

## بررسی اثر اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر ویژگی‌های فیتوشیمیایی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) در شرایط تنش کم آبی

سعیده رشیدی

گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۱۲/۰۶)

### چکیده

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) با داشتن ترکیباتی از جمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و تانن یکی از بهترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به شمار می‌رود. دانه گیاه سیاه‌دانه در طب سنتی بسیاری از کشورها جهت پیشگیری و درمان اختلالات و بیماری‌ها مصرف می‌شود. از آنجایی که تولید گیاهان دارویی می‌تواند تحت تأثیر عوامل محیطی مانند محدودیت آب قرار گیرد آزمایشی به منظور بررسی تأثیر اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط تنش خشکی بر ویژگی‌های فیتوشیمیایی از جمله درصد اسانس، میزان روغن، پروتئین برگ، گلوکز، فروکتوز، ساکاروز، پرولین، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز گیاه دارویی سیاه‌دانه، طی دو سال زراعی ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. این آزمایش به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تیمار در سه تکرار صورت گرفت. کرت اصلی شامل سه سطح آبیاری (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد آب قابل دسترس) و فاکتورهای فرعی شامل اسید فولیک (صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. نتایج نشان داد که اثر تیمارهای آبیاری، اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکز و پراکسیداز، اثر تیمارهای آبیاری بر محتوای پرولین و اثر تیمارهای آبیاری و اسید فولیک بر محتوای ساکاروز و فروکتوز معنی‌دار بود. در تیمار ۵۰٪ تنش خشکی، میزان کاتالاز (۴/۸۴ واحد میلی‌گرم بر پروتئین)، پراکسیداز (۲/۶۱ واحد میلی‌گرم بر پروتئین)، سوپراکسید دیسموتاز (۳/۶۱ واحد میلی‌گرم بر پروتئین)، پرولین (۱۶/۸۵ میلی‌گرم بر گرم)، گلوکز (۵۲/۶۱ میلی‌گرم بر گرم)، فروکتوز (۳۱/۰۸ میلی‌گرم بر گرم) و ساکارز (۹/۸۰ میلی‌گرم بر گرم) بالا رفت. در تیمار تنش خشکی ۵۰٪، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، بیشترین میزان گلوکز (۵۸/۲۶ میلی‌گرم بر گرم)، فروکتوز (۳۶/۰۹ میلی‌گرم بر گرم) و ساکارز (۱۲/۱۱ میلی‌گرم بر گرم) بدست آمد. همچنین نتایج نشان داد که تنش خشکی منجر به کاهش میزان اسانس، درصد روغن و پروتئین برگ گردید. بیشترین درصد اسانس، درصد روغن و پروتئین برگ با کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم با ۱۰۰ درصد آب قابل استفاده مشاهده گردید. بطور کلی براساس نتایج این آزمایش استفاده از کود اسید فولیک (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۲ میلی‌گرم در لیتر) به منظور کاهش اثرات تنش خشکی بر گیاه سیاه‌دانه پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، اسید فولیک، پراکسیداز، پرولین، فروکتوز، کاتالاز

## مقدمه

سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی یک ساله از خانواده آلاله است. سیاهدانه گیاهی گلدار و بومی منطقه جنوب غرب آسیا است و به دلیل داشتن ماده‌ای موسوم به تیموکوتین دارای اثر ضدنشنجی است (Ait Mbarek *et al.*, 2007).

خشکی یکی از مهمترین عوامل تنش‌زا بوده که تولید محصولات را در سطح جهانی کاهش می‌دهد. کشور ایران دارای اقلیم خشک و نیمه‌خشک است و میانگین بارندگی آن در حد یک سوم میانگین جهانی است، بنابراین با تنش‌های خشکی و خشکسالی‌های متناوبی درگیر است. خشکی یکی از مهمترین بازدارنده‌های تولید گیاهان در بسیاری از مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا به شمار می‌رود (Reddy *et al.*, 2004). کاهش آب در دسترس گیاهان باعث تغییر در فشار تورژسانس سلول‌های گیاهی شده و این موضوع به نوبه خود باعث کاهش رشد و گسترش سلول‌های برگ می‌شود (Sequera-Mutiozabal *et al.*, 2016). در شرایط تنش خشکی گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن، سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل تجمع می‌یابند. گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن، ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو کرده که منجر به خسارت‌های جدی به ساختارهای سلولی می‌شود. گونه‌های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القاء‌شده توسط تنش کم آبی دارند که می‌تواند از طریق بالابردن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش پیدا کند (Hosseini *et al.*, 2012).

افزایش مواد آلی و تأمین عناصر غذایی خاک به مقدار کافی نقش مهمی در تولید کمی و کیفی محصولات کشاورزی دارد. باید عناصر غذایی که توسط اندام‌های گیاهی از زمین خارج می‌شود، از طریق کودهای آلی و شیمیایی به زمین برگردانده شود. مواد هیومیکی شامل مخلوطی از ترکیبات آلی مختلف هستند که از باقیمانده گیاهان و حیوانات ایجاد شده‌اند (Maccarthy, 2001). اشکال مواد آلی در طبیعت ترکیبات هوموسی است. ترکیبات هوموسی مواد آلی دارای دو نوع اسید آلی مهم به نام‌های اسید هیومیک و اسید فولیک و جز هیومین

است. اسید فولیک از ترکیبات هیومیکی است که اثرات سودمند بسیاری در افزایش مقاومت به خشکی، بهبود جذب مواد مغذی و کاهش آبشویی کود دارد. اسید فولیک به عنوان یک ترکیب شبه‌هورمونی نقش بسزایی در افزایش جذب عناصر غذایی از طریق خاصیت کلات‌کنندگی و احیاکنندگی و در نتیجه بهبود رشد گیاه دارد (Zheng *et al.*, 2004; Nardi *et al.*, 2002). اسید فولیک ماده استخراجی قوی از اسید هیومیک است و فواید بسیار زیادی برای خاک و گیاهان دارد. اسید فولیک نقش مهمی در افزایش فعالیت آنزیم‌های گیاهی دارد. فواید اسید فولیک افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش، جذب بهتر مواد غذایی در گیاه و افزایش نفوذپذیری غشای سلولی است (Sebastiano *et al.*, 2005). از راهکارهای افزایش متابولیت ثانویه گیاهی، استفاده از محرک‌های زنده و غیرزنده‌ای است که می‌تواند مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آنها را افزایش دهد (Neuman *et al.*, 2009). یکی از محرک‌های مورد استفاده در این ارتباط نانو ذرات بوده که از این ذرات برای بالابردن ارزش محصولات کشاورزی و رفع مشکلات تنش‌های محیطی استفاده می‌شود (Reynolds, 2002). در بین نانوذرات، نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم کاربرد بیشتری دارد. برتری این ترکیب نسبت به سایر ذرات شامل مقاومت شیمیایی بالا، غیرسمی بودن آن، طول عمر بالای این ماده، در دسترس بودن و هزینه کم آن است (Sungkaworn *et al.*, 2007). اگر چه تیمار نانو ذرات تیتانیوم با توجه به نوع گیاه اثرات متفاوتی دارد ولی با بهینه‌سازی غلظت دی‌اکسید تیتانیوم برای گیاهان دارویی و معطر مختلف می‌توان کیفیت و تولید مواد مؤثره به ویژه اسانس را افزایش داد (Ahmad *et al.*, 2018). استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مناسب‌ترین و بهترین گزینه از لحاظ تحویل بهینه عنصر به مقصد مورد نظر و استفاده صحیح از آن است. در مقایسه با سایر نانو ذرات، دی‌اکسید تیتانیوم کارایی بیشتر و خطرات زیست‌محیطی کمتری دارد (Ullah *et al.*, 2020). Trevisan و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ترکیب‌های هیومیکی به دلیل فعالیت‌های هورمونی با افزایش وزن ریشه، بازدهی فتوشیمیایی

حجم آب استفاده شده یادداشت گردید. گیاهان سبز شده در چهار تا شش برگی تنک شدند. محلول پاشی اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم طی دو مرحله رشد (مرحله ساقه‌دهی و شروع گلدهی) انجام شد. مشخصات آب و هوایی منطقه مورد آزمایش در جدول ۱ و ویژگی‌های خاک در جدول ۲ آورده شده است.

