تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد چهاردهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۰
۵۵۷-۵۶۷
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2020.2935.1755

مقاله پژوهشی

پاسخ گیاه دارویی به‌لیمو (*Aloysia citriodora* L.) به تیمارهای نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم و شوری

مهیار گرامی[1]، پرستو مجیدیان[2*]، اکرم قربانپور[3]، نسیم براتی[4]

۱. استادیار، عضو هیئت علمی مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

۲. استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۳. دانش آموخته دکتری، گروه زیست شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران

۴. فارغ‌التحصیل ارشد، مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۳

چکیده

استفاده از فناوری نانو جهت افزایش تولید گیاهان دارویی یکی از اهداف مهم بهره‌وری گیاهان است که در فرآیندهای رشد گیاهان مؤثر است. به‌کارگیری نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در صنایع کشاورزی و غذایی به دلیل داشتن نقش محافظتی، افزایش دادن مقدار فتوسنتز در گیاه و نقش مقاومتی گیاهان در تحمل به تنش‌ها می‌تواند مفید باشد. در این پژوهش به‌منظور بررسی اثر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی به‌لیمو در سطوح مختلف شوری آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم در پنج سطح (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام) و فاکتور دوم شامل شوری در سه سطح (صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار) اعمال گردید. نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل همبستگی و رگرسیونی صفات موردمطالعه نشان داد که عملکرد وزن خشک اندام هوایی بیشترین اثر مستقیم را بر عملکرد وزن خشک اندام هوایی با ضریب تبیین (۰/۸۲) داشت. نتایج نشان داد که تنش شوری باعث کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه گردید ولی اثر ساده نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم روند افزایشی را نشان داد. مقایسه میانگین صفت مقدار کلروفیل (a، b و کل) حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم صفات موردنظر روند افزایشی معنی‌داری را نشان داد اما با افزایش سطوح شوری محتوای کلروفیل کاهش یافت. اثر برهمکنش این دو فاکتور حاکی از آن بود که در غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار شوری با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم مقدار کاروتنوئید و آنتوسیانین روند مطلوبی را نشان داد که بیشترین تأثیر مربوط به غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام الیسیتور بود.

واژه‌های کلیدی: **القاگر، تنش، فیتوشیمیایی، فیزیولوژی، مورفولوژیکی**

مقدمه

گیاه دارویی به‌لیمو با نام علمی *Aloysia citriodora* L. از خانواده شاه‌پسند (Verbenacea) درختچه‌ای به ارتفاع ۱/۵ تا ۲ متر است (Kishore et al., 2011). برگ‌ها و اندام رویشی این گیاه حاوی اسانس است و عمده‌ترین ترکیبات اسانس در برگ به‌لیمو لیمونن، ۱ و ۸ سینئول، ژرانیال، نرال و بتاگوانین گزارش شده است (Lira et al., 2008). این گیاه دارویی خواص متعددی دارد که ازجمله می‌توان از آن در درمان سوءهاضمه، نفخ، دردهای عصبی، سردردهای یک‌طرفه، سرگیجه و علائم سرماخوردگی استفاده کرد. امروزه این گیاه در شمال کشورمان نیز مورد کشت و کار قرار می‌گیرد.

* نگارنده پاسخگو: پرستو مجیدیان. پست الکترونیک: p.majidian@areeo.ac.ir

شوری یکی از تنش‌های غیر زیستی مهم در جهان است که سالانه بر روی عملکرد محصولات گیاهی اثرات مخربی برجا می‌گذارد (Zhang et al., 2011). به‌طورکلی، بخشی از اراضی ایران جزء اراضی شور محسوب می‌شوند که از یکی از معضلات عمده زراعت در بین کشاورزان این مناطق است. در اثر شوری خاک تغییراتی در سیستم‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ایجاد می‌شود که این در اثر محرک‌های خارجی می‌توان این تغییرات را کنترل کرده و تحمل به تنش را در گیاه بالا برد (Bybordi, 2012). ازاین‌رو، نیاز مبرم به مطالعات تحقیقاتی بیشتر در زمینه عملکرد گیاهان مقاوم به شوری و یا بالا بردن تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزنده ازجمله شوری در حال افزایش است.

یکی از راه‌های کاهش اثرات زیان‌بار تنش‌های غیر زیستی ازجمله شوری، استفاده از روش‌های تغذیه معدنی ازجمله تیتانیوم است که بی‌شک درصورتی‌که در مقیاس نانو به کار گرفته شوند، نه‌تنها از خصوصیات منحصربه‌فرد نانو ذرات سود برده می‌شود، بلکه در صورت استفاده با غلظت‌های مناسب مقرون‌به‌صرفه بوده و اثر سمیت در پی نخواهد داشت (Qi et al., 2013). در این راستا، تیتانیوم (T_i) یک عنصر واسطه است که نهمین عنصر فراوان در پوسته‌ی زمین محسوب می‌شود (Ahmad et al., 2018). تیتانیوم به‌عنوان یک عنصر سودمند باعث افزایش تحریک رشد شده و میزان جذب آن در گیاهان متفاوت بوده و بستگی به نوع گیاه، ترکیب شیمیایی و اندازه این ذرات دارد (Ghormade et al., 2011). نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم شکل دیگری از تیتانیوم در محیط است و به‌طور وسیعی در صنایع کشاورزی و غذایی مورداستفاده قرار می‌گیرد. از این نانوذره به دلیل نقش‌های محافظت‌کننده در برابر نور و همچنین افزایش رشد و بیوماس گیاه، افزایش فتوسنتز و میزان کلروفیل کل در گیاهان استفاده می‌شود (Lyu et al., 2017). بعلاوه، نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم با جذب بیشتر نور و فعالیت آنزیم روبیسکو سبب افزایش تبدیل مواد غیر آلی به مواد آلی و همچنین افزایش وزن تر و خشک گیاه می‌شود (Koo et al., 2010).

