت به این سطح شوری ملایم نشان داده است. شوری، تنش اسمزی را بر گیاه تحمیل می‌کند که سبب کاهش جذب آب و آسیب سیستم ریشه می‌شود که احتمالاً همین موضوع باعث کاهش وزن تر گیاه می‌شود. علاوه بر این شوری موجب تجمع یون‌های سمی و کمبود عناصر غذایی نیز می‌شود که همین اثر منجر به ایجاد تغییراتی در متابولیسم و در نهایت باعث کاهش وزن خشک گیاه می‌شود (Yang and Guo, 2018).

محلول‌پاشی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در شرایط نرمال و نیز تحت تنش شوری موجب افزایش وزن خشک و تر گیاه زنیان نسبت به شاهد شد (شکل ۱). بطور مشابهی، حقیقی و دانشمند (۱۳۹۲) هم گزارش کردند که تیتانیوم وزن خشک و وزن تر اندام‌های هوایی گیاه گوجه‌فرنگی را از طریق افزایش جذب و بهره‌وری عناصر و بهبود فتوسنتز گیاه افزایش داد. در پژوهش‌های قبلی گزارش شده است که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم از طریق تأثیرشان بر بهبود جذب نور و فعالیت آنزیم

غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD نسبت به شاهد گروه خود شد که بیشترین افزایش مربوط به کاربرد ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بوده است (شکل ۵A). در حضور شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سدیم کلرید، کاربرد تمام غلظت‌های نانوذرات دی اکسید تیتانیوم افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX نسبت به شاهد گروه خود ایجاد کرد و بیشترین افزایش با کاربرد غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات حاصل شد.

#### بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که آبیاری مکرر با آب شور با غلظت ملایم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم کلرید، بطور معنی‌داری میزان وزن تر و خشک گیاهچه زنیان را نسبت به شاهد کاهش داد (شکل ۱). Abdoli و همکاران (۲۰۲۰) هم گزارش کردند که با افزایش غلظت شوری از ۴ به ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، زیست‌توده ریشه و بخش هوایی گیاه زنیان کاهش یافت. لازم به یادآوری است که علی‌رغم اینکه شوری آب آبیاری مورد استفاده در پژوهش حاضر خیلی کمتر از شوری بکار برده شده توسط پژوهشگران فوق بوده است، با توجه به رسی بودن خاک و تبخیر بالا در شرایط نسبتاً گرم و

مشاهدات Young و Hong (۲۰۰۶) نشان داد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به دلیل اثرشان بر افزایش جذب و متابولیسم نیتروژن، میزان سنتز کلروفیل در گیاه اسفناج را افزایش دادند.

این یافته که تیمار شوری، محتوای نسبی آب برگ گیاه زنیان را کاهش داد (شکل ۳A) نشان می‌دهد که شوری، تنش اسمزی را بر گیاه تحمیل می‌کند که سبب کاهش جذب آب توسط سیستم ریشه و انتقال آن به برگ می‌شود. در پاسخ به کاهش محتوای نسبی آب برگ ناشی از تنش شوری، محتوای پرولین در برگ زنیان افزایش یافت که با یافته‌های Abdoli و همکاران (۲۰۲۰) درباره زنیان مطابقت داشت. پرولین یک اسمولیت سازگار است که حلالیت بالایی در آب دارد و در غلظت بالا، بدون اثر منفی بر روی ماکرومولکول‌ها، موجب حفظ پتانسیل اسمزی سلول و استمرار جذب آب تحت تنش شوری می‌شود. علاوه بر این تجمع پرولین تحت تنش شوری نقش مهمی در تنظیم ردوکس سلولی و خنثی کردن ROS ایفا می‌کند (Hayat et al., 2012). احتمالاً افزایش تجمع پرولین در گیاهان زنیان تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم تحت تنش شوری (شکل ۳B) مکانیسمی است که به غلبه بر تنش اسمزی ناشی از شوری کمک کرده است و عامل افزایش محتوای نسبی آب (شکل ۳A) در گیاهان زنیان تحت تنش شوری بوده است. بطور مشابهی اثر مثبت نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر افزایش محتوای پرولین در گوجه‌فرنگی (Khan, 2016)، جو (Karami and Sepehri, 2018) و باقلا (Abdel Latef et al., 2018) تحت تنش شوری نیز گزارش شده است. افزایش محتوای مالون دی‌آلدئید در برگ گیاه زنیان تحت تنش شوری (شکل ۴) نشان داد که شوری علاوه بر تنش اسمزی، تنش اکسیداتیو هم ایجاد کرده است. احتمالاً کاهش کلروفیل (شکل ۲A) تحت تنش شوری موجب انحراف الکترون از زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی شده و الکترون به اکسیژن منتقل شده و رادیکال‌های اکسیژنی (ROS) تولید شده است و واکنش ROS با لیپیدهای غشاهای سلولی منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشا و تولید محصولات تخریبی غشا، مانند مالون دی‌آلدئید شده است. بطور مشابهی گزارش