**نحوه اعمال تیمار تنش خشکی:** برای اندازه‌گیری رطوبت ظرفیت زراعی (FC) پژمردگی (PWP) از روش مزرعه‌ای و صفحات تحت فشار (آزمایشگاهی) استفاده گردید. از این‌رو یک نمونه خاک مرکب برای اندازه‌گیری رطوبت مزرعه‌ای و تعیین منحنی رطوبتی خاک به آزمایشگاه فیزیک خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب ارسال شد با داشتن FC و PWP کم کردن آنها از یکدیگر میزان آب قابل استفاده (AW) خاک مشخص و بعد از طریق فرمول زیر میزان آب خالص محاسبه شد.

$$D = (FC - Mt) \times bd \times d / 100$$

D = عمق آب آبیاری به میلی‌متر، FC = رطوبت ظرفیت زراعی، MT = درصد رطوبت وزنی خاک قبل از آبیاری، D = عمق ریشه به میلی‌متر، bd = جرم مخصوص ظاهری گرم بر سانتی‌متر مکعب

با توجه به اعمال فاکتور آبیاری در سطوح (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) میزان درصد رطوبت حجمی و رطوبت خاک با دستگاه رطوبت‌سنج دستگاه اندازه‌گیری شد و وقتی رطوبت خاک به ترتیب در سطح ۵۰٪ آب قابل استفاده رطوبت حجمی به عدد ۶/۷۵٪ و سطح ۷۵٪ آب قابل دسترس رطوبت حجمی به عدد ۱۰/۱۲٪ و در سطح ۱۰۰٪ آب قابل استفاده درصد رطوبت حجمی به عدد ۱۳/۵٪ رسید، اقدام به آبیاری شد.

**اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز:** برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش Chance و Maehly (۱۹۹۵) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۶/۶، ۲۰ میکرولیتر پروتئین محلول نمونه و ۹۰ میکرولیتر گوئی‌کول ۱٪ به عنوان الکترون‌دهنده مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش در کووت ریخته و قبل از اندازه‌گیری سرعت

و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها باعث افزایش تحمل گیاه به تنش موجود خواهند شد. بر این اساس هدف از این پژوهش بررسی تأثیر اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر بهبود یا کاهش اثرهای منفی ناشی از تنش خشکی با توجه به صفات، گلوکز فروکتوز، ساکارز پرولین سوپراکسید دیسموتاز کاتالاز و پراکسیداز، درصد اسانس، میزان روغن پروتئین برگ در گیاه دارویی سیاه‌دانه است.

## مواد و روش‌ها

**طرح آزمایشی و تیمارها:** این آزمایش به صورت اسپلینت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. کرت‌های اصلی شامل تیمارهای تنش خشکی در سه سطح شامل آبیاری ۱۰۰٪ (W1)، آبیاری ۷۵٪ (W2) و آبیاری ۵۰٪ (W3) آب قابل دسترس گیاه بود که به وسیله دستگاه TDR مدل ۱۵۰ ساخت کمپانی آمریکا از نوع spectrum اندازه‌گیری انجام و کرت‌های فرعی شامل اسید فولیک در سه سطح صفر، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کرت فرعی شامل نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سه سطح صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. اسید فولیک در دو مرحله ساقه‌دهی و شروع گلدهی به صورت محلول پاشی برگ‌ی و محلول نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در دو مرحله ساقه‌دهی و شروع گلدهی استفاده شد. در ابتدا زمین آزمایش در زمستان سال ۱۴۰۰ و سال ۱۴۰۱ با گاوآهن شخم عمیق زده شد. در اول اسفندماه هر دو سال با عملیات دیسک‌زنی و کولتیواتورزنی زمین آزمایش برای کاشت آماده گردید. سپس توسط فاروئر پشته‌هایی به عرض ۳۰ سانتی‌متر ایجاد و زمین به صورت جوی و پشته آماده شد. هر بلوک شامل ۲۷ کرت با فاصله یک متر در نظر گرفته شد و هر کرت شامل شش خط کشت به طول ۵ متر با فاصله ۳۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. فاصله بلوک‌ها از یکدیگر ۱ متر بود. پس از آماده‌سازی زمین بذر سیاه‌دانه به صورت دستی در تاریخ ۲۵ فروردین‌ماه ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ کشت گردید و تا مرحله شش برگی آبیاری همه کرت‌ها بدون کاربرد تیمارهای تنش انجام شد و

جدول ۱- مشخصات آب و هوایی شاهرود در فصل زراعی ۱۴۰۰-۱۴۰۱

سال زراعی	ماه‌های سال	میانگین دمای ماهیانه (درجه سانتی‌گراد)	میانگین رطوبت ماهیانه (%)	بارش ماهیانه (میلی‌متر)
۱۴۰۰-۱۴۰۱	فروردین	۱۲/۴	۳۷	۱۴/۳
	اردیبهشت	۱۳/۳	۴۶	۱۴/۲
	خرداد	۲۱/۴	۲۸	۴/۲
	تیر	۲۴	۱۷	۰
	مرداد	۲۴	۱۸	۰
	شهریور	۲۱/۸	۲۱	۰
۱۴۰۱-۱۴۰۲	فروردین	۱۰/۷	۴۲	۲۴/۵
	اردیبهشت	۱۴/۸	۳۴	۸/۹
	خرداد	۲۱	۳۰	۴/۲
	تیر	۲۶/۲	۲۱	۰
	مرداد	۲۴	۲۲	۰
	شهریور	۲۲	۲۰	۰

منبع: اداره هواشناسی شاهرود

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

خصوصیات شیمیایی					خصوصیات فیزیکی	
پتاسیم (mg/kg)	فسفر (mg/kg)	نیتروژن (%)	PH	EC (dS/m)	۱۷ درصد رس، ۶۲ درصد سیلت و ۴۱ درصد شن	
۲۹۶	۷/۱	۰/۰۹	۷/۷۰	۱/۱	لومی‌رسی	

الکترون به مخلوط واکنش اضافه و مقدار جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل uv 1900 شیمادزو) اندازه‌گیری گردید. تغییرات آنزیمی بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان و با شاهد که همان مخلوط واکنش قبل از اضافه‌کردن پراکسید هیدروژن است مقایسه شد.

**اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از احیاء نوری نیتروبولوترازولیوم که اساس اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم است، اندازه‌گیری شد. بر اساس این روش ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۸/۷) متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبولو

واکنش، ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ به عنوان پذیرنده الکترون به مخلوط واکنش اضافه شد و مقدار جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری پراکسیداز:** سنجش فعالیت این آنزیم به روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸۱ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۶/۶، ۲۰ میکرولیتر پروتئین محلول نمونه و ۹۰ میکرولیتر گوئی‌کول ۱ به عنوان الکترون‌دهنده مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش در کووت ریخته و قبل از اندازه‌گیری سرعت واکنش، ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ به عنوان پذیرنده

از خشک شدن لوله‌ها مقدار نیتروژن نمونه با دستگاه کج‌دال خوانده شد. با اندازه‌گیری، میزان پروتین از حاصل ضرب درصد پروتین در ۶/۲۶ بدست آمد (قلی‌نژاد و رضایی، ۱۳۹۳).

#### اندازه‌گیری روغن: بوته‌ها پس از برداشت ابتدا خشک و

پس از عمل کوبیدن دانه‌ها جدا شدند. بعد از بوجاری دانه‌ها، برای تعیین درصد روغن از هر کرت ۳۰ گرم دانه آسیاب شده برداشته شد و سپس به وسیله دستگاه سوکسله به مدت شش ساعت تحت تأثیر آن-هگزان قرار گرفت. روش کار به این صورت بود که ۵ گرم نمونه را داخل کاغذ صافی وزن کرده و کاغذ صافی تا شده و داخل کارتوش قرار گرفت. سپس دستگاه سوکسله را بسته و جریان آب برقرار شد. در قسمت استخراج‌کننده دستگاه تا حدی حلال ریخته شد تا یکبار عمل تخلیه از استخراج‌کننده انجام شود. سپس زیر دستگاه روشن و به مدت شش ساعت تحت حرارت قرار گرفت. بعد از اتمام این زمان کاغذ صافی خارج و در داخل آون خشک شد. سپس با استفاده از معادله زیر درصد روغن محاسبه شد (Vaseghi and Davazdahemami, 2016).

