تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد دوازدهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۸
۵۳۹-۵۵۳
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2019.1369.1304

اثر محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) تحت تنش خشکی

ایوب مزارعی[۱]، سید محسن موسوی نیک[۲]، احمد قنبری[۲]، لیلا فهمیده[۳*]
۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
۲. استاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۶

چکیده

یکی از راه‌های مقابله با اثر مخرب خشکی استفاده از تکنولوژی‌های به‌روز و مدرنی چون علم نانو است. این آزمایش به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی نانو دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی خصوصیات فیزیولوژی و فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مریم‌گلی تحت تنش خشکی انجام شد. این تحقیق در سال ۱۳۹۵ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل تنش خشکی (آبیاری در حد ظرفیت زراعی، تخلیه ۵۰ و ۷۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی) و محلول‌پاشی با نانو دی‌اکسید تیتانیوم (صفر (شاهد)، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. بر اساس نتایج حاصله، بالاترین مقدار ماده خشک (۶/۶۷ گرم) و کلروفیل a، b و کل برگ (به‌ترتیب ۲/۴۵، ۲/۰۸ و ۴/۶۲ میلی‌گرم بر وزن تر) در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو دی‌اکسید تیتانیوم به دست آمد و بیشترین غلظت پرولین (۵/۱۵ میلی‌گرم بر وزن تر) و فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل: مقدار فنل کل (۱۴/۴۹ میلی‌گرم بر وزن تر)، آنزیم‌های پراکسیداز (۴/۴۸ میلی‌گرم بر وزن تر)، آسکوربات پراکسیداز (۰/۶۰ میلی‌گرم بر وزن تر)، گایاکول پراکسیداز (۰/۶۰ میلی‌گرم بر وزن تر)، سوپراکسید دیسموتاز (۵/۵۳ میلی‌گرم بر وزن تر) و کاتالاز (۵/۶۵ میلی‌گرم بر وزن تر) در گیاهان آبیاری شده پس از تخلیه ۷۵ درصد رطوبت ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو تیتانیوم حاصل شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان بیان کرد که نانو دی‌اکسید تیتانیوم به دلیل اندازه کوچک ذرات و امکان نفوذ راحت‌تر به برگ می‌تواند بر برخی ویژگی‌های رشد مریم‌گلی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: **ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، گیاه دارویی، نانو ذرات**

مقدمه

مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) گیاهی است چندساله و علفی از تیره نعناعیان که منشأ آن، نواحی شمالی مدیترانه و شمال آفریقا گزارش شده است. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آن توژان (۳۰ تا ۵۰٪)، سینئول (۱۰ تا ۱۵٪)، کامفور (۶ تا ۱۰٪) و بورنئول (۶ تا ۱۴٪) هستند (Omidbaigi, 2005). در سال‌های اخیر گزارش شده است که اسانس مریم‌گلی به‌خصوص برخی ترکیب‌های موجود در آن ازجمله، ۸-۱ سینئول، توژان، کامفور خاصیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان و ضد سرطان دارند (Carta et al., 1996).

خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهنده رشد و عملکرد گیاهان دارویی و زراعی در بین تنش‌های محیطی است به طوری‌که ۴۰ تا ۶۰ درصد زمین‌های کشاورزی جهان را تحت تأثیر قرار داده است (Sankar et al., 2007). در بین تنش‌های محیطی، تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان است که واکنش‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی را در گیاهان القا می‌کند. این نوع تنش

* نگارنده پاسخگو: لیلا فهمیده. پست الکترونیک: leila.fahmideh@yahoo.com and l.fahmideh@uoz.ac.ir

با کاهش توسعه سلول‌ها از رشد و نمو گیاه می‌کاهد، درحالی‌که بر تقسیم سلولی تأثیر کمی دارد و با کاهش بیان ژن‌های دخیل در توسعه دیواره سلولی توانایی سلول‌ها را برای نمو می‌کاهد که این خود، با کاهش توان رشد گیاه در شرایط تنش مطابقت دارد (Beauchamp and Fridovich, 1971).

در شرایط تنش خشکی برای ایجاد جریان آب از خاک به داخل ریشه‌ها، مکانیسم تنظیم اسمزی فعال می‌شود که با هدف، حفظ تورژسانس سلولی، تداوم جذب از محیط ریشه و پایداری غشاها صورت می‌گیرد (Ma et al., 2006). در پدیده تنظیم اسمزی یکی از اسیدآمینه‌های فعال پرولین است که در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش به سزایی دارد (Martin et al., 1993). معمولاً میزان پرولین آزاد در گیاهانی که در حد مطلوب آبیاری می‌شوند بسیار کم و در حدود ۰/۶-۰/۲ میلی‌گرم در گرم ماده خشک است. مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت‌ها تا ۵۰-۴۰ میلی‌گرم در هر گرم ماده خشک افزایش می‌یابد (Rajinder, 1987).

تنش خشکی تولید انواع اکسیژن فعال را (ROS) در کلروپلاست را از طریق برهم خوردن تعادل بین تولید محصولات نوری فتوسنتز و مصرف آن‌ها توسط چرخه کالوین یا کاهش نسبت $NADP^+/NADPH, H^+$ است افزایش می‌دهد (Yang et al., 2006). انواع فعال اکسیژن به دلیل پتانسیل ردوکس بالا از میل الکترون خواهی بالایی برخوردارند و این ویژگی سبب آسیب آن‌ها به کلروفیل، کاهش فعالیت آنزیم‌های بی‌فسفاتاز در چرخه کالوین در پی تخریب کلروفیل و تجمع پراکسید هیدروژن (Amudha et al., 2010) و بیومولکول‌های حیاتی (مانند اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها) می‌گردد که به ترتیب موجب جهش در توالی نوکلئوتیدها، پراکسیداسیون لیپیدی و دناتوره شدن ترکیبات یادشده می‌گردد (Zhang et al., 2003).

سلول گیاهی برای مقابله با اثرات منفی ناشی از انواع اکسیژن فعال به مکانیسم‌های دفاعی ویژه‌ای متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (اسکوربات، گلوتاتیون، آنتوسیانین، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و . . .) و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز و برخی دیگر) مجهز هستند. از همکاری آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، چرخه‌های گلوتاتیون-اسکوربات، مهلر و گزانتوفیل به وجود می‌آیند که مانع از تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود و یا آن‌ها را به‌طور کامل احیا و به آب تبدیل می‌کند (Esfandiari et al., 2009). در این بین استفاده از سازوکارهایی که به کاهش خسارت این تنش منتهی گردد، می‌تواند مفید باشد. به همین دلیل بشر نیاز دارد که از مواد خاصی استفاده کند که در خاک، گیاهان و حیوانات و بدن انسان تجمع نیابند و به‌آسانی در محیط طبیعی تجزیه شوند. علاوه بر این آن‌ها این مواد را نه تنها برای افزایش پایداری گیاه در مقابل شرایط نامساعد زنده و غیرزنده، بلکه برای افزایش عملکرد گیاه و بهبود کیفیت آن نیاز دارند (Walker et al., 2004). یکی از این روش‌ها که توجه محققین به آن معطوف شده است استفاده از تکنولوژی‌های به‌روز و مدرنی هم چون علم نانوتکنولوژی است که جایگاه برجسته‌ای در علوم مختلف ازجمله علوم گیاهی و کشاورزی پیدا کرده است (Scrinis and Lyons, 2007). باوجوداین، تاکنون اثر مثبت یا منفی نانو ذرات بر اکوسیستم‌های خاکی، هوایی و آبی تائید نشده است (USEPA, 2007).