رویسکو (Mingyu et al., 2007) و همچنین اثر بر افزایش جذب نیترات (Yang and Hong, 2006) رشد گیاه را بهبود می‌دهند.

در این مطالعه محتوای کلروفیل  $a$ ,  $b$  و کاروتنوئیدها در شوری ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نداشت اما با افزایش غلظت شوری به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، محتوای کلروفیل  $a$ ,  $b$  کاهش ولی محتوای کاروتنوئید افزایش یافت (شکل ۱). میرزایی و همکاران (۱۳۹۲) نیز اعلام کردند که تنش شوری ایجاد شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، به‌طور معنی‌داری محتوای کلروفیل را در برگ زنیان کاهش داد. نتایج مشابه در یونجه تحت تنش شوری نیز گزارش شده است (عموآقایی و نیک‌اندیش، ۱۳۹۴). تنش شوری ممکن است باعث جلوگیری از سنتز کلروفیل و یا موجب تخریب کلروفیل و آسیب‌پذیری کمپلکس‌های پروتئین-رنگدانه شود. کاهش در سنتز کلروفیل  $a$  و  $b$  ممکن است به دلیل تأثیر شوری بر ایجاد اختلال در جذب یون‌های لازم در مسیر سنتز کلروفیل مانند یون‌های منیزیم و آهن رخ دهد (Munns and Tester, 2008). در این پژوهش، محلول‌پاشی با غلظت مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) موجب افزایش کلروفیل  $a$  و  $b$  و کاروتنوئیدها (شکل C-۲A) در شرایط نرمال و تحت تنش شوری شد. کاروتنوئیدها علاوه بر کمک به جذب نور برای فتوسنتز، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان مؤثر در حفاظت کلروفیل در مقابل صدمات رادیکال‌های اکسیژن فعال در کلروپلاست‌ها نقش دارند. بنابراین افزایش آنها تحت شرایط تنش، در حفاظت کلروپلاست از فرآیندهای مخرب فتوشیمیایی و پایداری کلروفیل‌ها نقش دارد (Havaux, 1998). اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر افزایش کلروفیل  $a$  و  $b$  در گیاه کلزا (Li et al., 2015) در شرایط بدون تنش و بر میزان کلروفیل  $a$ ,  $b$  و کاروتنوئید در گیاه باقلا (Abdel Latef et al., 2018) تحت تنش شوری نیز گزارش شده است. احتمالاً تأثیر مثبت تیتانیوم در جذب عناصری مانند روی و آهن که در سنتز کلروفیل نقش دارند موجب افزایش کلروفیل در گیاهان می‌شود.