#### اندازه‌گیری درصد اسانس: استخراج اسانس با روش

تقطیر و استفاده از دستگاه کلونجر انجام شد (خرمدل و همکاران، ۱۳۸۷).

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون LSD انجام شد و رسم جداول نیز با استفاده از Word انجام شد.

### نتایج

**محتوای آنزیم کاتالاز:** بر اساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری، اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و ۱ درصد بر محتوای آنزیم کاتالاز اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). در رابطه با اثرهای متقابل دوگانه نیز مشخص شد که اثر آبیاری × اسید فولیک و آبیاری × نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای آنزیم کاتالاز اثر معنی‌دار نشان دادند. بر

تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریوفلاوین ۲۰ میکرومولار، EDTA ۱/ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی واکنش تهیه شد و بعد نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در مقابل نور ۵۰۰۰ لوکس قرار داده شد. بی‌درنگ بعد از قطع نور، جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد (Giannopolities and Ries, 1977).

#### اندازه‌گیری پرولین: برای تعیین میزان غلظت پرولین یک

میلی‌لیتر از عصاره الکلی با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق و بعد ۵ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین (CHO) به آن اضافه شد. بعد از آن ۵ میلی‌لیتر اسید استیک کلاسیال به آن افزوده و بعد از به هم زدن به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از بیرون آوردن از حمام آب جوش و خنک شدن آنها، ۱۰ میلی‌لیتر بنزن به هر یک از نمونه‌ها افزوده و به شدت تکان داده شد تا پرولین وارد مرحله بنزن شود نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شدند، استانداردهایی از پرولین (صفر تا ۰/۱ میکرومول بر میلی‌لیتر) تهیه و در نهایت میزان جذب محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Bates et al., 1973).

#### اندازه‌گیری قندها: برای تعیین کل میزان قندهای محلول،

۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه شده یا استانداردها را برداشته و به آن ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و پس از خنک شدن نمونه‌ها جذب آنها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گلوکز خالص استفاده شد. غلظت‌های صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و نمونه‌های اصلی عملیات ممکن روی آنها انجام شد (Mc Cready et al., 1950).

#### اندازه‌گیری پروتئین: برای اندازه‌گیری میزان پروتئین، یک

گرم از نمونه برگی خشک شده در هاون چینی له شد. سپس در لوله آزمایش ریخته و به آن ۴ گرم کاتالیزور (۱۰ گرم سولفات پتاسیم + ۱ گرم سولفات مس) و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه و در دستگاه هضم کج‌دال به مدت یک ساعت در دمای ۲۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس دو و نیم ساعت در دمای ۳۹۵ درجه سلسیوس قرار داده و بعد

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر اسید فولیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بر صفات مورد بررسی گیاه دارویی سیاه دانه تحت تنش خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کاتالاز	پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز	پرولین
سال	۱	۰/۰۰۰۰ <sup>n.s</sup>	۱/۴۵ <sup>**</sup>	۰/۵۰۵ <sup>**</sup>	۲/۱۷ <sup>**</sup>
سال × بلوک	۴	۰/۰۱۵	۰/۴۰۷	۰/۲۲۹	۰/۰۱۵
آبیاری (A)	۲	۴۳/۵۸ <sup>**</sup>	۸/۷۱ <sup>**</sup>	۱۹/۶۷ <sup>**</sup>	۹۸۶/۷۳ <sup>**</sup>
فاکتور x سال	۲	۰/۰۰۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۳ <sup>n.s</sup>	۰/۰۲۰ <sup>n.s</sup>	۰/۵۱۸ <sup>*</sup>
بلوک x سال	۸	۰/۰۰۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۳ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۹ <sup>n.s</sup>	۰/۱۳۹ <sup>n.s</sup>
اسید فولیک (B)	۲	۱۴/۵۶ <sup>*</sup>	۸/۴۴۶ <sup>*</sup>	۷/۹۷ <sup>**</sup>	۷۹/۰۲ <sup>**</sup>
B × سال	۲	۰/۰۱۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۲۰ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱۱ <sup>n.s</sup>	۰/۳۵۱ <sup>n.s</sup>
نانو ذرات دی اکسید (C)	۲	۱/۵۴ <sup>**</sup>	۰/۷۶۲ <sup>**</sup>	۰/۸۴۷ <sup>**</sup>	۳/۴۱۱ <sup>**</sup>
C × سال	۲	۰/۰۰۷ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱۸ <sup>n.s</sup>
B × A	۴	۰/۰۹۷ <sup>**</sup>	۰/۱۶۹ <sup>**</sup>	۰/۲۷۲ <sup>**</sup>	۰/۸۶۱ <sup>**</sup>
B × A در سال	۴	۰/۰۰۵ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۸ <sup>n.s</sup>	۰/۰۲۵ <sup>n.s</sup>	۰/۵۳۷ <sup>n.s</sup>
C × A	۴	۰/۱۱۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۴ <sup>**</sup>	۰/۰۰۶ <sup>**</sup>	۰/۴۷۹ <sup>*</sup>
C × A در سال	۴	۰/۰۱۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۰ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۴ <sup>n.s</sup>	۱/۱۲ <sup>**</sup>
C × B	۴	۰/۰۱۳ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱۹ <sup>**</sup>	۰/۰۳۹ <sup>**</sup>	۰/۵۳۴ <sup>*</sup>
C × B در سال	۴	۰/۰۰۳ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۴ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱۱ <sup>n.s</sup>	۱/۲۰۳ <sup>**</sup>
C × B × A	۸	۰/۰۱۳ <sup>*</sup>	۰/۰۳۵ <sup>**</sup>	۰/۰۶۷ <sup>*</sup>	۱/۰۳۵ <sup>**</sup>
C × B × A در سال	۸	۰/۰۰۴ <sup>n.s</sup>	۰/۰۰۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۳۳ <sup>n.s</sup>	۰/۶۵۲ <sup>*</sup>
خطا	۹۶	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۱۶	۰/۱۶۶
ضریب تغییرات (%)		۲/۹۹	۴/۱۹	۵/۲۱	۳/۷۶

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

آمد (جدول ۴). نتایج تحقیقات بر روی ذرت (Kellos *et al.*, 2008) نشان دادند که ماهیت آنزیم کاتالاز به طور معنی دار تحت تنش خشکی افزایش می یابد. مطالعه Petridis و همکاران (۲۰۱۲) نشان داده است که تحت تنش خشکی، فعالیت آنتی اکسیدانی در چهار رقم زیتون افزایش یافته و البته این افزایش در همه رقم های مورد مطالعه، یکسان نبوده است. کاربرد نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و اسید فولیک موجب کاهش تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب وارد شده به غشای سلول می شوند که این عمل را با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی انجام

همین اساس اثر متقابل سه گانه آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم نیز در سطح احتمال ۵٪ بر این صفت معنی دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه محتوای آنزیم کاتالاز نشان داد که در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس بیشترین میانگین (۴/۸۴ واحد میلی گرم بر پروتئین) با عدم کاربرد نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و اسید فولیک و کمترین میانگین (۱/۸۴ واحد میلی گرم بر پروتئین) با کاربرد ۲ میلی گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسید فولیک در شرایط ۱۰۰٪ آب قابل دسترس بدست