پاسخ گیاهان به نانو ذرات برحسب نوع گونه، مرحله رویشی و ماهیت نانو ذرات متفاوت است (Nair et al., 2010). با این حال اثر مثبت برخی از نانو ذرات از قبیل تیتانیوم در رابطه با برخی از گیاهان به اثبات رسیده است (Mingyu et al., 2007). تحقیق درباره مکانیسم آن در طی تنش نشان می‌دهد که نانو دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز شده و بدین ترتیب از تجمع انواع اکسیژن فعال و آسیب به بخش‌های حیاتی سلول و افزایش ترکیباتی مانند مالون دی‌آلدئید ممانعت نمایند (Hong et al., 2005). در این خصوص کارواجال و همکاران (Carvajal and Alcaraz, 1998) بیان کردند که اگرچه تیتانیوم مشارکت اصلی در متابولیسم گیاهان ندارد اما کاربرد آن به‌صورت محلول‌پاشی روی برگ‌های گیاهان می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان را طی شرایط نامساعد رشدی به‌طور معنی‌داری متأثر گرداند (Simon et al., 1990; Pais, 1983). نتایج مواوینی و همکاران (Moaveni et al., 2011c) روی گیاه *Calendula officinalis* نشان داد که نانو ذرات تیتانیوم در شرایط تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود. از طرفی نتایج تحقیق لو و همکاران (Lu et al., 2002) نشان داد SiO_2 و TiO_2 فعالیت آنزیم نیترات ردکتاز را در سویا و

محلول‌پاشی TiO_2 عملکرد دانه سویا را افزایش داد. گزارش کردند که محلول‌پاشی نانو ذرات نیترات نقره سبب افزایش ترکیبات پلی‌فنولی در گیاه گل‌گاوزبان می‌شود (Salehi, 2008).

کاربرد نانو تیتانیوم در محلول غذایی و یا محلول‌پاشی روی برگ‌های گیاهان باعث افزایش زیست‌توده و رشد گونه‌های مختلف گیاهی شده است؛ بنابراین، نانو دی‌اکسید تیتانیوم ممکن است با افزایش میزان کلروفیل‌ها (Carvajal and Alcaraz, 1998) و فتوسنتز، خصوصاً از طریق افزایش انتقال الکترون از فتوسیستم II به I (Ram et al., 1983)، فعالیت نوری فتوسنتز (Owolade et al., 2008) و جذب عناصر مؤثر در تولید کلروفیل‌ها و فتوسنتز نظیر نیتروژن (Martin et al., 1993)، منیزیم و آهن (Carvajal et al., 1994) را سبب شود.

اگرچه تحقیقات پیشین پتانسیل تأثیر نانو ذرات تیتانیوم را در بهبود عملکردهای فیزیولوژی و مورفولوژی گیاهان گاوزبان (Hydari Romy et al., 2015)، آفتابگردان (Aminian et al., 2017)، ذرت (Berahmand et al., 2012) و اسفناج (Mingyu et al., 2007) تائید کرده‌اند، اما اثر این نانوذره در بهبود عملکرد گیاهان در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده کمتر موردتوجه قرار گرفته است (Omidbaigi, 2005). طبق نظر شائو و همکاران (Shao et al.,2009) تنش خشکی مهم‌ترین تنش غیرزنده است که بر رشد، توسعه و عملکرد گیاهان به‌شدت تأثیر دارد. لذا پژوهش حاضر با هدف مطالعه اثر محلول‌پاشی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و مکانیسم‌های دفاعی در گیاه مریم‌گلی تحت تنش خشکی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور مطالعه اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مریم‌گلی، در سال ۱۳۹۵ در سه تکرار اجرا شد. بافت خاک محل آزمایش لومی شنی بود. مشخصات نانو دی‌اکسید تیتانیوم و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول شماره ۱ و ۲ ارائه شده است.

تیمارهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی نانو دی‌اکسید تیتانیوم در سه سطح صفر (شاهد)، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (Baiazidi Aghdam, 2014) و سطوح مختلف تنش خشکی در سه سطح عدم تنش (آبیاری کامل)، ۵۰ و ۷۵ درصد تخلیه ظرفیت زراعی بود.

جدول ۱. مشخصات نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم

Table 1. Specifications of titanium dioxide nanoparticles

وزن خالص Pure weight (g)	اسیدیته Acidity	چگالی واقعی Real density (g/cm^3)	تراکم توده The mass density (g/cm^3)	سطوح خاص Specific surface area (m^2/g)	اندازه Size (n)	رنگ Color	خلوص Purity
10	6- 6.5	0.24	0.24	240-200	10 – 25	white	>٪99

جدول ۲. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Table 2. Physical and chemical properties of the used soil

بافت Texture	شن Sand	رس Clay	لوم Lome	منیزیم Mn	روی Zn	آهن Fe	پتاسیم K	فسفر P	نیتروژن N	pH
	---------- (%) ----------			---------- ($mg.kg^{-1}$) ----------						
Sand-lome	41	28	31	2.9	3.8	2.41	12.5	9.2	3.3	7.7

بذرهای مورد نظر از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه و در هر گلدان ۲۰ عدد بذر کاشته شد و بعد از رسیدن بوته‌ها به مرحله ۴ برگی عمل تنک کردن انجام و درون هر گلدان ۳ بوته یکسان نگه‌داری شد. پس از استقرار کامل بوته‌ها و ۱/۵ ماه بعد از کاشت، تیمارهای تنش خشکی و محلول‌پاشی با دی‌اکسید تیتانیوم اعمال شد که مدت‌زمان اعمال تیمارها سه هفته بود. نمونه‌برداری از همه برگ‌های گیاه در مرحله گیاهچه‌ای و در یک‌زمان مشخص انجام شد. نمونه برگ‌ها

برای انجام آزمایش‌های مورد نظر با ازت مایع و در دمای منفی ۸۰ (۸۰-) نگه‌داری شدند. برای اندازه‌گیری میزان رطوبت خاک و تعیین زمان آبیاری از دستگاه TDR استفاده شد (Topp and Davies, 1985).

اندازه‌گیری میزان پرولین

به این منظور، مقدار ۰/۱ گرم بافت برگی نگهداری شده در فریزر در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد سائیده و محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در لوله جداگانه دیگری، به دو میلی‌لیتر از عصاره، دو میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین (۱/۲۵ گرم پودر اسید ناین هیدرین را در ۳۰ میلی‌لیتر اسید گلاسیال استیک حل نموده و سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک شش مولار آماده شده به آن اضافه گردید) و دو میلی‌لیتر اسید گلاسیال استیک خالص اضافه گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری قرار گرفته و پس از اضافه کردن چهار میلی‌لیتر تولوئن به هرکدام از لوله‌ها، به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردیدند. پس از تشکیل دو بخش جداگانه، بخش بالایی رنگی، با دقت جدا و در دستگاه اسپکتروفتومتری با طول‌موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پرولین در قسمت بالایی لوله به رنگ زرد متمایل به قرمز دیده شد. میزان پرولین با استفاده منحنی استاندارد و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Bates et al., 1973).

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ با روش پروکازکا و همکاران (Prochazka et al.,1998) و از فرمول‌های زیر محاسبه گردید.

$$Chl\ a = 12.25A663 - 2.79A646 \quad [۱]$$

$$Chl\ b = 21.21A646 - 5.1A663 \quad [۲]$$

$$Total\ Chl = Chl\ a + Chl\ b \quad [۳]$$

سنجش میزان فنل‌ها

مقادیر فنل‌ها در نمونه‌های عصاره گیاهی توسط روش فولین سیکالتو اندازه‌گیری شد (McDonald et al., 2001). بر طبق این روش در لوله آزمایش به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره اتانولی با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر یا محلول اتانولی استاندارد اسید گالیک غلظت ۳۰۰-۲۵ میکروگرم و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو رقیق‌شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰، ۰/۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و مخلوط شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط آزمایشگاه، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. مقادیر فنل تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

عصاره آنزیمی

در این روش ۰/۵ گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموژن شده و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد (pH=۷/۵) محتوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA اضافه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند (Sairam et al., 2002).