بر اساس تحقیقات انجام‌شده در گذشته، اعمال تیتانیوم در محلول‌های غذایی از طریق کاهش اثرات سمی عناصر دیگر باعث افزایش رشد می‌شود (Haghighi and Daneshmand, 2013). اثرات سمیت تیتانیوم برای انسان گزارش نشده است؛ اما این عنصر برای رشد گیاه و باکتری‌ها در بعضی از غلظت‌ها سمی است و در غلظت‌های کم برای رشد گیاه مؤثر است. به‌علاوه، در تحقیقی، ایلقنیجی و همکاران (Elghniji et al., 2014) نتیجه گرفتند که خاصیت فتوکاتالیستی دی‌اکسید تیتانیوم قادر به بر طرف کردن خاصیت سمی CP-۴ در گوجه‌فرنگی، شلغم و پیاز آبیاری شده با فاضلاب تحت تابش مستقیم نور آفتاب می‌گردد (Elghniji et al., 2014). نقش نانوذره تیتانیم به‌عنوان یک محرک در گیاهان، موضوع پژوهش‌های مهم قرار گرفته است. نقش اگزوژن این ترکیب در بهبود تنش شوری بر برخی از گیاهان موردبررسی قرار گرفته است.

اخیراً، مطالعاتی در زمینه بررسی اثرات تنش‌ها و القاگرها بر روی گیاه دارویی به‌لیمو انجام‌شده است. برای مثال، اثر تنش شوری بر روی ترکیبات روغن ضروری در گیاه به‌لیمو موردبررسی قرار گرفت که نتایج بیانگر اثر معنی‌دار شوری بر صفت مذکور بود (Amini et al., 2016). در تحقیق دیگر، اثر متقابل سالیسیلیک اسید و تنش خشکی بر روی ویژگی‌های بیوشیمیایی و عملکرد روغن ضروری گیاه به‌لیمو ارزیابی شد که میزان ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید بیشترین تأثیر روی نرخ رشد، پارامترهای فیزیولوژیکی و عملکرد روغن ضروری گیاه را نشان داد (Dianat et al., 2016). در مطالعه دیگر، اثر سالیسیلیک اسید بر روی صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه به‌لیمو در شرایط مزرعه‌ای و این ویترو موردبررسی قرار گرفت و درنهایت کاربرد غلظت‌های پایین سالیسیلیک اسید به دلیل اثر بالقوه افزایشی روی رشد رویشی گیاه در هر دو شرایط کشت پیشنهاد شد (Nourafcan, 2018).

با توجه مزیت‌های القاگر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم و اثرات مخرب تنش شوری، در این تحقیق به مطالعه‌ی بررسی اثر برهمکنش شوری و نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه به‌لیمو (*Aloysia citriodora* L.) پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از طرح آزمایشی پایه کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با سه تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام و سه سطح شوری با غلظت‌های صفر، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار بود. در این آزمایش نشاهای سه‌ماهه گیاه دارویی به‌لیمو از گلخانه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج تهیه گردیدند. نشاها پس از

انتقال به گلخانه مؤسسه آموزش عالی سنا در گلدان‌های پلاستیکی با بستر حاوی پیت موس و پرلیت کشت داده‌شده و به اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. نیاز تغذیه‌ای گیاه از طریق هوگلند اعمال گردید.

پس از سازگاری گیاهچه‌ها به مدت دو هفته در بستر پرلیت و پیت موس، غلظت‌های مختلف نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم به‌صورت محلول‌پاشی (میانگین اندازه نانوذره نانومتر، محدوده سطح مخصوص ۲۰۰ مترمربع بر گرم و درجه خلوص ۹۹/۹ درصد) به گیاه اعمال شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، تیمار شوری به‌صورت آبیاری به گیاه اعمال شد. این عمل طی سه مرحله با بازه زمانی مشخص اعمال گردید. پس از آخرین مرحله تیماردهی، گیاه کامل برداشت، شسته شده و ارتفاع گیاه با استفاده از خط‌کش برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک گیاه، اندام هوایی و ریشه هر نمونه به‌طور جداگانه در پاکت و در آون در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد. وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی برحسب گرم با استفاده از ترازوی Sartatius مدل B1150S با دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شدند.

برگ‌ها و ریشه‌های یکنواخت سه گیاه در هر تکرار نیز برای ارزیابی ویژگی‌های فیزیولوژیکی جمع‌آوری و پس از شستشو به‌سرعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند تا مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل، کاروتنوئید و آنتوسیانین در آن‌ها اندازه‌گیری شوند.