ادامه جدول ۳-

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		فروکتوز	ساکارز	پروتئین برگ	میزان روغن
سال	۱	۰/۲۰۹ <sup>n.s</sup>	۲/۴۸۳ <sup>n.s</sup>	۲/۸۳ <sup>ns</sup>	۱۳/۵۴ <sup>n.s</sup>
سال × بلوک	۴	۱/۲۹۰	۰/۷۷۱ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱۴ <sup>n.s</sup>	۱/۵۳ <sup>n.s</sup>
آبیاری (A)	۲	۱۲۸۹/۴۵ <sup>**</sup>	۲۷۷/۱۷۲ <sup>**</sup>	۷۷۶/۴۳ <sup>**</sup>	۴۵۴/۹۵ <sup>**</sup>
فاکتور a × سال	۲	۰/۴۷۷ <sup>*</sup>	۱/۳۹۵ <sup>n.s</sup>	۰/۴۱۸ <sup>n.s</sup>	۲/۵۴ <sup>n.s</sup>
بلوک a × سال	۸	۰/۰۳۶ <sup>n.s</sup>	۰/۶۳۳ <sup>n.s</sup>	۰/۱۲۳ <sup>n.s</sup>	۰/۷۲۶ <sup>n.s</sup>
اسید فولیک (B)	۲	۲۱۳/۸۸ <sup>**</sup>	۹۱/۰۲۷ <sup>**</sup>	۷۴/۵۲ <sup>**</sup>	۸۰/۰۲۳ <sup>**</sup>
B × سال	۲	۰/۳۱۲ <sup>*</sup>	۱/۱۳۶ <sup>n.s</sup>	۰/۲۵۱ <sup>n.s</sup>	۱/۲۱ <sup>n.s</sup>
نانو ذرات دی اکسید (C)	۲	۳۶/۹۰ <sup>**</sup>	۱/۵۶۵ <sup>n.s</sup>	۲/۴۳۸ <sup>**</sup>	۱/۷۲ <sup>**</sup>
C × سال	۲	۰/۱۱۸ <sup>n.s</sup>	۰/۳۶۴ <sup>n.s</sup>	۰/۰۱۷ <sup>n.s</sup>	۰/۲۸۴ <sup>n.s</sup>
B × A	۴	۳/۱۹۰ <sup>**</sup>	۰/۸۶۱ <sup>n.s</sup>	۰/۹۲۶ <sup>n.s</sup>	۰/۵۶۶ <sup>n.s</sup>
B × A در سال	۴	۰/۱۶۰ <sup>n.s</sup>	۰/۹۹۶ <sup>n.s</sup>	۰/۵۳۷ <sup>n.s</sup>	۰/۷۸۴ <sup>n.s</sup>
C × A	۴	۰/۳۷۴ <sup>**</sup>	۰/۹۱۷ <sup>n.s</sup>	۰/۴۳۷ <sup>**</sup>	۰/۸۴۹ <sup>**</sup>
C × A در سال	۴	۰/۲۳۳ <sup>n.s</sup>	۱/۶۹۹ <sup>n.s</sup>	۱/۷۲ <sup>n.s</sup>	۱/۷۳ <sup>n.s</sup>
C × B	۴	۳/۹۴۸ <sup>**</sup>	۱/۷۹۵ <sup>n.s</sup>	۰/۴۳۳ <sup>**</sup>	۱/۹۵ <sup>**</sup>
C × B در سال	۴	۰/۱۲۶ <sup>n.s</sup>	۳/۹۴۸ <sup>n.s</sup>	۱/۸۴ <sup>n.s</sup>	۴/۳۲ <sup>n.s</sup>
C × B × A	۸	۱/۴۶۷ <sup>**</sup>	۲/۱۵۷ <sup>*</sup>	۱/۸۵ <sup>n.s</sup>	۳/۵۴ <sup>n.s</sup>
C × B × A در سال	۸	۰/۱۷۷ <sup>n.s</sup>	۰/۶۰۵ <sup>n.s</sup>	۰/۵۲۶ <sup>n.s</sup>	۰/۷۰۵ <sup>n.s</sup>
خطا	۹۶	۰/۱۲۹	۱/۱۹۱	۰/۱۵۲	۱/۹۱
ضریب تغییرات (%)		۱/۲۸۵	۱۲/۳۳۵	۱۱/۵۳	۷/۸۴

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

می دهند.

میلی گرم در لیتر اسید فولیک در شرایط ۱۰۰٪ آب قابل دسترس کمترین میانگین (۱/۸۱ واحد میلی گرم بر پروتئین) این شاخص را نشان داد (جدول ۴). نتایج تحقیقات بر روی آفتابگردان (Manivannan *et al.*, 2008) نشان دادند که ماهیت آنزیم پراکسیداز به طور معنی داری تحت تنش خشکی افزایش می یابد.

**محتوای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری، اسید فولیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اثر معنی داری داشتند (جدول ۳). کلیه اثرات متقابل دوگانه در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای آنزیم

**محتوای آنزیم پراکسیداز:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری، اسید فولیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به ترتیب در سطح احتمال ۱، ۵ و ۱ درصد بر محتوای آنزیم پراکسیداز اثر معنی داری داشتند (جدول ۳). اثرات متقابل دوگانه و سه گانه نیز بر محتوای آنزیم پراکسیداز در سطح احتمال ۱٪ معنی دار شدند (جدول ۳). عدم کاربرد اسید فولیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس بالاترین میانگین (۲/۶۱ واحد میلی گرم بر پروتئین) محتوای آنزیم پراکسیداز را نشان داد. همچنین کاربرد ۲ میلی گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و ۵۰۰

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثرهای متقابل آبیاری و اسید فولیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در صفات مورد بررسی