سنجش آنزیم کاتالاز

برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (pH=7)، ۰/۱۵ میکرولیتر EDTA، ۵۴۹/۸۵ میکرولیتر آب مقطر را در تیوپ ریخته و ۳۸۲/۵ میکرولیتر آب‌اکسیژنه به آن اضافه شد (۳۸۲/۵ میکرولیتر آب‌اکسیژنه را در ۲/۵ سی‌سی آب مقطر ریخته که آب‌اکسیژنه ۰/۷۵ مولار به دست آید. سپس ۳۰ میکرولیتر در مخلوط واکنش ریخته شد تا آب‌اکسیژنه ۱۵ میلی مولار به دست می‌آمد) و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول‌موج ۲۴۰ نانومتر میزان جذب آن ثبت گردید و پس از سپری شدن زمان یک دقیقه دوباره میزان جذب یادداشت گردید (Beers and Sizer, 1952).

سنجش آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۳۷/۵ میکرولیتر آسکوربات، ۱۱۱۸/۸۵ میکرولیتر آب در تیوپ ریخته شد و ۱۵۳ میکرولیتر آب‌اکسیژنه به آن اضافه شد (آب‌اکسیژنه ۰/۵ میلی‌مولار = ۱۵۳ میکرولیتر آب‌اکسیژنه را در ۱ سی‌سی آب ریخته که آب‌اکسیژنه ۱/۵ مولار به دست آید سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن برداشته و به حجم ۱۰ سی‌سی رسانده شد) و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول‌موج ۲۹۰ نانومتر میزان

جذب آن یادداشت و پس از سپری شدن مدت‌زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر ۲۸۰ میلی‌مول بر سانتیمتر است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Nakano et al., 1981).

سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۸۰۰ میکرولیتر بافر سدیم، ۰/۲ میکرولیتر EDTA، ۵۰ میکرولیتر گایاکول، ۷۹۹/۸ آب به لوله‌آزمایش اضافه شد و ۷۶۵ میکرولیتر آب‌اکسیژنه به آن اضافه گردید (۷۶۵ میکرولیتر آب‌اکسیژنه را در ۵ سی‌سی آب مقطر ریخته که آب‌اکسیژنه ۱/۵ مولار به دست آید. با اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر در مخلوط واکنش، آب‌اکسیژنه ۱۵ میلی مولار به دست می‌آمد) و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول‌موج ۴۷۰ نانومتر میزان جذب آن قرائت گردید و پس از سپری شدن مدت یک دقیقه دوباره میزان جذب ثبت گردید (Urbanek et al., 1991).

سنجش آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش هولی (Holy, 1972) اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا ۲ میلی‌لیتر استات ۰/۲ مولار با pH=۵ ، ۲/۰ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه ۰/۳ درصد (۳۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه را در ۱۰ سی‌سی آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین ۰/۲۰ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد، در حمام یخ مخلوط شدند، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی برگ به این مخلوط واکنش اضافه شد و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول‌موج ۵۳۰ نانومتر میزان جذب آن قرائت گردید

سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش بیوچامپ و فریدوویچ (Beauchamp and Fridovich, 1971) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه شد و سپس ترکیبات زیر EDTA ۰/۱ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرو مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار و ریبوفلاوین ۴ میکرومولار، به ترتیب اضافه گردید. درنهایت با اضافه شدن ۷۹۹ میکرولیتر عصاره تحت روشنایی لامپ فلورسنت واکنش آغاز می‌شود. پس از گذشت ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد .

پس از اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مقدار پرولین و محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی، داده‌های حاصله بر مبنای طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (روش دانکن) شدند. برای این منظور از نرم‌افزار EXCELL و SAS ver 9.1 استفاده شد.

نتایج و بحث

رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های جدول ۳ نشان داد که اثر سطوح مختلف تنش خشکی و نانو دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل تیتانیوم در تنش کم‌آبی بر میزان کلروفیل‌های a، b و کل در سطح ۱٪ درصد معنی‌دار بود. در هر سطح تنش، با کاربرد تیتانیوم، کلروفیل‌های بیشتری نسبت به تخلیه رطوبتی ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد (جدول ۴).

محتوی کلروفیل‌ها در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی (Jiang and Huang, 2001) و تعیین‌کننده سرعت فتوسنتز است (Ghosh et al., 2004). لاولور و کورنیک (Lawlor and Cornic, 2002) گزارش کردند در شرایط تنش خشکی، به نظر می‌رسد گلوتامات که پیش ماده کلروفیل‌ها و پرولین است به پرولین تبدیل‌شده و درنتیجه از محتوی کلروفیل‌ها کاسته می‌شود. کاهش میزان کلروفیل‌ها در اثر تنش خشکی، به علت افزایش تولید اکسیژن فعال باشد (Schutz and Fangmier, 2001). در همین ارتباط شمسی (Shamsi, 2010) گزارش کرد که تنش خشکی به‌طور معنی‌داری محتوای کلروفیل‌های a، b، کلروفیل‌های کل و کارتنوئیدها را کاهش می‌دهد. اصلانی و همکاران (Aslani et al., 2011) اظهار داشتند که تنش آبی اثر معنی‌داری بر مقدار کلروفیل‌های ریحان داشت به‌طوری‌که با کاهش مقدار آب خاک، مقدار کلروفیل‌ها کاهش یافت که با نتایج مطالعه فوق همخوانی دارد. دی‌اکسید تیتانیوم از طریق افزایش فتوسنتز باعث افزایش محصول می‌شود (Chao and Choi, 2005). در آزمایشی استفاده ترکیبی از ذرات نانو SiO_2 و TiO_2 فعالیت نیترات رداکتاز را در سویا افزایش داد و توانایی جذب و استفاده از آب و کود را تشدید نمود (Salehi, 2008). در گزارشی مارتینز-سانجز

و همکاران (Martínez-Sánchez et al., 1993) بیان کردند که افزایش جذب نیتروژن ناشی از محلول‌پاشی با نانو دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش کلروفیل‌ها در گیاه فلفل می‌شود که این امر منجر به افـزایش فتوسـنتز بوته‌های فلفل شد. محلول‌پاشی با نانو پتاسیم موجب افزایش میزان کلروفیل‌های a و b در مقایسه با شاهد شد (Niakan et al., 2014). افزایش تشکیل کلروفیل‌ها، فعالیت آنزیم روبیسـکو و سرعت فتوسنتز را در اسفناج در اثر تیمار با ذرات نانو TiO_2 مشاهده شده است (Zhang et al, 2005). در تحقیق حاضر حداکثر مقدار کلروفیل‌های a و b از آن محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ظرفت زراعی بود. نتایج مطالعه بایزید اقدم (Baiazidi Aghdam, 2014) نشان داد که حداکثر مقدار کلروفیل a و b به ترتیب از آن ظرفیت زراعی با محلول‌پاشی ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم به دست آمد که با نتایج مطالعه فوق همخوانی داشت.

ماده خشک

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که وزن خشک گیاه تحت تأثیر تیمار تنش خشکی و دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل خشکی در نانو تیتانیوم قرار گرفت و اختلاف از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شد. در سطوح کاربرد توأم دی‌اکسید تیتانیوم در هر سطح تنش مقدار ماده خشک افزوده شد، اما بیشترین مقدار ماده خشک در ظرفیت زراعی با محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو تیتانیوم بود، درحالی‌که در هر سطح تنش، با کاربرد تیتانیوم، ماده خشک بیشتری نسبت به تخلیه رطوبتی ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد (جدول ۴).