سنجش رنگیزه‌های نوری

برگ‌های جوان و با سن مشابه از تکرارهای مختلف آزمایش تفکیک‌شده و وزن آن‌ها با ترازو تعیین شد. سپس جهت هموژن کردن، برگ‌های توزین شده با استن ۸۰٪ در هاون چینی مخلوط شدند. در مرحله بعد، با عبور دادن هموژن برگ‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۲، محلول یکنواخت‌تری به دست آمد که جذب آن در طول‌موج‌های ۶۶۳/۲ و ۶۴۶/۸ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. واحد اندازه‌گیری کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (a+b) برحسب میلی‌گرم بر لیتر است و معادلات مربوطه به شرح زیر است (Lichtenthaler, 1987).

$$Chl_a\ (mg.l^{-1}) = 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8} \quad [۱]$$

$$Chl_b\ (mg.l^{-1}) = 21.51 \times A_{646.8} - 5.10 \times A_{663.2} \quad [۲]$$

$$Chl\ (a+b) = Chl_a + Chl_b \quad [۳]$$

در معادله‌های بالا $A_{646.8}$ و $A_{663.2}$ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی میزان جذب در طول‌موج‌های ۶۴۶/۸ و ۶۶۳/۲ است. غلظت کلروفیل با توجه به حجم عصاره و وزن نمونه‌ها بر اساس واحد میلی‌گرم بر گرم وزن تر ($mg.g^{-1}$ FW) بیان شد. برای سنجش مقدار کاروتنوئیدها میزان جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر جذبی برحسب میلی‌گرم بر لیتر، در رابطه زیر گذاشته شد (Lichtenthaler, 1987).

$$C(x+c) = (1000 \times A_{470} - 1.8 \times Chl_a - 85.52 \times Chl_b) / 198 \quad [۴]$$

حروف اختصاری در معادله بالا بیانگر کلمات ذیل است: C: Carotenoid، X: Xanthophyll، A_{470}: جذب در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر، Chl_a و Chl_b به ترتیب کلروفیل‌های a و b

سنجش میزان آنتوسیانین

ابتدا، میزان ۰/۰۲ گرم از بافت خشک گیاهی با ۴ میلی‌لیتر محلول اسیدکلریدریک ۱٪ متانول در یک هاون چینی ساییده شد. پس از نگهداری محلول به‌دست‌آمده در یخچال به مدت ۲۴ ساعت، فاز رویی محلول با استفاده سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد. سپس، میزان جذب محلول‌های موردنظر در طول‌موج‌های ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. محتوای آنتوسیانین با استفاده از رابطه زیر به دست آمد (Mita et al,. 1997).

$$A = A_{530} - (0.25 \times A_{657}) \quad [۵]$$

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس، مقایسه میانگین، همبستگی ساده و رگرسیون گام‌به‌گام با استفاده از نرم‌افزار SAS ver 9.4 انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد محاسبه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس اثر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر وزن تر و خشک اندام هوایی و اندام ریشه گیاه به‌لیمو در شرایط شوری نشان داد که به‌کارگیری اثر ساده نانوذره تیتانیوم و

شوری بر صفات موردنظر معنی‌دار بوده ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نیست (جدول ۱).

مقایسه میانگین صفت وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه نشان داد که با افزایش سطوح شوری وزن تر و خشک اندام هوایی و اندام ریشه کاهش یافت که این روند کاهشی معنی‌دار بود (شکل ۱)

با افزایش سطوح نانوذره تیتانیوم، وزن تر اندام هوایی نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت که این روند فقط در سطح ۲۰۰ پی‌پی‌ام نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم معنی‌دار بود. همچنین با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، وزن خشک ریشه افزایش معنی‌دار یافت اما در خصوص وزن تر ریشه این روند معنی‌دار نبود (شکل ۲).

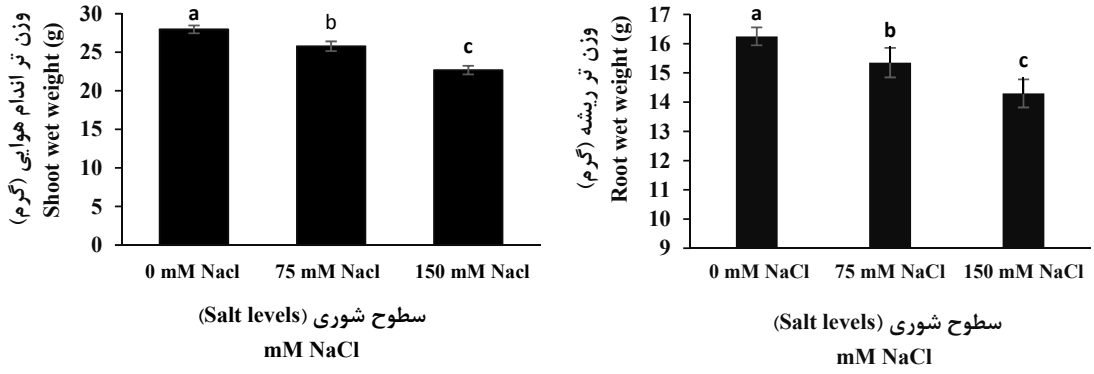
جدول ۱. آنالیز واریانس وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه گیاه به‌لیمو تحت تیمار شوری و دی‌اکسید تیتانیوم

Table 1. The variance analysis of wet and dry weight of root and shoot of *Aloysia citriodora* L. under salt stress and titanium dioxide

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	وزن تر ریشه Root wet weight	وزن تر اندام هوایی Shoot wet weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
Titanium (T)	تیتانیوم	4	12.8491**	3.0531*	14.1523**	2.1505**
Salt (S)	شوری	2	16.3208**	48.4606**	47.4922**	15.2322**
T × S	تیتانیوم×شوری	8	0.6756 ns	2.5426 ns	1.3746 ns	0.2821 ns
Error	خطا	30	0.5875	1.4044	1.4395	0.3411
CV%	ضریب تغییرات		*7.0051*	*7.7660*	*4.4408*	*8.0502*

*، ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ns غیر معنی‌دار.