شده است که شوری میزان کلروفیل و تمامیت و پایداری غشا را در یونجه تحت تنش شوری کاهش داد (عموآقایی و نیک‌اندیش، ۱۳۹۴). بر طبق نتایج این پژوهش، در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از شوری، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD و APX در گیاه زنیان افزایش یافت (شکل ۵). این نتایج با یافته‌های Razavizadeh و همکاران (۲۰۱۷) درباره زنیان مشابهت دارد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش شوری در یونجه (Amooaghaie and Tabatabaei, 2017) و نخود (Khadabakhsh et al., 2014) نیز گزارش شده است. به هر حال با کاربرد غلظت مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، محتوای مالون دی‌آلدئید در هر دو سطح شوری کاهش یافت (شکل ۴). احتمالاً به دلیل آنکه محلول‌پاشی با غلظت مناسب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر گیاه زنیان تحت تنش شوری باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و APX شد (شکل ۵) و پاکروبی ROS به‌وسیله این آنزیم‌ها، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را کاهش داد. Khan (۲۰۱۶) نیز گزارش کرد که تحت تنش شوری میزان تجمع ROS در گیاه گوجه‌فرنگی زیاد شد و با محلول‌پاشی غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و APX افزایش یافت که در نتیجه تنش اکسیداتیو کاهش یافت و از آثار منفی شوری بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی کاسته شد. نتایج مشابه در گیاه جو (Karami and Sepehri, 2018) و باقلا (Abdel Latef et al., 2018) تحت تنش شوری نیز گزارش شده است. پیشنهاد شده است که ماهیت ویژه نانوذرات بر سطح تولید پراکسید هیدروژن در سلول تأثیر می‌گذارد و پراکسید هیدروژن یک مولکول پیام‌رسان است که در غلظت کم بر سطح بیان ژن و فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اثر می‌گذارد (Tumburu et al., 2017).

بطور جالبی نتایج این مطالعه نشان داد که محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بر گیاه زنیان تحت تنش شوری باعث افزایش چشمگیر میزان مالون دی‌آلدئید (شکل ۴)، پرولین (شکل ۳B) و تشدید

فعالیت آنزیم SOD (شکل ۵A) اما کاهش فعالیت APX (شکل ۵B) شد. اما وزن تر و خشک گیاه (شکل ۱)، میزان کلروفیل برگ (شکل ۲A) و محتوای نسبی آب (شکل ۳A) در این غلظت نسبت به تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کمتر بود و در اغلب موارد با شاهد هر گروه تفاوت معنی‌داری نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در غلظت ۸۰ میلی‌گرم، خود به‌عنوان یک تنش عمل کرده و موجب تشدید تنش اکسیداتیو در شرایط شوری شده است، بطوری‌که تجمع مالون دی‌آلدئید در این غلظت (شکل ۴) را افزایش داده است. علیرغم اینکه گیاه در معرض قرار گرفته با غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر، تا حدی فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی را تشدید نموده و پرولین و فعالیت آنزیم SOD را افزایش داده است (شکل ۵A) اما نتوانسته تنش حاصل از شوری و غلظت زیاد نانوذرات را مهار کند و تشدید اثر اکسیداتیو به‌وسیله نانوذرات، حتی به خود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل APX نیز آسیب رسانیده است و از فعالیت این آنزیم کاسته است (شکل ۵B). به‌طور مشابهی Song و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که تیمار با غلظت کم نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، میزان مالون دی‌آلدئید را کاهش و فعالیت CAT، SOD و APX را افزایش داد و رشد عدسک آبی را تقویت کرد. اما در غلظت بالای نانوذرات، پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را کاهش داد و باعث کاهش رشد گیاه عدسک آبی شد. نتایج مشابهی با کاربرد غلظت کم و زیاد نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر روی دانه‌های پیاز گزارش شده است (Laware and Raskar, 2010). Ghosh و همکاران (۲۰۱۰) معتقدند که غلظت بالای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم باعث آگلوتینه‌شدن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌شود که جذب و نفوذ نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در گیاه را کاهش می‌دهند. به هر حال با توجه به اینکه در این پژوهش نانوذرات کاملاً سوسپانسه شدند و روی برگ محلول‌پاشی شدند، این احتمال ضعیف است و به‌نظر می‌رسد میزان زیاد فلز تیتانیوم ره‌اشده از نانوذرات، و یا اندازه و ماهیت فیزیکوشیمیایی ویژه خود

نانوذرات در غلظت زیاد، به گونه‌ای است که ممکن است موجب راه‌اندازی تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود. اثر منفی غلظت بالای نانوذرات نقره بر رشد سیاهدانه (Amooaghaie et al., 2015) و بر افزایش محتوای کاروتنوئید و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در خردل سیاه (Amooaghaie et al., 2018) نیز به‌وسیله سایر پژوهشگران قبلاً گزارش شده است. در گندم و گوجه‌فرنگی تحت غلظت بالای نانوذرات روی و اکسید روی ثابت شده است که هم میزان زیاد یون‌های  $Zn^{2+}$  ره‌اشده از نانوذرات و هم ماهیت و خواص ویژه خود نانوذرات از عواملی هستند که موجب کاهش رشد و محتوای کلروفیل و تجمع پرولین و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان واکنش‌های دفاعی این گیاهان می‌شوند (Amooaghaie et al., 2017).

#### نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که حتی شوری ملایم (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در مراحل اولیه رشد گیاهچه زنیان، موجب کمبود دسترسی به آب به گیاه و در نتیجه کاهش محتوای نسبی آب برگ و نیز کاهش وزن تر گیاهچه شد. علاوه بر این، تنش شوری موجب القای تنش اکسیداتیو در گیاه شد به‌طوری‌که میزان پراکسیداسیون لیپید غشای سلول را در گیاه افزایش داد و همین اثر منجر به برهم ریختن ساختار غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست نیز شده و در نتیجه کاهش میزان کلروفیل  $a$  و  $b$  در گیاه شد. در پاسخ به تنش اسمزی و

#### منابع

- دوازده امامی، س. و مجنون حسینی، ن. (۱۳۷۸) زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه‌ای. انتشارات دانشگاه تهران.
- حقیقی، م. و دانشمند، ی. (۱۳۹۲) مقایسه اثر تیتانیوم و نانو تیتانیوم بر رشد و تغییرات فتوسنتز گوجه‌فرنگی در سیستم هیدروپونیک. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. ۷۳-۷۹.
- رنجبر، غ. و پیرسته انوشه، ه. (۱۳۹۴) نگاهی به تحقیقات شوری در ایران با تأکید بر بهبود تولید گیاهان زراعی. مجله علوم زراعی ایران ۱۷: ۱۶۵-۱۷۸.
- عموآقایی، ر. و نیک‌اندیش، ف. (۱۳۹۴) اثر تلقیح ریشه دو رقم یونجه با جدایه‌هایی از گونه‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول در شرایط تنش شوری. مجله زیست‌شناسی ایران. مجله پژوهش‌های گیاهی ۲۸: ۱۴۰-۱۵۲.

اکسیداتیو ناشی از شوری تجمع پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. محلول‌پاشی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، این مکانیسم‌های دفاعی را تقویت نمود. غلظت‌های مناسب آن (اغلب ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر)، باعث تشدید تجمع پرولین در گیاه و تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه شد و این اثر منجر به تعدیل تنش اکسیداتیو و در نتیجه بهبود محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها در گیاه و نهایتاً افزایش وزن تر و خشک گیاه شد. به هر حال غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، خود موجب نوعی تنش اکسیداتیو شد بطوری‌که میزان مالون دی‌آلدئید در این غلظت بیشتر بود و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل (APX)، در این غلظت افت کرد و محتوای کلروفیل و وزن تر و خشک گیاه نیز کاهش یافت. در کل بر مبنای اطلاعات این پژوهش می‌توان استفاده از غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم را برای افزایش تحمل تنش شوری در این گیاه توصیه کرد. هر چند که لازم است این پژوهش در شرایط مزرعه با سطوح بالاتر شوری و با ژنوتیپ‌های بیشتری از این گیاه نیز تکرار شود و از کاربرد غلظت‌های زیاد نانوذرات بر گیاهان باید پرهیز شود.

#### تقدیر و تشکر

بدی‌نوسیده از دانشگاه شهرکرد برای پشتیبانی مالی و در اختیار گذاشتن گلخانه و سایر تجهیزات برای اجرای عملیات آزمایشگاهی تقدیر می‌شود.

قربانی، ر.، موافقی، ع.، گنجعلی، ع. و نباتی، ج. (۱۴۰۰) تأثیر نانوذرات دی-اکسید تیتانیوم بر برخی ویژگی‌های موفولوژیکی نخود تحت شرایط تنش خشکی. تنش‌های محیطی در علوم زراعی. جلد ۱۴: ۹۸-۵۸.

میرزایی، س.، رحیمی، ا.، دشتی، ح. و مداح حسینی، ش. (۱۳۹۲) اثر اصلاحی کلسیم و پتاسیم بر محتوای پرولین، کلروفیل، پروتئین و رشد گیاه دارویی زینان (*Carum copticum*) تحت شوری. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۹: ۲۶۰-۲۴۷.