نتایج اثر تیمارهای آبی مختلف بر مریم‌گلی (*Salvia offsicinalis*) نشان داد که وزن اندام‌های هوایی با تشدید تنش خشکی، کاهش می‌یابد (Lebaschi, and Shariphi, 2004). نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار ۷۵ درصد تخلیه رطوبت سبب کاهش ۲۳/۳۲ درصدی مقدار ماده خشک شد زیرا وقتـی گیاه با خشکی مواجه شود، از شاخ و برگ خود که منابع اصلی تبخیر و تعرق در گیاه هستند، می‌کاهـد و همچنین روزنه‌هایش نیمه بسته یا بسته می‌گـردد و این موضوع موجب کاهش جذب CO_2 می‌شـود و از طرفی گیـاه بـرای جـذب آب، انـرژی زیـادی مصرف می‌نماید (Gorgini Shabankareh et al., 2016). بروز تنش خشکی موجب کاهش سطح برگ‌ها می‌شود درنتیجه جذب نور نیز کاهش می‌یابد و ظرفیت کل فتوسنتزی گیاه کاهش خواهد یافت؛ بنابراین با محدود شدن فرآورده‌های فتوسنتزی در شرایط کمبود آب، تولید بیوماس گیاه کاهش می‌یابد (Ahmed et al., 2003). این نتیجه با نتایج یزدانی بیوکی و همکاران (Yazdani Biuki et al., 2010) در ماریتیغـال و بابایی و همکاران (Babaie et al., 2009) در آویـشن مطابقـت داشت. دی‌اکسید تیتانیوم به‌عنوان یـک عنصـر سودمند باعث افزایش و تحریک رشد مـی‌شـود (Pais, 1983). هم‌چنین کـاربرد آن در محلول‌پاشی روی برگ‌های گیـاه باعث افزایش زیست‌توده و رشد گونه‌های مختلف گیاهی شـده است (Carvajal and Alcaraz, 1998). نتایج زر افشار و همکاران (Zarafshar et al., 2015) نشان داد طی تنش خشکی میزان بیوماس ریشه و ساقه در مقایسه با نهال‌های شاهد به ترتیب حدود سه و دو برابر کاهش یافته است. این در حالی است که با اسپری کردن نانو ذرات تیتانیوم با غلظت ۲۰ppm بر برگ نهال‌های تحت خشکی اختلاف معنی‌داری در بیوماس ساقه، برگ و ریشه در مقایسه با نهال شاهد مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که محلول‌پاشی با دی‌اکسید تیتانیوم (۱۰۰ میلی‌گرم) در بوته‌های تحت تنش خشکی سبب افزایش ماده خشک شد که با نتایج مطالعه بایزید اقدم و همکاران (Baiazidi Aghdam et al, 2014) که بیان کردند که طی تنش خشکی حداکثر مقدار ماده خشک کتان از آن ظرفیت زراعی با محلول‌پاشی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم به دست آمد همخوانی داشت.

کارواجال و آلکاراز (Carvajal and Alcaraz, 1998) گزارش کردند که کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم در محلول غذایی و یا محلول‌پاشی روی برگ‌های گیاهان می‌تواند رشد گونه‌های مختلف گیاهی را افزایش دهد. پیش از این افزایش بیوماس با کاربرد تیتانیوم گزارش شده بود (Nair et al., 2010). ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2005) بیان داشتند که تیمار با ذرات نانو TiO_2 باعـث افـزایش تشکیل کلروفیل، فعالیت آنزیم روبیسکو و سرعت فتوسنتز باعث افزایش وزن خشک گیاه می‌شود.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از تأثیر تنش خشکی و محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم بر صفات مورد ارزیابی مریم‌گلی

Table 3. Analysis of variance data from the influence of drought stress and titanium dioxide spraying on evaluated traits in Sage

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a (mg^{-1}fw)	کلروفیل Chlorophyll b (mg^{-1}fw)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg^{-1}fw)	وزن خشک dry matter (g)	فنول Phenol (mg^{-1}fw)
Drought stress	تنش خشکی	2	3.96**	0.99**	8.83**	5.18**	112.35**
	نانو دی‌اکسید تیتانیوم Titanium Dioxide	2	0.71**	0.37**	0.74**	4.26**	12.97**
D×TiO2	نانو×خشکی	4	0.016**	0.025**	0.06**	.039*	0.37**
Error	خطا	18	0.0026	0.0023	0.0032	.056	.064
CV (%)	ضریب تغییرات (٪)		*1.01*	*3.17*	*1.84*	*4.49*	*2.38*

Table 3. Continued **جدول ۳. ادامه**

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df	کاتالاز Catalase (mg^{-1}fw)	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide Dismutase (mg^{-1}fw)	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate Peroxidase (mg^{-1}fw)	پرولین Proline (mg^{-1}fw)	گایاکول پراکسیداز Guaiacol Peroxidas (mg^{-1}fw)	پراکسیداز Peroxidase (mg^{-1}fw)
Drought stress	تنش خشکی	2	2.86**	9.43**	0.054**	2.28**	0.44**	15.28**
	نانو دی‌اکسید تیتانیوم Titanium Dioxide	2	9.39**	10.81**	0.018**	2.72**	0.026**	5.29**
D×TiO2	نانو×خشکی	4	0.89**	1.83**	0.032**	0.29**	.037**	1.06**
Error	خطا	18	0.91	0.025	0.002	0.052	0.033	0.06
CV (%)	ضریب تغییرات (٪)		*2.86*	*4.10*	*3.24*	*5.98*	*4.20*	*2.46*

* و **: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

* and **: significant at 5% and 1% probability levels, respectively

مقدار پرولین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف خشکی، محلول‌پاشی نانو تیتانیوم و اثـر متقابل تنش خشکی در تیتانیوم بر مقدار پرولین برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). در سطوح کاربرد توأم محلول‌پاشی تیتانیوم در هر سطح تنش خشکی، بر میزان پرولین افزوده شد به‌طوری‌که در سطح تنش ۷۵ درصد تخلیه رطوبت زراعی، با کاربرد تیتانیوم، پرولین بیشتری به دست آمد (جدول ۴). سلول‌های گیاهی با سنتز و تجمع برخی از پروتئین‌ها، قندها (از قبیل گلوکز و ساکارز)، ترکیبات الکلی، سیکلیتول‌ها و اسیدهای آلی آمینواسیدها (از قبیل پرولین) به تنش‌های خشکی و شوری پاسخ می‌دهند (Masinde et al., 2005). پـرولین یکـی از مهم‌ترین اسمولیت‌های تجمع یافته در گیاهان قرار گرفته در معـرض تنش خشکی است (Sanjari Mijani et al., 2015). در شرایط تنش گلوتامیک که پیش‌ساز سنتز کلروفیل‌ها و پرولین است به سمت تولید پرولین پیش می‌رود. چهار دلیل برای افزایش تجمع پرولین در زمان تنش پیشنهاد شده است که عبارت‌اند از (الف) تحریک سنتز آن از اسید گلوتامیک، (ب) کاهش انتقال آن از طریق آوند آبکش، (ج) جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش، و (د) تخریب و اختلال در فرآیند سنتز پروتئین‌ها (Lamas et al., 2002). معمولاً میزان پرولین آزاد در گیاهانی کـه در حـد مطلوب آبیاری می‌شوند بسیار کـم و در حـدود ۰/۲ تا ۰/۶ میلی‌گرم در گرم ماده خشک است ولی مقدار این ماده پس از کاهش آب بافت‌ها تا ۵۰-۴۰ میلی‌گرم در هـر گـرم مـاده خشک افزایش می‌یابـد (Rajinder, 1987). افزایش سطح کل مولکول‌های پروتئین‌های