سطح آبیاری (آب قابل دسترس)	اسید فولیک	نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم	کاتالاز	پراکسیداز	SOD	پروکلین (میلی گرم بر گرم وزن تر برگ)	گلوکز	فروکتوز	ساکارز
(میلی گرم در لیتر)	(میلی گرم در لیتر)	(Unit/mg pro)	(Unit/mg pro)	(Unit/mg pro)	(Unit/mg pro)	(میلی گرم بر گرم)	(میلی گرم بر گرم)	(میلی گرم بر گرم)	(میلی گرم بر گرم)
۰	۰	۰	۴/۸۴ <sup>a</sup>	۲/۶۱ <sup>a</sup>	۳/۶۱ <sup>a</sup>	۱۶/۸۵ <sup>a</sup>	۵۲/۶۱ <sup>d</sup>	۳۱/۰۸ <sup>f</sup>	۹/۸۰ <sup>cd</sup>
۱	۰	۱	۲/۶۱ <sup>b</sup>	۲/۶۱ <sup>b</sup>	۳/۵۹ <sup>b</sup>	۱۵/۹۲ <sup>b</sup>	۵۲/۶۶ <sup>d</sup>	۳۱/۳۳ <sup>f</sup>	۹/۷۸ <sup>cd</sup>
۲	۲	۲	۲/۴۲ <sup>c</sup>	۲/۴۲ <sup>c</sup>	۳/۵۳ <sup>b</sup>	۱۶/۲۱ <sup>c</sup>	۵۳/۳۵ <sup>c</sup>	۳۲/۱۲ <sup>e</sup>	۸/۴۵ <sup>ef</sup>
۰	۰	۰	۲/۲۱ <sup>d</sup>	۲/۲۱ <sup>d</sup>	۳/۵۹ <sup>b</sup>	۱۵/۵۲ <sup>c</sup>	۵۴/۵۶ <sup>bcd</sup>	۳۲/۶۲ <sup>d</sup>	۱۰/۸۹ <sup>abc</sup>
۱	۲۵۰	۱	۴/۳۱ <sup>e</sup>	۲/۰۶ <sup>fg</sup>	۳/۳۲ <sup>d</sup>	۱۵/۱۵ <sup>d</sup>	۵۴/۷۰ <sup>bcd</sup>	۳۲/۲۲ <sup>de</sup>	۱۱/۱۲ <sup>ab</sup>
۲	۲	۲	۴/۱۵ <sup>f</sup>	۱/۸۴ <sup>k</sup>	۲/۹۱ <sup>e</sup>	۱۵/۴۳ <sup>c</sup>	۵۶/۹۹ <sup>ab</sup>	۳۴/۳۶ <sup>bc</sup>	۱۱/۹۲ <sup>a</sup>
۰	۰	۰	۳/۷ <sup>fg</sup>	۱/۵۹ <sup>jk</sup>	۲/۷۸ <sup>f</sup>	۱۴/۲۳ <sup>e</sup>	۲۶/۶۶ <sup>m</sup>	۳۴/۱۳ <sup>c</sup>	۱۱/۸۹ <sup>ab</sup>
۱	۵۰۰	۱	۳/۷۹ <sup>f</sup>	۱/۶۲ <sup>m</sup>	۲/۶۲ <sup>g</sup>	۱۳/۸۷ <sup>e</sup>	۵۶/۷۰ <sup>abc</sup>	۳۴/۶۵ <sup>b</sup>	۱۱/۹۴ <sup>a</sup>
۲	۲	۲	۳/۵ <sup>h</sup>	۱/۴۶ <sup>ef</sup>	۲/۶۳ <sup>h</sup>	۱۳/۲۸ <sup>f</sup>	۵۸/۲۶ <sup>a</sup>	۳۶/۰۹ <sup>a</sup>	۱۲/۱۱ <sup>a</sup>
۰	۰	۰	۳/۸ <sup>f</sup>	۱/۸۴ <sup>ef</sup>	۲/۸۶ <sup>f</sup>	۱۲/۲۷ <sup>g</sup>	۴۴/۴۹ <sup>efg</sup>	۲۴/۴۸ <sup>m</sup>	۵/۳۵ <sup>jsk</sup>
۱	۰	۱	۳/۶ <sup>g</sup>	۱/۸۸ <sup>gh</sup>	۲/۷ <sup>g</sup>	۱۲/۱۱ <sup>g</sup>	۴۵/۴۴ <sup>ef</sup>	۲۵/۲۴ <sup>l</sup>	۴/۶۹ <sup>k</sup>
۲	۲	۲	۳/۴۹ <sup>h</sup>	۱/۷۴ <sup>kl</sup>	۲/۵۹ <sup>h</sup>	۱۱/۵۲ <sup>h</sup>	۴۴/۱۵ <sup>fg</sup>	۲۶/۱۲ <sup>k</sup>	۵/۵۸ <sup>jk</sup>
۰	۰	۰	۳/۳۴ <sup>i</sup>	۱/۵۸ <sup>lm</sup>	۲/۳۶ <sup>i</sup>	۱۰/۹۸ <sup>i</sup>	۴۴/۸۶ <sup>efg</sup>	۲۶/۵۱ <sup>k</sup>	۵/۹۶ <sup>ij</sup>
۱	۲۵۰	۱	۲/۹۷	۱/۵۴ <sup>n</sup>	۲/۲۸ <sup>kj</sup>	۱۰/۵۷ <sup>ij</sup>	۴۵/۰۳ <sup>efg</sup>	۲۷/۰۴ <sup>j</sup>	۶/۴۸ <sup>ij</sup>
۲	۲	۲	۲/۸۳ <sup>k</sup>	۱/۴۸ <sup>o</sup>	۲/۲۸ <sup>l</sup>	۱۰/۲۵ <sup>kj</sup>	۴۵/۵۷ <sup>ef</sup>	۲۷/۵۶ <sup>i</sup>	۷/۰۷ <sup>gh</sup>
۰	۵۰۰	۰	۲/۷۹ <sup>l</sup>	۱/۳۲ <sup>p</sup>	۱/۹ <sup>m</sup>	۹/۸۹ <sup>kl</sup>	۴۴/۲۷ <sup>efg</sup>	۲۸/۰۸ <sup>h</sup>	۶/۸۹ <sup>ghi</sup>
۱	۱	۱	۲/۵۱ <sup>m</sup>	۱/۲ <sup>rs</sup>	۱/۸۸ <sup>p</sup>	۹/۴۹ <sup>l</sup>	۴۵/۵۷ <sup>ef</sup>	۲۸/۳۸ <sup>h</sup>	۷/۸۶ <sup>fgh</sup>
۲	۲	۲	۲/۳ <sup>i</sup>	۱/۹۴ <sup>ij</sup>	۱/۶۵ <sup>r</sup>	۸/۹۵ <sup>m</sup>	۴۷/۷۰ <sup>e</sup>	۳۰/۶۶ <sup>g</sup>	۷/۹۳ <sup>fg</sup>
۰	۰	۰	۳/۱۲ <sup>i</sup>	۱/۷۲ <sup>ih</sup>	۲/۳۴ <sup>kj</sup>	۸/۲۱ <sup>n</sup>	۳۵/۸۷ <sup>kl</sup>	۲۱/۲۸ <sup>q</sup>	۷/۷۹ <sup>fg</sup>
۱	۰	۱	۳/۰۱ <sup>k</sup>	۱/۷۳ <sup>mn</sup>	۲/۳۵ <sup>ij</sup>	۷/۹۹ <sup>n</sup>	۳۷/۲۳ <sup>l</sup>	۲۱/۰۵ <sup>p</sup>	۷/۶۹ <sup>fgh</sup>
۲	۲	۲	۲/۷۴ <sup>k</sup>	۱/۵۲ <sup>op</sup>	۲/۲ <sup>kl</sup>	۷/۳۳ <sup>o</sup>	۳۶/۵۹ <sup>ijkl</sup>	۲۱/۴۸ <sup>o</sup>	۸/۰۱ <sup>fg</sup>
۰	۰	۰	۲/۵۴ <sup>l</sup>	۱/۲۸ <sup>p</sup>	۲/۱۲ <sup>m</sup>	۶/۷۴ <sup>p</sup>	۳۴/۲۶ <sup>l</sup>	۲۴/۳۵ <sup>m</sup>	۹/۸۲ <sup>cd</sup>
۱	۲۵۰	۱	۲/۴۹ <sup>l</sup>	۱/۲۸ <sup>rs</sup>	۱/۹۱ <sup>o</sup>	۶/۳۱ <sup>pq</sup>	۳۸/۹۳ <sup>h-k</sup>	۲۳/۱۳ <sup>n</sup>	۹/۳۰ <sup>de</sup>
۲	۲	۲	۲/۲۲ <sup>m</sup>	۱/۰۳ <sup>q</sup>	۱/۶۷ <sup>q</sup>	۶/۰۶ <sup>qr</sup>	۴۰/۴۲ <sup>hi</sup>	۲۴/۲۷ <sup>m</sup>	۸/۸۰ <sup>def</sup>
۰	۰	۰	۲/۲۲ <sup>m</sup>	۱/۱۱ <sup>s</sup>	۱/۹۱ <sup>n</sup>	۵/۱ <sup>r</sup>	۳۹/۹۷ <sup>hij</sup>	۲۴/۲۲ <sup>m</sup>	۹/۸۳ <sup>cd</sup>
۱	۵۰۰	۱	۲/۱ <sup>n</sup>	۱/۹۱ <sup>t</sup>	۱/۷۶ <sup>qr</sup>	۶/۱۱ <sup>rs</sup>	۴۱/۸۶ <sup>gh</sup>	۲۵/۶۱ <sup>l</sup>	۱۰/۶۶ <sup>bc</sup>
۲	۲	۲	۱/۸۴	۱/۸۱ <sup>u</sup>	۱/۶۴ <sup>s</sup>	۵/۷۲ <sup>s</sup>	۴۴/۹۰ <sup>efg</sup>	۲۷/۱۶ <sup>ij</sup>	۱۱/۳۸ <sup>ab</sup>

در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون LSD با یکدیگر اختلاف ندارند.

معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین محتوای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در پاسخ به برهمکنش آبیاری، اسید فولیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم نشان داد که در شرایط ۵۰٪

سوپراکسید دیسموتاز اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). بر همین اساس اثر متقابل سه گانه آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم نیز در سطح احتمال ۵٪ بر این صفت

گیاهان عالی باشد. البته اسیدهای آمینه دیگری نیز تحت تنش‌های خشکی و شوری انباشته می‌شوند. اما درجه تغییرات آنها با تجمع پرولین که ظرف مدت کوتاهی از اعمال تنش به سطوح خیلی بالا می‌رسد قابل مقایسه نیست (Tavakoli *et al.*, 2016). تجمع پرولین یکی از شاخص‌های مهم تحمل به تنش خشکی در گیاهان عالی است (Bartels and Sunkars, 2004). تحت تنش خشکی، تجمع پرولین به ایجاد تنظیم اسمزی در سلول‌های گیاه که تحت کمبود آب قرار دارند کمک می‌کند (Chaves *et al.*, 2002). همچنین Phutela و همکاران (۲۰۰۰) نیز تأکید کردند که تجمع پرولین در بافت گیاهان تنش دیده به علت افزایش میزان سنتز به وسیله پرولین -۵-کربوکسیلاز- سنتتاز و کاهش میزان تجزیه آن به وسیله آنزیم پرولین اکسیداز است.