- Abdel Latef, A. A., Srialhvi vastava, A. K., AbdElsadek, M., Kordrostami, M. and Phan Tran, L. S. (2018) Titanium dioxide nanoparticles improve growth and enhance tolerance of broad bean plants under saline soil conditions. *Land Degradation and Development* 29: 1065-1073.
- Abdoli, S., Ghassemi-Golezani, K. and Alizadeh-Salteh, S. (2020) Responses of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) to exogenous salicylic acid and iron oxide nanoparticles under salt stress. *Environmental Science and Pollution Research* 1-15.
- Razavizadeh, R., Adebavazeh, F. and Rezaee Chermahini, M. (2017) Adaptive responses of *Carum copticum* to *in vitro* salt stress. *International Journal of Agricultural and Biosystems* 11: 37-42.
- Amooaghaie, R., Saeri, M. R. and Azizi, M. (2015) Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 120: 400-480.
- Amooaghaie, R. and Tabatabaei, F. (2017) Osmopriming-induced salt tolerance during seed germination of alfalfa most likely mediates through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling and upregulation of heme oxygenase. *Protoplasma* 254: 1791-1803.
- Amooaghaie, R., Norouz, M. and Saeri, M. (2017) Impact of zinc and zinc oxide nanoparticles on the physiological and biochemical processes in tomato and wheat. *Botany* 95: 441-445.
- Amooaghaie, R., Tabatabaei, F. and Ahadi, A. (2018) Alterations in *HO-1* expression, heme oxygenase activity and endogenous NO homeostasis modulate antioxidant responses of *Brassica nigra* against nano silver toxicity. *Journal Plant Physiology* 228: 75-84.
- Bates, L. S., Waldran, R. P. and Teare, I. D. (1973) 3. Rapid determination of free proline for water studies. *Plant and Soil* 39: 205-208.
- Chaudhary, I. J. and Sing, V. (2020) Titanium dioxide nanoparticles and its impact on growth, biomass and yield of agricultural crops under environmental stress: A review. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10: 1-8.
- Farooqui, A., Tabassum, H., Ahmad, A., Mabood, A., Ahmad, A. and Ahmad, I. Z. (2016) Role of nanoparticles in growth and development: A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 7: 22-37.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. and Mukherjee, A. (2010) Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81: 1253-1262.
- Ghorbannejad, H. and Amooaghaie, R. (2017) Differential changes of proline content and activities of antioxidant enzymes results in varied salt tolerance in canola genotypes. *Journal Genet Resour* 3: 36-46.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling and Behavior* 7: 1456-1466.
- Havaux, M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plantarum Science* 3: 147-151.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Ines, S., Ghnaya, T., Savoure, A. and Abdelly, Ch. (2008) Combined effects of long-term salinity and soil drying on growth, water relations, nutrient status and proline accumulation of *Sesuvium portulacastrum*. *Comptes Rendus Biologies* 331: 442-451.
- Karami, A. and Sepehri, A. (2018) Nano titanium dioxide and nitric oxide alleviate salt induced changes in seedling growth, physiological and photosynthesis attributes of barley. *Zemdirbyste* 105: 123-132.
- Khan, N. (2016) Nano-titanium dioxide (Nano-TiO<sub>2</sub>) mitigates NaCl stress by enhancing antioxidative enzymes and accumulation of compatible solutes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Plantarum Science* 11: 1-11.
- Khodabakhsh, F., Amooaghaie, R. and Mostajeran, A. (2014) Effect of hydro and osmo-priming on membrane deterioration, proline accumulation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes in two salt stressed chickpea cultivars. *Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ)* 13: 619-626.
- Laware, S. L. and Rasker, Sh. (2014) Effect of titanium dioxide nanoparticles on hydrolytic and antioxidant enzyme during seed germination in onion. *International Journal of current Microbiology and Applied Science* 3: 749-760.