آب‌دوست سبب ایجاد رابطه متقابل بین پرولین و سطح پروتئین‌های آب‌گریز برقرارشده و از این‌رو پایداری آن‌ها افزایش‌یافته و از تغییر ماهیت آن‌ها جلوگیری می‌کند و آنزیم‌ها نیز به دلیل ساختمان پروتئینی خود تحت تأثیر این سازوکار پرولین قرارگرفته و محافظت می‌شوند (Masinde et al., 2005). نتایج تحقیقاتی نشان داد که با زیادشدن تنش خشکی میزان پرولین در گیاه دارویی بادرنجبویه (Abbaszadeh et al., 2007) و مرزه (Esmaeilpour et al., 2015) افزایش می‌یابد که این نتایج با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که محلول‌پاشی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش ۴۷/۹۶ میزان پرولین در گیاهان قرار گرفته تحت تنش خشکی ۷۵ درصد تخلیه رطوبت زراعی شد درحالی‌که نتایج مطالعه زرافشار و همکاران (Zarafshar et al., 2015) نشان داد اگرچه میزان پرولین در نهال‌های تحت خشکی افزایش پیدا کرد، اما محلول‌پاشی نانو ذرات تیتانیوم طی تنش خشکی تأثیر فزاینده‌ای بر میزان پرولین نداشت. همچنین در تحقیقی امیرجانی و همکاران (Amirjani et al., 2014) بیان شد که با افزایش غلظت نانواکسید روی مقدار پرولین در اندام‌های هوایی گیاه دارویی پریوش افزایش یافت و در غلظت صفر میکرومولار میزان پرولین گیاه کاهش یافته است ولی این کاهش نسبت به شاهد معنی‌دار نبوده است؛ اما در این تحقیق با افزایش غلظت محلول‌پاشی، میزان پرولین افزایش ۲۴/۴۳ درصدی نسبت به شاهد داشت .

مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها

فنل‌ها

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح مختلف تنش خشکی، محلول‌پاشی TiO_2 و اثـر متقابل تنش خشکی در دی‌اکسید تیتانیوم بر مقدار فنل‌های بخش هوایی گیـاه معنی‌دار بود (جدول ۳). در سطوح کاربرد توأم دی‌اکسید تیتانیوم در هر سطح تنش بر میزان فنل‌ها افزوده شد به‌طوری‌که در سطح تنش ۷۵ و ۵۰ درصد تخلیه رطوبت، با انجام محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنل‌های بیشتری به دست آمد (جدول ۴). گیاهان ترکیبات فنلی را در پاسخ به برخی ترکیبات پیام‌رسان که نقش دفاعی مهمی دارند، آزاد می‌کنند. ترکیبات فنلی به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی قادر به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش اکسیداتیو هستند (Sheraphti chaleshtari et al., 2008). مطالعات نشان می‌دهد که رابطه مثبتی بین محتوای فنل‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها وجود دارد (Ghasemzadeh et al., 2010) این ترکیبات با مکانیسم‌های متعددی مانند پاکروبی رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، کلات کردن یون‌های فلزی و یا در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند (Kovacik et al., 2009). وقتی فنل‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در این واکنش‌ها شرکت می‌کنند، به رادیکال فنوکسیل اکسید می‌شوند. رادیکال‌های فنوکسیل از طریق واکنش با آسکوربات به حالت اولیه بر می‌گردند (Silva et al., 2007). در این پژوهش با افزایش تنش خشکی میزان فنل گیاهان افزایش یافت. تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است (Bruni and Sacchetti, 2009).

تنش خشکی با تحریک سنتز فنل‌ها از مسیر اسید شیکیمیک یا اسید مالونیک و با مصرف بخشی از فتواسیمیلات‌های گیاهی و اختصاص کمتر آن به مسیرهای رشدی که با کاهش وزن گیاه همراه است سبب افزایش تجمع فنل‌ها می‌شود که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد (Morello et al., 2005).

در این مطالعه بیشترین میزان فنل‌ها در شرایط تنش خشکی و محلول‌پاشی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم مشاهده شد. در تحقیقی بیان شد بیشترین و کمترین مقدار فنل‌ها به ترتیب مربوط به محلول‌پاشی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و عدم کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم بود که با نتایج این مطالعه همخوانی داشت (Ghorbanpour, 2015).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف تنش خشـکی، محلول‌پاشی تیتانیوم و اثـر متقابل تنش خشکی در تیتانیوم بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT، POD، APX، GPX و SOD) معنی‌دار بود (جدول ۳). در سطوح کاربرد توأم نانو تیتانیوم در هر سطح تنش بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزوده شد به طوری که در سطح تنش ۷۵ درصد تخلیه رطوبت، با کاربرد نانو تیتانیوم، بیشترین میزان CAT، POD، APX، GPX و SOD به دست آمد (جدول ۴). همچنین مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌ها نشان داد که بیشترین فعالیت از آن

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بود. تحقیقات نشان می‌دهد که تنش‌های محیطی مانند خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود. در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاهان تحت خشکی در مقایسه با شاهد بیشتر بود، به طوری که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول اکسیداز، اسکوربات اکسیداز و پراکسیداز تحت تنش خشکی در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب افزایش ۹۳/۲۷، ۹۶/۰۲، ۴۶/۶۶، ۵۰ و ۷۹/۹۱ درصدی نسبت به شاهد داشتند. به نظر می‌رسد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در افزایش تحمل به تنش خشکی نقش مهمی دارند میزان فعالیت آن‌ها در گیـاه بسته به گونه گیاهی و شدت تنش، تغییر می‌کند.

کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول اکسیداز، اسکوربات اکسیداز و پراکسیداز تحت تنش خشکی در گیاهان محلول‌پاشی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو دی‌اکسید تیتانیوم به ترتیب افزایش ۹۳/۲۷، ۹۶/۰۲، ۴۶/۶۶، ۵۰ و ۷۹/۹۱ درصدی نسبت به شاهد داشتند. به نظر می‌رسد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در افزایش تحمل به تنش خشکی دارای نقش مهمی می‌باشند میزان فعالیت آن‌ها در گیـاه بسته به گونه گیاهی و شدت تنش، تغییر می‌کند.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم بر خصوصیات مورد ارزیابی مریم‌گلی

Table 4. Mean comparison of drought stress and titanium dioxide spraying interaction on evaluated traits in Sage

Treatment	تیمارها	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	وزن خشک	فنول
تنش خشکی drought stress	نانو دی‌اکسید تیتانیوم titanium dioxide	Chl a (mg.g^{-1}fw)	Chl b (mg.g^{-1}fw)	Chl.T (mg.g^{-1}fw)	dry matter (g)	Phenol (mg.g^{-1}fw)
ظرفیت زراعی Field Capacity	0	2.23 ^{c}	1.68 ^{c}	3.91 c	5.86 ^{bc}	5.5 ^{g}
	50	2.33 ^{b}	1.87 ^{b}	4.2 b	6.06 ^{b}	9.88 ^{d}
	100	2.45 ^{a}	2.08 ^{a}	4.62 ^{a}	6.76 ^{a}	12.72 ^{b}
تخلیه ۵۰ درصد ظرفیت زراعی Discharge 50% FC	0	1.20 ^{f}	1.15 ^{f}	2.36 ^{g}	4.25 ^{fg}	6.76 ^{f}
	50	1.27 ^{d}	1.61 ^{c}	2.88 ^{d}	4.86 e	11.36 ^{c}
	100	1.28 ^{d}	1.47 ^{d}	2.76 ^{e}	5.86 ^{bc}	14.26 ^{a}
تخلیه ۵۰ درصد ظرفیت زراعی Discharge 75% FC	0	1.09 ^{g}	0.99 ^{g}	2.08 ^{h}	4.1 ^{g}	8.26 ^{e}
	50	1.24 ^{e}	1.32 ^{e}	2.56 ^{f}	4.6 ^{ef}	12.52 ^{b}
	100	1.22 ^{ef}	1.38 ^{e}	2.6 ^{f}	5.4 ^{d}	14.49 ^{a}