**محتوای گلوکز:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری و اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای گلوکز اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). در رابطه با اثرهای متقابل نیز مشخص شد که تمام اثرهای متقابل دوگانه و اثر سه جانبه آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای گلوکز اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). مقایسه محتوای گلوکز در پاسخ به کاربرد آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نشان داد که در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس بالاترین میانگین (۵۸/۲۶ میلی‌گرم بر گرم) با کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و کمترین میانگین در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس (۲۶/۶۶ میلی‌گرم بر گرم) با عدم کاربرد نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک بدست آمد (جدول ۴).

**محتوای فروکتوز:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص شد که اثرهای ساده، متقابل دوگانه و سه‌گانه در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای فروکتوز اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). مقایسه محتوای فروکتوز در پاسخ به کاربرد آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نشان داد که در شرایط ۵۰٪ آب

آب قابل دسترس بالاترین میانگین (۳/۶۱ واحد میلی‌گرم بر پروتئین) با عدم کاربرد اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، و کمترین میانگین در شرایط ۱۰۰٪ آب قابل دسترس (۱/۶۴ واحد میلی‌گرم بر پروتئین) با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک بدست آمد (جدول ۴). مطابق با نتایج این تحقیق مشاهده می‌شود که تنش خشکی عاملی است که می‌تواند فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش دهد و نانوذرات نیز در شرایط تنش قادر به افزایش فعالیت این آنزیم هستند (مظفری و همکاران، ۱۳۹۵). در آزمایشی که توسط (Soltani *et al.*, 2013) بر روی گیاه عدس انجام شد، اثر محلولپاشی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود. Soleimani و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که با افزایش سطح تنش تا حد مشخصی، بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز نیز افزایش می‌یابد.

**محتوای پرولین:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری، اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای پرولین اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). کلیه اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه نیز در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای پرولین اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). غلظت پرولین طی تنش خشکی در تمامی گیاهان تحت تنش برای تنظیم فشار اسمزی درون افزایش پیدا می‌کند. مقایسه محتوای پرولین در پاسخ به کاربرد آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نشان داد که در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس بالاترین میانگین (۱۶/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) با عدم کاربرد اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و کمترین میانگین در شرایط ۱۰۰٪ آب قابل دسترس (۵/۷۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک بدست آمد (جدول ۴). محتوای پرولین در برگ‌های بسیاری از گیاهان به وسیله تنش‌ها از جمله خشکی افزایش می‌یابد. بنابراین به نظر می‌رسد که تجمع پرولین آزاد یک پاسخ متداول به تنش در

سیگنال‌هایی را تنظیم می‌کنند که در کنترل بیان ژن‌های مختلف درگیر در متابولیک نقش دارند (Price et al., 2004). بررسی‌های فیزیولوژیکی نشان داده است که قندهایی از قبیل رافینوز گروه اولیگوساکاریدها، ساکارز، فروکتوز ترهالوز و سوربیتول قندهای الکلی از قبیل مانیتول، اسیدهای آمینه از قبیل پرولین و آمین‌ها از قبیل گلاستین بتائین و پلی‌آمین‌ها تحت تنش خشکی در گونه‌های گیاهی مختلف تجمع می‌یابند (Rezapor et al., 2011). در پژوهشی کاربرد نانوکود فارمکس و اسید فولیک باعث افزایش عملکرد و میزان مواد مؤثره سیاهدانه شد. از این رو به نظر می‌رسد فراهم بودن بیشتر عناصر غذایی برای گیاه در تیمارهای کودی باعث افزایش تولید مواد فتوسنتزی شده است (Piccolo et al., 1993).

**پروتئین برگ:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص شد که اثرهای آبیاری و اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای پروتئین برگ اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). در رابطه با اثرهای متقابل نیز مشخص شد که اثر متقابل اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آبیاری و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان پروتئین برگ در سطح احتمال ۱٪ اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). کاربرد تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بیشترین میزان پروتئین برگ (۴/۷۴ mg/gr fw) و تیمار عدم مصرف اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم کمترین (۳/۵۸ mg/gr fw) میزان پروتئین برگ را نشان داد (جدول ۵). همچنین اعمال تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط ۱۰٪ آب قابل دسترس (۴/۵۷ mg/gr fw) و عدم مصرف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط ۷۵٪ آب قابل دسترس (۳/۸۱ mg/gr fw) بیشترین پروتئین برگ را نشان داد (جدول ۶). نتایج پژوهشی در مورد بررسی اثرهای نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اسید فولیک بر ارقام کنجد در شرایط تنش خشکی نشان داد که قطع آبیاری در ۵۰٪ گلدی کمترین عملکرد دانه و عملکرد پروتئین را داشت. بیشترین درصد و عملکرد پروتئین و کلروفیل در گیاهان محلول‌پاشی شده با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم همراه با اسید

قابل دسترس بالاترین میانگین (۳۶/۰۹ میلی‌گرم بر گرم) با کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و کمترین میانگین در شرایط ۱۰٪ آب قابل دسترس (۲۱/۲۸ میلی‌گرم بر گرم) با عدم کاربرد نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اسید فولیک بدست آمد (جدول ۴).

**محتوای ساکارز:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری و اسید فولیک در سطح احتمال ۱٪ بر محتوای ساکارز معنی‌دار بودند و از میان اثرهای متقابل تنها اثر متقابل سه‌گانه آبیاری × اسید فولیک × نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه محتوای ساکارز نشان داد که در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس بالاترین میانگین (۱۲/۱۱ میلی‌گرم بر گرم) با کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و کمترین میانگین در شرایط ۷۵٪ آب قابل دسترس (۴/۶۹ میلی‌گرم بر گرم) با عدم کاربرد اسید فولیک و ۱ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بدست آمد (جدول ۴). در شرایط تنش خشکی آب قابل دسترس گیاه کاهش می‌یابد و برای حفظ محتوای آب درونی روزنه‌های برگ بسته می‌شود که این امر منجر به کاهش جذب و تثبیت CO<sub>2</sub>، بازداری از فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و تغییر در متابولیسم قندها می‌گردد (Flexas et al., 2004). با وجود کاهش تثبیت کربن در برگ‌های تحت تنش خشکی مقدار زیادی کربوهیدرات محلول در آب مانند گلوکز، فروکتوز، ساکارز، استاکیوز مانیتول و پینیتول تجمع می‌یابند. البته نوع کربوهیدرات‌های محلول در بین گونه‌ها متغیر است (Valliyodan and Nguyen, 2006). کربوهیدرات‌های محلول و سایر املاح مانند پرولین به عنوان اسمولیت‌ها برای نگهداری تورژسانس سلول، برگ حفاظت غشاء و جلوگیری از دنا توره شدن پروتئین نقش دارند (Bartels and Sunkars, 2004). کربوهیدرات‌های محلول ساکارز، فروکتوز و گلوکز (نقش اصلی در متابولیسم گیاه در سطح سلولی و گیاه کامل ایفاء می‌کنند آنها علاوه بر منبع انرژی، در واکنش به تنش‌های غیرزنده شرکت می‌کنند و به عنوان پیام‌رسان‌های اولیه

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر پروتئین برگ، میزان روغن و درصد اسانس

اسید فولیک	نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم	پروتئین برگ (mg/gr fw)	میزان روغن (%)	درصد اسانس (%)
۰	۰	۳/۵۸ <sup>h</sup>	۳۷/۵۷ <sup>d</sup>	۰/۹۰ <sup>g</sup>
۰	۱	۳/۹۷ <sup>f</sup>	۳۸/۶۷ <sup>c</sup>	۱/۱۷ <sup>f</sup>
۰	۲	۴/۲۰ <sup>de</sup>	۳۹/۳۳ <sup>b</sup>	۱/۵۴ <sup>c</sup>
۲۵۰	۰	۳/۸۵ <sup>g</sup>	۳۵/۵۶ <sup>g</sup>	۱/۱۹ <sup>f</sup>
۲۵۰	۱	۴/۲۶ <sup>d</sup>	۳۶/۱۹ <sup>f</sup>	۱/۳۲ <sup>e</sup>
۲۵۰	۲	۴/۷۴ <sup>a</sup>	۳۶/۷۲ <sup>e</sup>	۱/۵۷ <sup>c</sup>
۵۰۰	۰	۴/۱۴ <sup>e</sup>	۳۷/۹۹ <sup>d</sup>	۱/۴۲ <sup>d</sup>
۵۰۰	۱	۴/۳۸ <sup>c</sup>	۴۰/۵۸ <sup>a</sup>	۱/۷۸ <sup>b</sup>
۵۰۰	۲	۴/۵۳ <sup>b</sup>	۴۰/۶۱ <sup>a</sup>	۱/۹۷ <sup>a</sup>

در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون LSD با یکدیگر اختلاف ندارند.