* and ** showe the significance level of 0.05 and 0.01 respectively and ns indicates non significance level



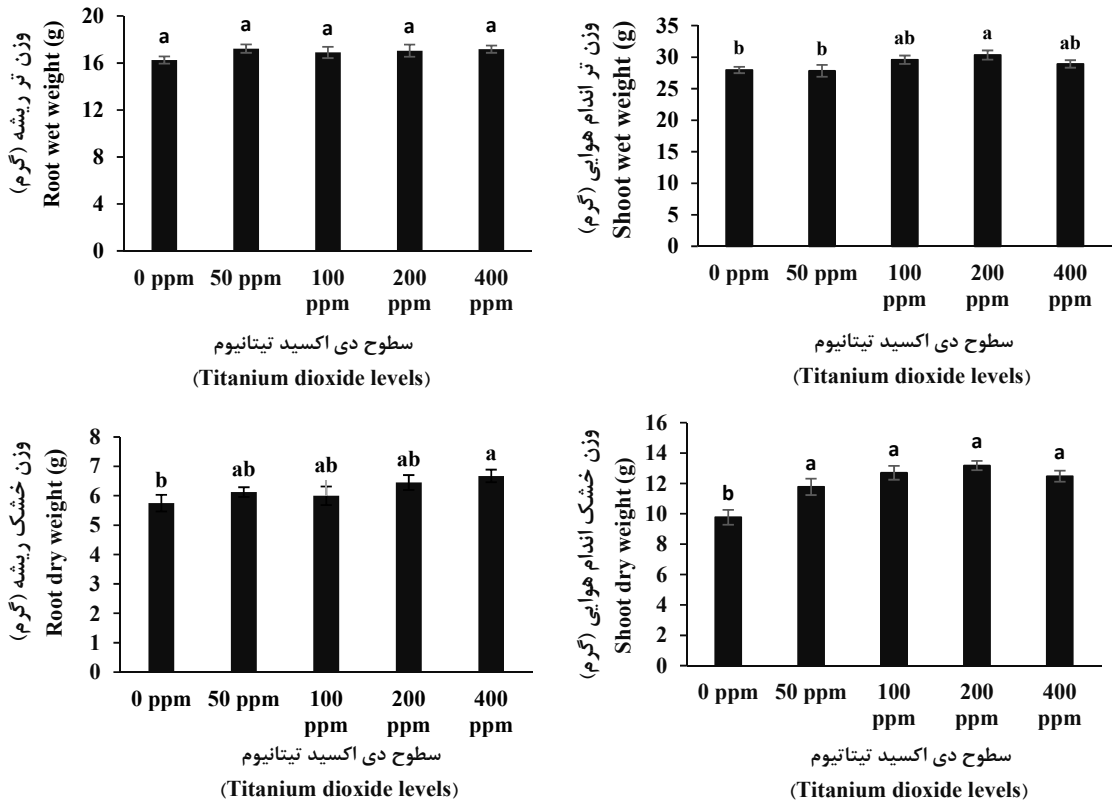
شکل ۱. اثر تیمار شوری بر وزن خشک و تر اندام هوایی و ریشه گیاه به‌لیمو

Fig.1. the effect of salt treatment on dry and wet weight of root and shoot of *Aloysia citriodora* L. under salt stress

همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و تیتانیوم بر وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه روند معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). در مطالعه‌ای، تنش شوری سبب کاهش پارامترهایی از قبیل سرعت رشد نسبی، وزن تر و خشک برگ‌ها و ساقه‌ها شد، ولی بر رشد ریشه اثر معنی‌داری نداشت (Hasni et al., 2009). پژوهش خان (Khan, 2006) نشان داد که محلول‌پاشی دی‌اکسید تیتانیوم در گیاه گوجه‌فرنگی (غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار) تحت شرایط شوری منجر به افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و بهبود شاخص‌های تعداد برگ و سطح برگ نسبت به نمونه شاهد گردید. به‌علاوه، اثر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر روی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) حاکی از افزایش ارتفاع گیاه،

وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه تحت تنش خشکی بود (Fazeli-Nasab et al., 2018). در مطالعه مشابه دیگر، پاسخ گیاه گل‌گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis*) به محلول‌پاشی نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم به‌صورت افزایش ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک گیاه گزارش شد (Heydari Romy et al., 2017).

به‌طورکلی، تنش شوری با ایجاد فشار اسمزی در گیاه سبب اختلال در جذب آب و عناصر غذایی در گیاه می‌شود. تنش شوری درمجموع سبب کاهش فاکتورهای اصلی رشد نظیر حجم سلول، تقسیم سلولی، دیواره‌سازی سلول، وزن تر و خشک گیاه شده و همچنین با کاهش فتوسنتز، سبب کاهش رشد و تولید مواد آلی می‌شود (Yang et al., 2006). بر طبق نتایج به‌دست‌آمده از تحقیقات پیشین، یکی از ویژگی‌های بارز سازگاری در گیاه در مواجهه با شرایط تنش، رشد کم در گیاه است، بدین‌صورت که سلول‌های گیاهی انرژی خود را بیشتر به سمت مولکول‌های محافظت‌کننده در برابر تنش هدایت می‌کنند (Manivannan et al., 2008). استفاده از محرک‌های رشد خارجی نظیر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثرات مثبت و افزایشی بر سرعت فتوسنتز داشته و درنهایت رشد گیاه را افزایش خواهد داد.