جدول ۴. ادامه

Table 4. Continued

Treatment	تیمارها	کاتالاز	سوپر اکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز	پرولین	گایاکول پراکسیداز	پراکسیداز
تنش خشکی drought stress	نانو دی اکسید تینانیوم Titanium dioxide	CAT (mg^{-1}fw)	SOD (mg^{-1}fw)	APX (mg^{-1}fw)	Proline (mg^{-1}fw)	GPX (mg^{-1}fw)	POD (mg^{-1}fw)
ظرفیت زراعی Field Capacity	0	0.38 ^{g}	0.52 ^{f}	0.33 ^{f}	2.68 ^{d}	0.32 ^{e}	0.90 ^{g}
	50	1.55 ^{f}	3.66 ^{d}	0.37 ^{e}	3.41 ^{c}	0.37 ^{d}	1.48 ^{f}
	100	3.13 ^{d}	4.08 ^{c}	0.40 ^{d}	4.049 ^{b}	0.41 ^{c}	3.12 ^{d}
تخلیه ۵۰ درصد ظرفیت زراعی Discharge 50% FC	0	2.42 ^{e}	3.19 ^{e}	0.38 ^{ed}	3.26 ^{c}	0.38 ^{d}	2.45 ^{e}
	50	4.23 ^{bc}	4.45 ^{b}	0.44 ^{c}	3.86 ^{b}	0.45 ^{b}	4.22 ^{bc}
	100	4.24 ^{bc}	4.55 ^{b}	0.48 ^{b}	4.07 ^{b}	0.46 ^{b}	4.26 ^{bc}
تخلیه ۵۰ درصد ظرفیت زراعی Discharge 75% FC	0	4.10 ^{c}	4.16 ^{c}	0.47 ^{b}	4.069 ^{b}	0.44 ^{bc}	4.11 ^{c}
	50	4.31 ^{b}	4.61 ^{b}	0.45 ^{c}	3.90 ^{b}	0.47 ^{b}	4.29 ^{b}
	100	5.65 ^{a}	5.53 ^{a}	0.60 ^{a}	5.15 ^{a}	0.60 ^{a}	4.48 ^{a}

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

In each column, averages with the same letters are not significantly different at 5% level of probability.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به سایر آنزیم‌ها بیشترین فعالیت را در مهار رادیکال‌های فعال اکسیژن داشت که با نتایج زابت و همکاران (Zabet et al., 2003) که بیان کردند با افزایش شدت تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد مطابقت دارد. آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی را علیه رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول تشکیل می‌دهند. سوپراکسید دیسموتاز رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. فعالیت کم آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کارایی چرخه مهلر را در کلروپلاست کاهش خواهد داد. کاهش کارایی این چرخه سبب افزایش شدت صدمات به بیومولکول‌های حیاتی می‌گردد که آسیب به غشاها یکی از مهم‌ترین آن‌هاست. بعلاوه تجمع رادیکال سوپراکسید، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیدازها را کاهش می‌دهد. این آنزیم‌ها نقش ویژه‌ای در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن موجود در سلول دارند (Morello et al., 2005). نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد شد کاهش فعالیت کاتالاز می‌تواند سبب تجمع پراکسید هیدروژن شده و سبب کاهش فعالیت برخی از آنزیم‌های چرخه کالوین نظیر ریبولوزمونوفسفات، کیناز و بی‌فسفاتازها گردد (Asada, 2000). تحقیقات نشان داده است که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه دارویی گاوزبان در شرایط تنش خشکی در مقایسه با شاهد افزایش یافت (GholineZhad et al., 2016). نتایج اصغری‌پور و همکاران (Asgharipour et al., 2016) نشان داد که با افزایش دور آبیاری و اعمال تنش خشکی بیشتر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، پراکسیداز، گایاکول و آسکوربات افزایش می‌یابد که با نتایج این تحقیق همخوانی داشت.

آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در فرآیند جمع‌آوری و خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن هستند. آنزیم کاتالاز فرآیند تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را بدون نیاز به سوبسترای کمکی انجام می‌دهد. آنزیم پراکسیداز با کمک سوبستراهای مختلف به‌عنوان دهنده الکترون و آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از مولکول آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون موجب احیاء پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شوند. کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در چرخه کالوین می‌تواند با کاهش نسبت $NADP^+/NADPH$، H^+ در کلروپلاست سبب افزایش آسیب به بیومولکول‌ها (ازجمله لیپیدها) و تولید فرم‌های فعال اکسیژن شود (Mittler et al., 2004). گائو و همکاران (Gao et al., 2008) نیز نشان دادند که اثر کوانتومی و فعالیت فتوکاتالیستی نانو اکسید تیتانیوم بیشتر از اکسید تیتانیوم غیر نانو است. تحقیقات پیشین نشان داده است که نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌تواند میزان نشت الکترولیت را در سلول گیاهی گلابی (Zarafshar et al., 2015) و اثر مخرب تنش اکسیداتیو، در گیاهان را با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل‌توجهی کاهش دهد (Lei et al., 2008).

پایس (Pais, 1993) گزارش کرد که نانو دی‌اکسید تیتانیوم قادر است فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را در گیاهان به‌طور معنی‌داری متأثر گرداند که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. نتایج مطالعه امیرجانی و همکاران (Amirjani et al., 2014) نشان داد که کاربرد گیاه دارویی پریوش با نانو اکسید روی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول‌پراکسیداز و کاهش تنش اکسیداتیو شد. کاربرد نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دی-آلدئید در گیاه کتان را کاهش داد (Baiazidi Aghdam, 2014).

نتایج زرافشار و همکاران (Zarafshar et al.,2014) بر روی گلابی نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در محلول‌پاشی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر دی‌اکسید تیتانیوم در تنش خشکی به دست آمد درحالی‌که نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین فعالیت در شرایط توأم تنش و محلول‌پاشی مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بود. نتایج مطالعه‌ای بر روی گیاه ذرت (*Zea mays*) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز طی محلول‌پاشی با نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم ۰/۰۳ درصد و کمترین میزان هم متعلق به تیمار شاهد بود که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (Moaveni et al., 2011a).

بر اساس نتایج می‌توان دریافت بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط توأم محلول‌پاشی و تنش خشکی به ترتیب متعلق به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و سپس کاتالاز و پراکسیداز بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Tuna et al., 2008)، کاتالاز و پراکسیداز در

گیاهان تحت تنش‌های محیطی توسط پژوهشگران نشان داده شده است (Sairam and Saxena, 2000). در این شرایط آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز رادیکال‌های ۲۳) و سپس H_2O_2 توسط آنزیم‌هایی چون کاتالاز جمع‌آوری می‌گردد (Sairam and Saxena, 2000).

ازآنجاکه در گیاه مریم‌گلی، با افزایش تنش خشکی از میزان عملکرد ماده خشک کاسته می‌شود، این پژوهش نشان داد که می‌توان با کاربرد نانو دی‌اکسید تیتانیوم ماده خشک بیشتری به دست آورد. در شرایط تنش اکسیداتیو نانو دی‌اکسید تیتانیوم با تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاه مریم‌گلی نقش مهمی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌نمایند و از طرفی با افزایش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی در تولید کلروفیل‌ها به‌خوبی عمل کرده و میزان سنتز کلروفیل‌ها را افزایش داده است. همچنین با افزایش تولید پرولین در شرایط تنش خشکی در این آزمایش می‌توان اظهار داشت که مریم‌گلی راهکار تحمل به تنش را به اجرا گذاشته است.