- Lara, M. V., Disante, K. B., Podesta, F. E., Andreo, C. and Drincovich, M. F. (2003) Induction of a crassulacean acid like metabolism in the C<sub>4</sub> Succulent plant, *Portulaca oleracea* L. physiological changes are accompanied by specific modifications in phosphoenolpyruvate carboxylase. *Photosynthesis Research* 77: 241-254.
- Li, J., Shahbaz Naeem, M., Wang, X., Liu, L., Chen, Ch., Ma, N. and Zhang, Ch. (2015) Nano-TiO<sub>2</sub> is not phytotoxic as revealed by the oilseed rape growth and photosynthetic apparatus ultra-structural response. *PloS One* 10: e0143885.
- Lyu, Sh., Wei, X., Chen, J., Wang, C., Wang, X. and Pan, D. (2017) Titanium as a beneficial element for crop production. *Frontiers in Plant Science*. 8: Article 597.
- Mingyu, S., Hong, F., Liu, C., Wu, X., Liu, X. and Chen, L. (2007) Effects of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on absorption, distribution of light and photo reduction activities of chloroplast membrane of spinach. *Biological Trace Element Research* 118: 120-130.
- Munns, R. and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate- specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S. and Brestic, M. (2017) Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. *Frontiers in Chemistry* 5: 78.
- Saxena, R., Toma, R. S. and Kumar, M. (2016) Exploring nanobiotechnology to mitigate abiotic stress in crop plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 8: 974-980.
- Shah, T., Latif, S., Saeed, F., Ali, I., Ullah, S., Abdullah Alsahli, A., Jan, S. and Ahmad, P. (2021) Seed priming with titanium dioxide nanoparticles enhances seed vigor, leaf water status, and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Journal of King Saud University – Science* 33: 101207.
- Shi, H., Magaye, R., Castranova, V. and Zhao, J. (2013) Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* 10: 15.
- Song, G., Gao, F., Wu, H., Hou, W., Zhang, C. and Ma, H. (2012) Physiological effect of anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Lemna minor*. *Environmental Toxicology Chemistry* 31: 2147.
- Tumburu, L., Andersen, C. P., Rygielwicz, P. T. and Reichman, J. R. (2017) Molecular and physiological responses to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles in Arabidopsis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 71-82.
- Vafadar, F., Amooaghaie, R., Ehsanzadeh, P., Ghanati, F. and Sajed, R. (2020) Crosstalk between melatonin and Ca<sup>2+</sup>/CaM evokes systemic salt tolerance in *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of Plant Physiology* 252: 153237.
- Yang, F. and Hong, S. (2006) Influence of nano anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research* 110: 179-190.
- Yang, Y. and Guo, Y. (2018) Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist* 217: 523-539.

## Impact of nano-TiO<sub>2</sub> on salt stress tolerance of *Carum copticum*

R. Amooaghaie\* , M. majidi and S. Farhadian

Biology Department, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(Received: 13/07/2021, Accepted: 18/12/2021)

### Abstract

Soil and water salinity in semi-arid regions such as Iran have been important threats for plant growth and agriculture. It has been demonstrated that TiO<sub>2</sub> nanoparticles can improve plant growth and increase stress tolerance in plants. Therefore, in this study, a pot experiment was conducted as factorial with completely randomized design to evaluate the effect of 3 levels of salinity (0, 50, 100 mg/L NaCl) and 5 levels nano- TiO<sub>2</sub> (0, 10, 20, 40, 80 mg/L) on ajowan (*Carum copticum*). Results showed that with increasing salt concentration, fresh and dry weight of roots and shoots, content of chlorophyll *a*, *b* and relative water content (RWC) significantly reduced, but content of malon dialdehyde, carotenoids, proline content and the activities of SOD and APX increased in leaves. Foliar spray of nano- TiO<sub>2</sub> concentrations influenced all the above mentioned parameters in a dose-dependent manner. Foliar spray with suitable nano- TiO<sub>2</sub> concentrations (often 20 and 40 mg/L) improved plant growth, content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids, RWC, proline accumulation as well as the activities of SOD and APX whereas it reduced lipid peroxidation level. Impact of 80 mg/L nano- TiO<sub>2</sub> on growth parameters and photosynthetic pigments contents was less than 20 and 40 mg/L and significantly increased lipid peroxidation under both normal and salinity stress conditions. In conclusion, it can be said that appropriate nano-TiO<sub>2</sub> concentrations protected ajowan against salt –induced osmotic- and oxidative stresses through increasing proline accumulation and enhancing the activities of antioxidant enzymes

**Key words:** Antioxidant enzymes; Proline; Salinity stress; Chlorophyll, Relative water content

Corresponding author, Email: rayhanehamooaghaie@yahoo.com