شکل ۲. اثر تیمار دی‌اکسید تیتانیوم بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه به‌لیمو تحت تنش شوری

Fig. 2. The titanium dioxide treatment effect on wet and dry weight of root and shoot in *Aloysia citriodora* L. under salt stress

نتایج بررسی اثر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی به‌لیمو در سطوح مختلف شوری

نتایج تجزیه واریانس اثر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و مقدار آنتوسیانین گیاه به‌لیمو در شرایط شوری نشان داد که به‌کارگیری اثر ساده نانوذره تیتانیوم و شوری و اثرات متقابل آن‌ها بر صفات موردنظر (رنگیزه‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین) در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

مقایسه میانگین صفت مقدار کلروفیل (a، b و کل) حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم صفات موردنظر روند افزایشی معنی‌داری را نشان داد اما با افزایش سطوح شوری محتوای کلروفیل کاهش یافت. مقایسه میانگین برهم‌کنش نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم و شوری نشان داد که در سطح ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌مولار شوری با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، محتوای کلروفیل افزایش یافت (شکل ۳).

یکی دیگر از فاکتورهای گیاهی تحمل به شوری، محتوای کلروفیل برگ است (Bolat et al., 2006). یکی از دلایل کاهش رشد و فتوسنتز در گیاه، افزایش میزان گونه‌های فعال و آزاد اکسیژن در کلروپلاست است که تخریب کلروفیل و غشاء کلروپلاست را در پی دارد. علاوه بر نقش تخریبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آنزیم کلروفیلاز نیز با جدا کردن زنجیره فیتولی از حلقه پورفیرین سبب تخریب مولکول کلروفیل می‌شود (Zhao et al., 2007). همچنین، ازآنجایی‌که اسید گلوتامیک برای سنتز کلروفیل و پرولین لازم است، ازاین‌رو، این احتمال وجود دارد که کلرید سدیم حاصل از تنش شوری اسید گلوتامیک را جهت سنتز پرولین به سمت اندام‌های هوایی هدایت کند و از دسترس کلروفیل خارج سازد که منجر به کاهش محتوای کلروفیل خواهد شد (Qasim et al., 2003).

گزارش شده است که نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم جذب موادی مانند نیتروژن و منیزیوم را افزایش داده و میزان تولید کلروفیل را بالا می‌برد (Zheng et al., 2007). با افزایش میزان کلروفیل، میزان فتوسنتز افزایش‌یافته و درنهایت منجر به افزایش رشد ریشه و جذب بیشتر عناصر معدنی می‌گردد (Huang et al., 2014). تیتانیوم از دو طریق سبب افزایش فتوسنتز می‌شود. یکی به روش تغییر در فعالیت پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز، ازجمله فروکتوز ۱ و ۶ بی فسفاتاز که در چرخه کلوین کارایی دارد و آنزیم‌های گلوکوایوژناز و تغییر در چرخه پنتوز فسفات اکسیداز که در متابولیسم کربوهیدرات نقش دارد و دوم به روش افزایش میزان کلروفیل برگ که باعث تحریک و افزایش فتوسنتز می‌گردد (Kiss et al., 1985; Gao et al., 2006). افزایش میزان کلروفیل و همچنین وزن تر و خشک با مطالعات پیشین در مورد اثر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم روی اسفناج (Zheng et al., 2005) گندم (Feizi et al., 2005) و مریم‌گلی (Mazarie et al., 2019) همخوانی داشت.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر، مقایسه میانگین صفات کاروتنوئید و آنتوسیانین نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم مقدار این صفات افزایش یافت به‌گونه‌ای که غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام این نانوذره بیشترین مقدار کاروتنوئید و آنتوسیانین را به خود اختصاص داد. همچنین، تنش شوری نیز منجر به افزایش مقدار این صفات شد (شکل ۳). پژوهشی که توسط دوگانلار و همکاران (Doganlar et al., 2010) در گیاه سیب‌زمینی صورت گرفت نشان داد که در تنش شوری مقدار محتوای کاروتنوئید افزایش یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (Doganlar et al., 2010). پژوهش محمدی و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که به‌کارگیری دی‌اکسید تیتانیوم در گیاه نخود (*Cicer arietinum*) در تنش سرما باعث افزایش محتوای کلروفیل a، b و کل و محتوای کاروتنوئیدها نسبت به گیاهان شاهد شد (Mohammadi et al., 2014).