منابع

Abbaszadeh, B., Sharif, A., Lbaschi, M.H., Naderi, M., Moghadami, F., 2007. The effect of drought stress on proline contents, soluble sugars, chlorophyll and relative water contents of Balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 23, 513-504. [In Persian with English summary].

Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y., Sakuratani, T., 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mung bean subjected to water logging. Plant Science. 163, 117-123.

Aminian, R., Paknejad, M. Hoseini, S.M., 2017. Effect of nano titanium dioxide on yield and yield components of safflower under normal and low irrigation. Environmental Stresses in Crop Sciences. 10(3), 377-390. [In Persian with English summary].

Amirjani, M. R., Askari, M., Askari, P., 2014. Effect of Nano Zinc Oxide on some growth and physiology parameters of *Catharantus roseus*. Journal of Cell and Tissue. 5, 183-173. [In Persian with English summary].

Amudha, J., Balasubramani, G., 2010. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. Biotechnology and Molecular Biology Review. 6, 31-58.

Asada, K., 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society. Biological Sciences. 355, 1419-1431

Asgharipour, M. R., Amiri, A., Cyrusmeher, A. R., Yadollahi, P., Esmailzadeh Behabadi, S., 2016. Effect of drought stress and spraying of Salysilic acid and Chitosan on photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in safflower. Journal of Crops Improvement (Journal of Agriculture). 18, 466-453. [In Persian with English summary].

Aslani, Z., Hassani, A., Rasooli Sadaghiyani, Sefidkon, F., Barin, M., 2011. Effect of two fungi species of arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*) on growth, chlorophyll contents and P concentration in Basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought stress conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 27, 471-486. [In Persian with English summary].

Babaie, k., Amini deheghi, M., Modares sanavi, A. M., Jabari, R., 2009. Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 26, 239-251. [In Persian with English summary].

Baiazidi Aghdam, M. T., 2014. The effect of titanium dioxide nanoparticles under conditions of drought stress on morphological and physiological characteristics of *Linum usitatissimum*. MSc thesis, University of Shahid Madani, Azarbaijan, Iran. [In Persian with English summary].

Baiazidi Aghdam, M.T., Mohammadi, H., Ghorbanpour, M., 2016 Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (Linaceae) under well watered and drought stress conditions. Brazilian Journal of Botany. 39, 139-146.

Bates, L.S., Waldern, R.P., Teave, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39, 205-107.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to *Acrylamide gels*. Annual Journal of Biochemistry. 44, 276-287.

Beers, G.R., Sizer, I.V., 1952. A spectrophotometric method for measuring the break down of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry. 195, 133-140

Berahmand, A.A., Ghafarian Panahi, A.H., Sahabi, H., Feizi, P., Rezvani Moghaddam, N., Shahtahmassebi, Fotovat, A., Karimpour, H., Gallehgir, O., 2012. Effects of silver nanoparticles and magnetic field on growth of fodder maize (*Zea mays*.). Biological Trace Element Research. 149, 419 – 424

Bruni, R., Sacchetti, G., 2009. Factors affecting polyphenol biosyntesis in wild and field grown St.john, s wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). Journal of Molecules. 14, 682-725.

Carta, C., Moretti, M.D., Peana, A.T., 1996. Activity of oil Salvia officinalis against *Botrytis cinerea*. Journal of Essential Oil Research. 8, 399- 404.

Carvajal, M., Alcaraz, C.F., 1998. Why titanium is a beneficial element for plants. Journal of Plant Nutrition. 21, 655-664.

Carvajal, M., Martínez-Sánchez, F., Alcaraz, C.F., 1994. Effect of TiO2 on some physiological activity indicators of *Capsicum annuum* L. Plants. Horticultural Science. 69, 427-432.

Chao, S.H.L., Choi, H.S., 2005. Method for Providing Enhanced Photosynthesis. Korea Research Institute of Chemical Technology, Jeonju, South Korea. 10 p.

Esfandiari, E.A., Shakiba, M.R., Mahboob, S.A., Alyari, H., Shahabivand, S., 2009. The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11, 1916-1922.

Esmaeilpour, B., Jalilvand, P., Hadein. G., 2013. Effects of drought stress and arbuscular mycorrhizal fungi on some morphophysiological traits and yield of savory (*Satureja hortensis* L.). Journal of Agroecology. 5: 177-169. [In Persian with English summary].

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., Rahmat, A., 2010. Antioxidant activities, total henolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules Journal. 15, 4324- 33.

Gholinezhad, R., Sirosmeher, A.R., Fakheri, B.A., 2016. Evaluation of irrigation regimes and use of organic fertilizers on qualitive and quantitive yield of Borage (*Borago officinalis* L.). Journal of Crop Ecophysiology. 39(3), 683-696. [In Persian with English summary].

Ghorbanpour, M., 2015. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. Journal of Plant Physiology. 20, 249-256.

Ghosh, P.K., Ajay, K.K., Bandyopadhyay, M.C., Manna, K.G., Mandal, A.K., Hati, K.M., 2004. Comparative affective of cattle manure, pultry manure, phospocompost and fertilizer- NPK on three cropping system in vertisols of semi- arid tropics. Dry matter yield, nodulation, chlorophyll. Content and Enzyme Activity. Bioresours Technology. 95, 85-93.

Gorgini Shabankareh, H., Fakheri, B.A., Mohammadpuor Vashvaii, R., 2016. Effects of different levels of salinity and drought stress on growth parameters and essential oil of lemon balm (Melissa *officinalis* L.). Iranian Journal of Filed Crop Science. 46(4), 673-686**.** [In Persian with English summary].

Gao, Z., Ouw, L.S., Zhong, Q., 2006. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. Plant Physiology and Biochemistry. 44, 828-836

Holy, M.C., 1972. Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. Journal of Plant Physiology. 50, 15-18

Hong, F.S., Zhou, J., Liu, C., 2005. Effect of Nano-TiO2 on photochemical recation of chloroplasts of spinach. Biological Trace Element Research. 105, 269-280

Hydari Romy, R., Moaveni, P., Hoseinpour Darvishy, H., Arefrad, M., 2015. Response of Some Morpho-physiological Characteristics of Borago (*Borago officinalis*) to Nano Particles of Titanium Spraying. Journal of Crop Ecophysiology. 10: 875-890. [In Persian with English summary].

Jiang, Y., Huang, N., 2001. Drought and heat sress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antiaxdant metabolism and lipid peroxidation. Crop Science. 41, 436-442.

Kovacik, J., M. Backor, Strnad, M., Repcak, M., 2009. Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. Plant Cell Report. 28, 135-143.

Lamas, A., Ullrich, C.I., Sanz, A., 2002. Cadmium effects on transmembrance electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa*) roots. Plant and Soil. 219, 21-28.

Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic cabon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant, Cell and Environment. 25, 275-294.

Lebaschi, M. H., Shariphi, A., 2004. Growth indices of some medicinal plants under different water stresses. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 20(3), 249-261. [In Persian with English summary].

Lei, Z., Su, M.Y., Wu, X.C., Qu, C.X., Chen, L., Huang, H., Liu X.Q., Hong, F.S., 2008. Antioxidant stress is promoted by Nano-anatase in spinach chloroplasts under UV- Beta radiation. Biological Trace Element Research. 121: 69–79.