جدول ۶- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر پروتئین برگ، میزان روغن و درصد اسانس

آبیاری	نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم	پروتئین برگ (mg/gr fw)	میزان روغن (%)	درصد اسانس (%)
۰	۰	۳/۸۳ <sup>e</sup>	۳۶/۰۷ <sup>e</sup>	۱/۱۷ <sup>f</sup>
۵۰	۱	۴۰/۰۸ <sup>c</sup>	۳۸/۲۱ <sup>c</sup>	۱/۳۲ <sup>e</sup>
۵۰	۲	۴/۳۵ <sup>b</sup>	۳۸/۷۱ <sup>b</sup>	۱/۵۷ <sup>c</sup>
۷۵	۰	۳/۸۱ <sup>e</sup>	۳۷/۶۸ <sup>d</sup>	۱/۱۴ <sup>f</sup>
۷۵	۱	۴/۱۳ <sup>c</sup>	۳۸/۴۰ <sup>c</sup>	۱/۴۱ <sup>d</sup>
۷۵	۲	۴/۵۴ <sup>a</sup>	۳۸/۷۱ <sup>b</sup>	۱/۶۷ <sup>b</sup>
۱۰۰	۰	۳/۹۴ <sup>d</sup>	۳۷/۷۸ <sup>d</sup>	۱/۱۹ <sup>f</sup>
۱۰۰	۱	۴/۴۰ <sup>b</sup>	۳۸/۸۳ <sup>b</sup>	۱/۵۴ <sup>c</sup>
۱۰۰	۲	۴/۵۷ <sup>a</sup>	۳۹/۲۴ <sup>a</sup>	۱/۸۳ <sup>a</sup>

در هر ستون، میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون LSD با یکدیگر اختلاف ندارند.

سطح احتمال ۱٪ بر میزان روغن اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). در رابطه با اثرهای متقابل نیز مشخص شد که اثر متقابل اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آبیاری و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان روغن در سطح احتمال ۱٪ اثر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). کاربرد تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بیشترین ۴۰/۶۱ درصد روغن را نشان داد (جدول ۵).

فولیک مشاهده شد (ایوبی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۷). در رابطه با افزایش پروتئین با محلول‌پاشی اسید فولیک می‌توان گفت، اسید فولیک باعث افزایش نفوذپذیری غشای یاخته‌های ریشه، جذب و انتقال نیتروژن را بهبود بخشیده و باعث افزایش میزان پروتئین در گیاه می‌شود (Mahrokh and Azizi, 2014).

میزان روغن: براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص شد که اثرهای آبیاری و اسید فولیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در

ثانویه در گیاهان را فعال می‌کند (Marslin et al., 2017). مشابه با نتایج این تحقیق اثر نانو ذرات اکسید مس بر تولید مواد فنلی در ریحان گزارش شده است (Nazir et al., 2021).

### نتیجه‌گیری

افزایش تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پرکسیداز دیسموتاز و پرولین شد میزان فعالیت آنزیم‌های در تیمارهای تنش خشکی با عدم استفاده از اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بالاتر از شرایط بدون تنش بوده است. در تیمار ۵۰٪ تنش خشکی میزان کاتالاز، پرکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکز، فروکتوز و ساکارز بالا رفت زیرا افزایش تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پرکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پرولین و قندها شد. تنش خشکی منجر به کاهش میزان اسانس، درصد روغن و پروتئین برگ شد. در تیمار تنش خشکی، ۵۰٪ با کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بالاترین اعداد در صفات، گلوکز فروکتوز و ساکارز بدست آمد. بطورکلی بر اساس نتایج این آزمایش می‌توان گفت که استفاده از کود اسید فولیک به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در راستای کاهش اثرهای تنش بر گیاه سیاه‌دانه پیشنهاد می‌گردد.

همچنین اعمال تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط ۱۰۰٪ آب قابل دسترس بیشترین ۳۹/۲۴ درصد و عدم مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط ۵۰٪ آب قابل دسترس کمترین ۳۶/۰۷ درصد روغن را نشان داد (جدول ۶).

**درصد اسانس:** براساس نتایج تجزیه واریانس مشخص گردید که اثرهای آبیاری و اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح احتمال ۱٪ بر درصد اسانس اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). در رابطه با اثرهای متقابل نیز مشخص شد که اثر متقابل اسید فولیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آبیاری و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر درصد اسانس در سطح احتمال ۱٪ اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۳). کاربرد تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید فولیک و ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بیشترین ۱/۹۷ درصد و تیمار عدم مصرف اسید فولیک و عدم مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم کمترین ۰/۹۰ درصد اسانس را نشان داد (جدول ۵). همچنین اعمال تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط ۱۰۰٪ آب قابل دسترس بیشترین ۱/۸۳ درصد و عدم مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در شرایط ۷۵٪ آب قابل دسترس کمترین ۱/۱۴ درصد میزان درصد اسانس را نشان داد (جدول ۶). نانو ذرات با تأثیر بر تولید پراکسید هیدروژن همانند یک الیستور تولید اسانس در گیاهان را تحریک می‌کند. پراکسید هیدروژن در غلظت کم به عنوان یک سیگنال عمل کرده و مسیرهای دفاعی و سنتز متابولیت‌های

### منابع

ایوبی‌زاده، نیکی، لایی، قنبر، امینی دهقنی، مجید، سینکی، جعفرمسعود، و شهرام، رضوان (۱۳۹۷). اثر محلول‌پاشی نانوکلات آهن و اسید فولیک بر عملکرد دانه و برخی صفات فیزیولوژیک ارقام کنگد در شرایط تنش خشکی. *فیزیولوژی گیاهان زراعی*، ۱۰(۴۰)، ۷۴-۵۵.

قلی‌نژاد، اسماعیل، و رضایی چپانه، اسماعیل (۱۳۹۳). ارزیابی عملکرد سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) در کشت مخلوط با نخود (*Cicer arietinum* L.). *مجله علوم گیاهان زراعی*، ۱۶(۳)، ۲۳۶-۲۴۹.

خرم‌دل، سرور، کوچکی، علیرضا، نصیری محلاتی، مهدی، و قربانی، رضا (۱۳۸۷). اثر کاربرد کودهای بیولوژیک بر شاخص‌های رشد سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.). *مجله پژوهش‌های زراعی ایران*، ۶(۲)، ۲۹۴-۲۸۵. DOR: 20.1001.1.20081472.1387.6.2.8.1.