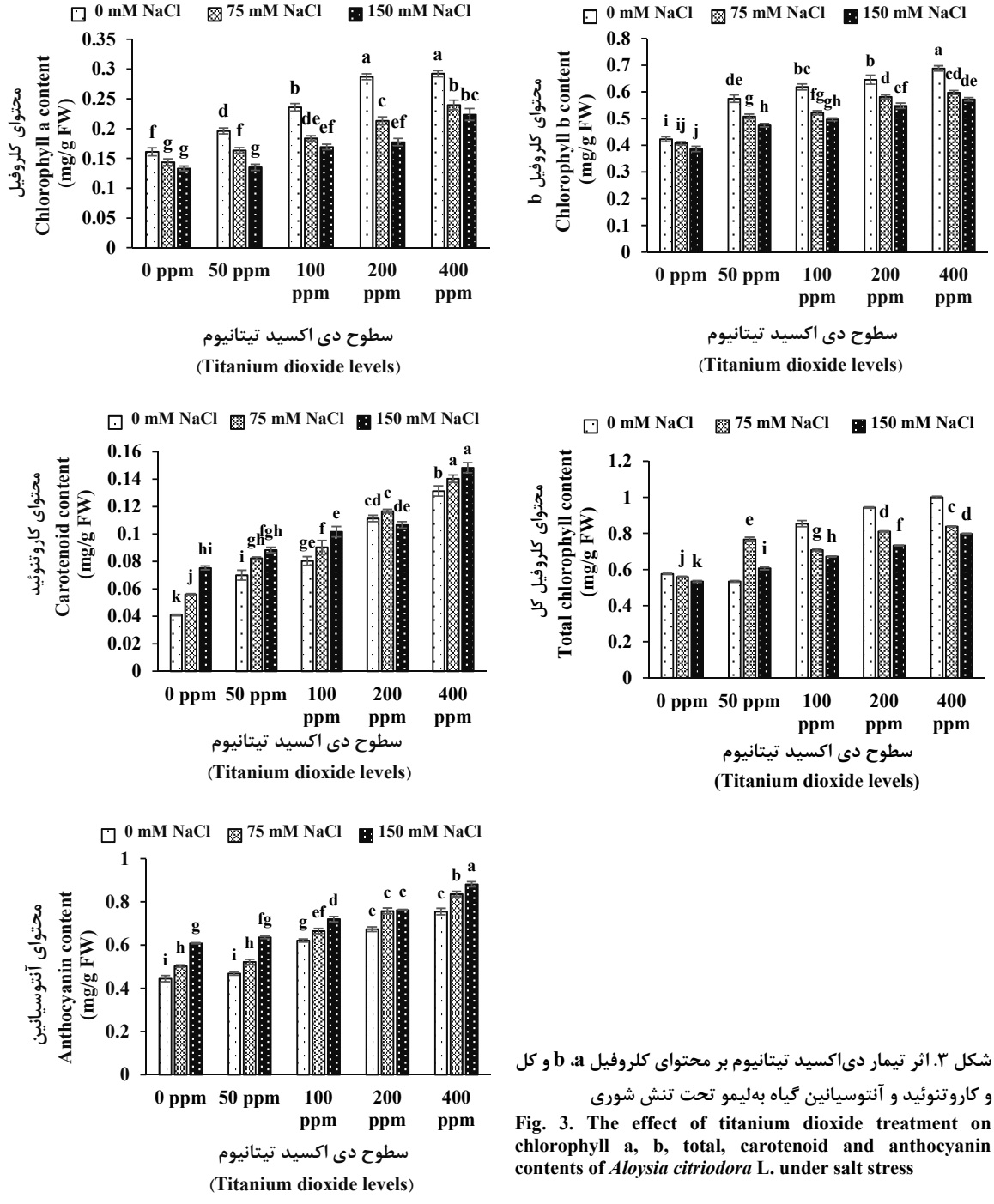
جدول ۲. آنالیز واریانس رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنتوسیانین‌های گیاه به‌لیمو تحت تیمار شوری و دی‌اکسید تیتانیوم

Table 2. The variance analysis of photosynthesis and anthocyanin traits of *Aloysia citriodora* L. under salt stress and titanium dioxide

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoid	آنتوسیانین Anthocyanin
Titanium (T)	تیتانیوم	4	0.0168**	0.0617**	0.1344**	0.0096**	0.1538**
Salinity (S)	شوری	2	0.0174**	0.0351**	0.0969**	0.0008**	0.0567**
T × S	تیتانیوم×شوری	8	0.0007**	0.0011**	0.0031**	0.0001**	0.0012**
Error	خطا	30	0.0001	0.0002	0.0003	0.0000	0.0005
CV%	ضریب تغییرات		*5.2596*	*3.0948*	*2.5571*	*8.6423*	*3.6207*

*، ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ns غیر معنی‌دار.

*, ** showed the significance level of 0.05 and 0.01 respectively and ns indicates non significance level



شکل ۳. اثر تیمار دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید و آنتوسیانین گیاه به‌لیمو تحت تنش شوری

Fig. 3. The effect of titanium dioxide treatment on chlorophyll a, b, total, carotenoid and anthocyanin contents of *Aloysia citriodora* L. under salt stress

در تحقیقی، اثر سالیسیلیک اسید بر روی گیاه دارویی مریم‌گلی (*Salvia coccinea*) به‌منظور بررسی تغییرات صفات مورفولوژیکی و رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی تحت تیمارهای مختلف شوری ارزیابی شد (Grzeszczuk et al., 2018). نتایج حاکی از کاهش میزان رشد گیاه و محتوای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در گیاهان در معرض تنش شوری بود، درحالی‌که سالیسیلیک اسید سبب افزایش میزان وزن تر گیاه، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید شد.