Lu, C.M., Zhang, C.Y., Wu, J.Q., Tao, M.X., 2002. Research of the effect of nanometer on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. Soybean Science. 21, 168-172

Ma, Q. SH., Niknam, R., Turner, D. W., 2006. Response of osmotic adjustment and seed yield of *Brassica napus* and *Brassica jounce* to soil water deficit at different growth stages. Australian Journal of Agricultural Research. 57, 221-226.

Martin, M., Micell, F., Morgan, J. A., Scalet, M., Zerbi, G., 1993. Synthesis of osmotically active substances in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. Journal of Agronomy and Crop Science. 171, 176–184.

Martínez-Sánchez, F., Nunez, M., Amoros, A., Gimenez, J.L., Alcaraz, C.F., 1993. Effect of titanium leaf spray treatments on ascorbic acid levels of *Capsicum annuum* L. fruits. Journal of Plant Nutrition. 16, 975-981.

Masinde, P.W., Stützel, H., Agong, S.G., Frickle A., 2005. Plant growth, water relations and transpiration of spider plant (*Gynandropsis gynandra*) under water limited conditions. Journal of the American Society for Horticultural Science. 130, 469-477.

McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., Robards. K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chem. 73, 73-84.

Mingyu S., Hong F., Liu C., Wu X., Liu X., Chen L., 2007. Effects of nano-anatase TiO2 on absorption, distribution of light and photo reduction activities of chloroplast membrane of spinach. Biological Trace Element Research, 118, 120– 130.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Vanbreusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science. 9, 490–498.

Moaveni, P., Lotfi, M., Aliabadi Farahani, H., Maroufi, K., 2011a. Effect of spraying TiO2 nano particles on some of physiological and chemical parameters in maize (*Zea mays* L.). International Journal of Biosciences. 1, 63-67.

Moaveni, P., Valadabadi, S.A., Aliabadi Farahani, H., Maroufi, K., 2011c. Nanoparticles TiO_2 spraying affected on calendula (*Calendula Officinalis* L.) under field condition. Advances in Environmental Biology. 5, 2242-2244.

Morello, J.R., Romero, M.P., Ramo, T., Motilva, M.J., 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonialyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. Plant Science. 168, 65-72.

Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Sakthi Kumar, D., 2010. Nano particulate material delivery to plants. Plant Science. 179, 154–163.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascarbate specific peroxidases in spinach Chloroplasts. Plant cell physiology. 22, 867-880

Niakan, M., Tavan, T., Norinia, A., 2014. Effect of nano-potassium fertilizer on growth factors, photosynthetic system and protein content in Wheat (*Triticum aestivum*, N8019). Journal of Plant Environmental Physiology. 14(9), 71-61. [In Persian with English summary].

Omidbaigi, R., 2005. Production and Processing of Medicinal Plants, Astan Quds Razavi Press, Volume 3. 400p. [In Persian].

Owolade, O. F., Ogunleti, D. O., Adenekan, M. O., 2008. Titanium dioxide affects diseases, development and yield of *Edible cowpea*.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 7, 2942-2947

Pais, I., 1983. The biological importance of titanium. Journal of Plant Nutrition. 6, 3-131

Prochazka, S., Machaackova, I., Kreekule, J., Sebanek, J., 1998. Plant physiology. Academia. Praha 484 pp.

Rajinder, S.D., 1987. Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent dehydration in *Torula rulis*. Plant Physiology. 83, 816-819.

Ram, N., Verloo, M., Cottenie, A., 1983. Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to foliar spray of titanium. Plant and Soil. 73, 285-290.

Sairam, R.K., Saxena, D.C., 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science. 184, 55-61.

Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava. G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science. 163, 1037-1046.

Salehi, M., 2008. Pretreatment effect of nanosilver on germination and seedling growth of wheat under salt stress. Proceeding of 1th Iranian Congress in Seed Sciences and Technology, Gorgan, Iran, 12 December: 358p. [In Persian with English summary].

Sanjari Mijani, M., Sirousmehr, A., Fakheri, B. 2015. The effects of drought stress and humic acid on some physiological characteristics of Roselle (*Hibiscus sabdarifa*). Journal of Crops Improvement (Journal of Agriculture). 17(2), 414-403. [In Persian with English summary].

Sankar, B.E., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Panneerselvam, R., 2007. Drought induced biochemical modification and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* Moench. Acta Botanica Croatica. 66, 43-56.

Schutz, H., Fangmier, E., 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to elevated CO_2 and water limitation. Environmental Pollution. 114: 187-194.

Scrinis, G., Lyons, K., 2007. The emerging nano-corporate paradigm: Nanotechnology and the transformation of nature, food and Agri-food systems, International Journal of Sociology of Food and Agriculture. 15: 22-44.

Shamsi, K., 2010. The effect of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrate and cholorophyll of bread wheat cultivars. Journal of Animal and Plant. 3: 1051-1060.

Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Panneerselvam, R., Shao, M.A., 2009. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture and the Eco environment in arid regions of the globe, Crit. Review Biotechnol. 29: 131-151.

Sheraphti chaleshtari, F., Sheraphti chaleshtari, R., Momeni, M., 2008. Comparison of the antimicrobial effects of the ethanolic and aqueous extracts of *Scrophularia striata* on *Escherichia coli O157:H7* in vitro. Journal of shaherKord of medical sciences. 10(4): 32-37. [In Persian with English summary].

Silva, M. A., Jifon, J. L., Silva, J. A. G., Sharma, V., 2007. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. Brazilian Journal of Plant Physiology. 19: 193-201

Simon, L., Balogh, A., Hajdu, F., Pais. I., 1990. Effect of titanium on the carbohydrate content and phospho-fructokinase activity of tomato. In: Pais I. (ed.): New results in the research of hardly known trace elements and their importance in the international geosphere-biosphere program. University of Horticultural Food Science, Budapest. 49-84.

Topp, G. G., Davies, J. L., 1985. Time domain reflectometry and its application to irrigation scheduling. Advances in Irrigation. 3: 107-127.

Tuna, A., Kaya, C., Dikilitas, M., Higgas, D., 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. Environmental and Experimental Botany. 62, 1-9.

Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E., Herka, K., 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by Botrytis cinerea polyglacturonase. Acta Physiology Plantarum. 13, 43-50

USEPA, 2007. Nanotechnology White Paper. EPA 100/B-07/001. Washington, DC 20460: Science Policy Council, U.S. Environmental Protection Agency. 120 pp.

Walker, R., Morris, S., Brown, P., Gracie, A., 2000. Evaluation of Potential for Chitosan to Enhance Plant Defense. Publication No. 04.of Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 755 pp.

Yang, F., Hong, F., You, W., Liu, C., Gao, F., Wu, C., Yang, P., 2006. Influence of nanoanatase TiO2 on the nitrogen metabolism of growing spinach, Biological Trace Element Research. 110, 179-190.

Yazdani Buicki, R., Rezvani Moghadam, P., Khazaei, H.R., Ghorbani, R., and Asterai, A. R., 2010. Effects of Salinity and Drought Stresses on Germination Characteristics of Milk Thistle (*Silybum marianum*). Journal of Iranian Field Crop Research. 8, 12-19. [In Persian with English summary].

Zabet, M., Hoseinzade, A.H., Ahmadi, A., Khialparast, F., 2003. Effect of water stress on different traits and determination of the best water stress index in mung bean (*Vigna radiata*). Iranian Journal of Agricultural Science. 34(4), 889-898. [In Persian with English summary].

Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askari, F., Hosseini, M., Rahaie, M., 2015. Effects of TiO2 NPs on alleviation of drought negative effects in wild pear seedlings. Journal of plant ecosystem conservation. 3(6), 81-94. [In Persian with English summary].

Zhang, L., Hong, F., Lu, S., Liu, C., 2005. Effects of nano-TiO2 on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biol. Trace Element Reserch. 105, 83- 89.