- مظفری، افشین، حبیبی، داوود، اصغرزاده، احمد، و مشهدی اکبر بوجار، مسعود (۱۳۹۵). بررسی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) تحت شرایط گلخانه. *مجله فیزیولوژی گیاهان زراعی*، ۳۱، ۲۱-۳۹.
- Ahmad, B., Shabbir, A., Jaleel, H., Khan, M. M. 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, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.04.002>
- Ait Mbarek, L. H., Ait Mouse, N., Elabbadi, M., & Ziad, A. (2007). Anti-tumor properties of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Medician Biological Research*, 40(6), 839-847.
- Bartels, D., & Sunkars, R. (2004). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 24, 23-58. <https://doi.org/10-1080/07352680590910410>
- Bates, L. S., Waldern, R. P., & Teave, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Chance, B., & Maehly, A. (1995). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology*, 2, 764-775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osorio, M. L., Carvalho, I., Faria, T., & Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 89(7), 907-916. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.1075/s-2004-820867>
- Giannopolities, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314.
- Hosseini Boldaji, S. A., Khavari-Nejad, R. A., Hassan Sajedi, R., Fahimi, H., & Saadatmand, S. (2012). Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 34, 1177-1186. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0914-6>
- Kellos, T., Timar, L., Szilagy, V., Szalai, G., Galiba, G., & Kocsy, G. (2008). Effect of abiotic stress on antioxidants in maize. *Plant Biology*, 10(5), 563-572. <https://doi.org/10.1111/j-14838-8677.2008.00071.x>
- Mac-Adam, J. W., Nelson, C. J., & Sharp, R. E. (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology*, 99, 872-878. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.872>
- Maccarthy, P. (2001). The principles of humic substances. *Journal Soil Science*, 166, 738-751.
- Mahrokh, A., & Azizi, F. (2014). The effect of natural zeolite usage on deficit irrigation stress tolerance in maize (*Zea mays*). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12(2), 296-340. <https://doi.org/10.22067/GSC.V12I2.21125>
- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2008). Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. *Compet Rendus Biologies*, 331(6), 418-425. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.03.003>
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontier in Plant Science*, 8, 832. [doi:10.3389/fpls](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01111)
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silveira, V., & Owens, H. S. (1950). Determination of starch and amylase in vegetables. *Analytical Chemistry*, 22(9), 1156-1158.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536. [https://doi.org/10.16/s0038-0717\(02\)00174-8](https://doi.org/10.16/s0038-0717(02)00174-8)
- Nazir, S., Jan, H., Zaman, G., Khan, T., & Abbasi, B. H. (2021). Copper oxide (CuO) and manganese oxide (MnO) nanoparticles induced biomass accumulation, antioxidants biosynthesis and abiotic elicitation of bioactive compounds in callus cultures of *Ocimum basilicum*. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 49, 625-633. <https://doi.org/10.1080/2169140.2021.1911111>
- Neuman, K. H., Kumar, A., & Imani, J. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture. A Tool in Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-03-49098-0>
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S., & Giannakoula, A. (2012). Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.014>
- Phutela, A., Jain, V., Dhawan, K., & Nainawatee, H. S. (2000). Proline metabolism under water stress in the leaves and roots of *Brassica juncea* cultivars differing in drought tolerance. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 9, 35-39. <https://doi.org/10.1007/bf.3263.810>
- Piccolo, A., Celanoand, G., & Pietramellara, G. (1993). Effects of fractions of coal-derived folic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicon esculentum*). *Biology and Fertility of Soil*, 16, 11-15.
- Price, J., Laxmi, A. S., Martin, S. K., & Jang, J. C. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal

- transduction mechanisms Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(8), 2128-2150. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.02616>
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1189-1202. <https://doi.org/10.106/j.jpLph.2004.01.013>
- Reynolds, G. H. (2002). Forward to the Future Nanotechnology and Regulatory Policy. Pacific Research Institute.
- Rezapor, A., Heidari, M., Galavi, M., & Ramrodi, M. (2011). Effect of water stress and different amounts of sulfur fertilizer on grain yield, grain yield components and osmotic adjustment in *Nigella sativa* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 27(3), 384-396. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2011.638>
- Sebastiano, D., Roberto, T., Ersilio, D., & Arturo, A. (2005). Effect of foliar application of N and folic acids on growth and yield of durum wheat. *Journal of Agricultural Research*, 25, 183-191. <https://doi.org/10.1051/agro.2005017>
- Sequera-Mutiozabal, M., Tiburcio, A. F., & Alcazar, R. (2016). Drought stress tolerance in relation to polyamine metabolism in plants. In: Drought Stress Tolerance in Plants (eds. Hossain, M. A., Wani, S. H., Bhattacharjee, S., Burritt, D. J. and Lam-Son, P. T.) Pp. 267-286. Springer International Publishing.
- Soleimani, Z., Safipoorafshar, A., & Bahrami, A. (2012). Expression of superoxide dismutase gene in Cumin (*Cuminum cyminum* L.) under salinity stress. 12<sup>th</sup> Congress of Iranian Genetics Society, Tehran, 21 May.
- Soltani, M., Moaveni, P., & Noori, H. (2013). The effect of foliar application of nanoparticles of titanium dioxide yield and antioxidant enzyme activities in lentil (*Lens culinaris* L.). *Journal of Plant Ecophysiology Research Special Issue*, 78-88.
- Sungkaworn, T., Triampo, W., Nalakarn, P., Triampo, D., Tang, I. M., & Lenburt, Y. (2007). The effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on tumor cell colonies: Fractal dimension and morphological properties. *International Journal of Biomedical Science*, 2(1), 67-74.
- Tavakoli, M., Poustini, K., & Alizadeh, H. (2016). Proline accumulation and related genes in wheat leaves under salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18, 707-716.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2010). Humic substances biological activity at the plant-soil interface. *Plant Signaling and Behavior Journal*, 5(6), 635-643. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11211>
- Ullah, S., Adeel, M., Zain, M., Jilani, Gh., & Hamed, A. (2020). Physiological and biochemical response of wheat (*Triticum aestivum*) to TiO<sub>2</sub> nanoparticles in phosphorous amended soil: A full life cycle study. *Journal of Environment Management*, 263, 110365. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110365>
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(2), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.019>
- Vaseghi, A., & Davarzadehmami, S. (2016). Comparison of seed oil and mineral content of *Guizotia abyssica* Cass. with two genotypes of Iranian and Indian *Nigella sativa* L. *Journal of Oil Plants Production*, 2(2), 13-24.
- Zheng, Y., Graham, T. Richard, S., & Dixon, M. (2004). Potted gerbera production in a sub-irrigation system using low-concentration nutrient solutions. *Hort Scientist*, 39(6), 1283-1286.

## Investigating of the effect of folic acid and titanium dioxide nanoparticles on phytochemical characteristics of Black cumin (*Nigella sativa* L.) under water stress conditions

Saedeh rashidy

Department of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, Iran

(Received: 2024/12/22, Accepted: 2025/02/24)

### Abstract

Black seed (*Nigella sativa* L.) is one of the best sources of natural antioxidants with compounds such as alkaloids, flavonoids and tannin. Black seed plant seeds are used in traditional medicine of many countries to prevent and treat disorders and diseases. Since the production of medicinal plants can be affected by environmental factors such as water limitation, an experiment was conducted to investigate the effect of folic acid and titanium dioxide nanoparticles under drought stress conditions on phytochemical characteristics including the percentage of essential oil, oil content, leaf protein, glucose, fructose, sucrose, proline, superoxide dismutase, catalase and peroxidase of black seed medicinal plants. It was carried out during two crop years of 2018 and 2019 in the research farm of Shahrood University of Technology. This experiment was conducted as a split factorial in the form of a randomized complete block design with three treatments in three replications. The main plot consisted of three levels of irrigation (50, 75, and 100% of available water) and sub-plots included folic acid (0, 250 and 500 mg/l) and titanium dioxide nanoparticles (0, 1, and 2 mg/l). The results showed that the effect of irrigation treatments, folic acid and titanium dioxide nanoparticles on the content of catalase, superoxide dismutase, glucose and peroxidase, the effect of irrigation treatments on proline content and the effect of irrigation treatments and folic acid on the content of sucrose and fructose were significant. In the treatment of 50% drought stress, the amount of catalase (4.84 Unit/mg pro), peroxidase (61.2 Unit/mg pro), superoxide dismutase (61.3 Unit/mg pro), proline (16.85 mg/gr), glucose (52.61 mg/gr), fructose (31.08 mg/gr) and sucrose (9.80 mg/gr) went up. In the treatment of 50% drought stress with 500 mg per liter of folic acid and 2 mg per liter of titanium dioxide nanoparticles, the highest amounts of glucose (58.26 mg/gr), fructose (36.09 mg/gr) and sucrose (12.11 mg/gr) were obtained. Also, the results showed that drought stress led to a decrease in essential oil, oil percentage and leaf protein. The highest percentage of essential oil, percentage of leaf oil, and protein was observed with the use of 500 mg/L of folic acid and 2 mg/l of titanium dioxide nanoparticles with 100% water. Overall, based on the results of this experiment, it is recommended to use folic acid fertilizer (500 mg/l) and titanium dioxide nanoparticles (2 mg/l) in order to reduce the effects of drought stress on black cumin.

**Keywords:** Catalase, Peroxidase, Proline, Folic acid, Fructose

Corresponding author, Email: rashidi@pnu.ac.ir