اگرچه وجود رنگیزه‌های آنتوسیانین مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی برای رشد و زنده ماندن گیاه ضرورت ندارد،

بااین‌حال، بررسی آن‌ها به‌عنوان یک فاکتور حساس به شوری ضروری است. در مطالعه‌ای مشابه، میزان آنتوسیانین‌ها در شرایط تنش شوری در گیاه *Grevillea ilicifolia* افزایش یافت که ازاین‌رو آنتوسیانین‌ها به‌عنوان محلول سازگار کننده اسمزی شناسایی شدند (Kennedy and Filippis, 1999). در مطالعه‌ای، اثر تیمارهای شوری و سالیسیلیک اسید بر روی صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه دارویی تربچه (*Raphanus sativus* L.) بررسی شد (Chaparzadeh and Hosseinzad-Behboud, 2015). نتایج نشان داد که شوری سبب کاهش وزن تر ریشه و اندام هوایی، کلروفیل‌ها، کاروتنوئید و محتوای آنتوسیانین شد؛ اما کاربرد سالیسیلیک اسید اثر مثبتی بر روی محتوای آنتوسیانین و کاروتنوئید را نشان داد.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از ضرایب همبستگی در این تحقیق، ضرایب همبستگی بین صفات در شرایط تنش شوری و کاربرد نانوذره تیتانیوم نشان داد که وزن تر اندام هوایی به‌عنوان عملکرد گیاه با کلروفیل a (r=۰/۷۴۵**)، کلروفیل b (r=۰/۷۱۵**)، کلروفیل کل (r=۰/۷۴۵**)، وزن تر ریشه (r=۰/۵۸۵**)، وزن خشک ریشه (r=۰/۶۳۵**) و وزن خشک اندام هوایی (r=۰/۸۷۲**) همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت (جدول ۳). در بین تمامی صفات موردمطالعه، وزن خشک اندام هوایی و میزان کلروفیل a بیشترین همبستگی را با عملکرد گیاه در شرایط تنش شوری و اثر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم داشتند؛ بنابراین می‌توان این صفات را مهم‌ترین صفات در افزایش عملکرد گیاه در این شرایط دانست.

برای تعیین سهم اثرات تجمعی صفات در تعیین عملکرد (وزن تر اندام هوایی) از روش رگرسیون گام‌به‌گام استفاده گردید. برای این منظور وزن تر اندام هوایی به‌عنوان متغیر وابسته و سایر صفات به‌عنوان متغیر مستقل انتخاب و صفات کم تأثیر و یا بی‌تأثیر از مدل حذف گردیدند. درنهایت تنها صفت وزن خشک اندام هوایی به‌عنوان صفت تأثیرگذار وارد مدل شد و ۸۲ درصد از تغییرات وزن تر اندام هوایی را توجیه نمود که با توجه به مقادیر t استیودنت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۴). درنتیجه در این آزمایش معادله رگرسیونی $Y = 14.62 + 0.91\ X_1$ به دست آمد که Y وزن تر اندام هوایی واحد گرم و X_1 وزن خشک اندام هوایی است. با توجه به جدول ۳ و ۴، بر اساس نتیجه همبستگی و رگرسیون، رابطه قوی بین وزن تر اندام هوایی گیاه و وزن خشک اندام هوایی وجود دارد.

جدول ۳. ضرایب همبستگی ساده بین صفات موردمطالعه در گیاه به‌لیمو تحت تنش شوری و نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم

Table 3. Simple correlation coefficient between studied traits in *Aloysia citriodora* L. under salt stress and nano particle titanium dioxide

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	کلروفیل a Chlorophyll a	1								
2	کلروفیل b Chlorophyll b	0.911**	1							
3	کلروفیل کل Total chlorophyll	0.965**	0.984**	1						
4	کاروتنوئید Carotenoid	0.629**	0.662**	0.669**	1					
5	آنتوسیانین Anthocyanin	0.487**	0.529**	0.533**	0.914**	1				
6	وزن تر ریشه Root wet weight	0.541**	0.408**	0.470**	-0.003	-0.199	1			
7	وزن تر اندام هوایی Shoot wet weight	0.745**	0.715**	0.745**	0.262ns	0.148 ns	0.585**	1		
8	وزن خشک ریشه Root dry weight	0.662**	0.562**	0.613**	0.165 ns	-0.070	0.929**	0.635**	1	
9	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	0.825**	0.830**	0.847**	0.455**	0.336*	0.433**	0.872**	0.528**	1

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪، ۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.

*, ** and ns shows the probability level of 1%, 5% and no significant difference, respectively

در آزمایشی مشابه، روابط همبستگی و رگرسیونی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی کافوری بررسی شد. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌دار بین عملکرد سرشاخه کل با عملکرد کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و تعداد پنجه وجود داشت و ازنظر روابط رگرسیونی سرشاخه کل بالاترین اثر مستقیم و مثبت را بر عملکرد سرشاخه گل‌دار دارد.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر روی صفات فوق‌الذکر در گیاه به‌لیمو در شرایط تنش شوری مثبت بود و کاربرد این القاگر را می‌توان بر روی سایر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان دارویی و سایر گیاهان در شرایط تنش پیشنهاد کرد.

جدول ۴. رگرسیون خطی برای وزن تر اندام هوایی به‌عنوان متغیر وابسته و سایر متغیرها به‌عنوان متغیرهای مستقل

Table 4. The linear regression for shoot wet weight as dependent variable and other variables as dependent ones.

متغیرها Variables	مقدار ثابت Constant	ضریب رگرسیون Regression coefficient	ضریب تعیین (R^2_{adj}) Coefficient of determination	معادله رگرسیونی Regression equation
وزن تر ریشه Root wet weight	15.54	0.69	0.44**	$Y = 15.54 + 0.69\ X_1$
کلروفیل کل Total chlorophyll	13.55	0.90	0.79**	$Y = 13.55 + 0.90\ X_1$
وزن خشک ریشه Root dry weight	17.87	0.77	0.58**	$Y = 17.87 + 0.77\ X_1$
کلروفیل a Chlorophyll a	14.62	0.91	0.81**	$Y = 14.62 + 0.91\ X_1$
وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	14.62	0.91	0.82**	$Y = 14.62 + 0.91\ X_1$
آنتوسیانین Anthocyanin	32.34	-0.57	0.27*	$Y = 32.34 - 0.57X_3$
کلروفیل b Chlorophyll b	21.1	0.81	0.63**	$Y = 21.1 + 0.81\ X_4$
کاروتنوئید Carotenoid	20.58	0.69	0.42**	$Y = 20.58 + 0.69\ X_5$

** و* به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

** and * shows the significant difference level at 1% and 5%, respectively

منابع

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, 6-1.

Amini, F., Asghari, G.R., Talebi, S.M., Askary, M., Shahbazi, M., 2016. Effect of environmental factors on the compounds of the essential oil of *Lippia citriodora*. Biologija, 62.

Bolat, I., Kaya, C., Almaca, A., Timucin, S., 2006. Calcium sulfate improve salinity tolerance in rootstock of plum. Journal of Plant Nutrition. 29, 553-564.

Bybordi, A., 2012. Study effect of salinity on some physiologic and morphologic properties of two grape cultivars. Life Science Journal. 9, 1092-101.

Chaparzadeh, N., Hosseinzad-Behboud, E., 2015. Evidence for enhancement of salinity induced oxidative damages by salicylic acid in radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Plant Physiology and Breeding. 5, 23-33.

Dianat, M., Saharkhiz, M.J., Tavassolian, I., 2016. Salicylic acid mitigates drought stress in Lippia citriodora L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 8, 286-293.

Doganlar, Z.B., Demir, K., Basak, H., Gul, I., 2010. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. African Journal of Agricultural Research. 5, 2056-2065.

Elghniji, K., Sabrine, S., Ben Mosbah, M., Elimame, E., Moussaoui, Y., 2014. Detoxification of 4-chlorophenol in TiO_2 sunlight system: effect of raw and treated solution on seed germination and plants growth of various sensitive vegetables. Toxicological and Environmental Chemistry. 96, 869-879.

Fazeli-Nasab, B., Sirousmehr, A.R., Azad, H., 2018. Effect of titanium dioxide nanoparticles on essential oil quantity and quality in Thymus vulgaris under water deficit. Journal of Medicinal plants and By-product. 7, 125-133.

Feizi, H., Razavi, P., Shahtahmasebi, N., Fotovat, A., 2005. Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO_2) on wheat seed germination and seedling growth. Biological Trace Element Research. 146, 101-106.

Gao, F., Chao, l., Zheng, L., Mingyu, S., Xiao, W., Yang, F., Cheng, W., Ping, Y., 2006. Mechanism of nano anatase TiO2 on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach. Biological Trace Element Research, 111, 239-245.

Ghormade, V., Deshpande, M.V., Paknikar, K.M., 2011. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. Biotechnology Advances. 29, 792-803.

Grzeszczuk, M., Salachna, P., Meller, E., 2018. Changes in photosynthetic pigments, total phenolic content, and antioxidant activity of Salvia coccinea Buc'hoz Ex Etl. induced by exogenous salicylic acid and soil salinity. Molecules. 23, 1296.

Haghighi, M., Daneshmand, B., 2013. Comparison of titanium and nano-titanium effect on growth and photosynthetic changes of tomato in hydroponic system, Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture. 4, 73-80 .

Hasni, I., Ben Ahmed, H., Bizid, E., Raies, A., Samson, G., Zid, E., 2009. Physiological characteristics of salt tolerance in fenugreek (*Trigonella foenum* graecum L.). The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI .

Heydari, R.R., Moaveni, P., Hoseinpour, D.H., Arefrad, M., 2017. Response of some morpho-physiological characteristics of Borago (*Borago officinalis*) to nano particles of titanium spraying. 10, 875-890. Journal of Crop Ecophysiology. [In Persian with English summary].

Huang, C., Wei, G., Jie, Y., Wang, L., Zhou, H., Ran, C., Huang, Z., Jia, H., Anjum, S.A., 2014. Effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis, antioxidative enzymes, growth and fiber yield of hybrid ramie. Plant Physiology and Biochemistry. 76, 86-93.

Kennedy, B.F., De Filippis, L.F., 1999. Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. Journal of Plant Physiology. 155, 746-754.

Khan, M.N., 2016. Nano-titanium Dioxide (Nano-TiO2) mitigates NaCl stress by enhancing antioxidative enzymes and accumulation of compatible solutes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Journal of Plant Sciences. 11, 1-11.

Kishore, N., Mishra, B.B., Tiwari, V.K., Tripathi, V., 2011. A review on natural products with mosquitosidal potentials. Environmental International. 31, 1149-1166 .

Kiss, F., Deak, G., Feher, M., Balogh, A., Szabolsci, L., Pais, I., 1985. The effect of titanium and gallium in photosyntetic rate of algae. Journal of Plant Nutrition. 8, 825-832.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148, 350-382.

Lira, P.D.L., Van Baren, C.M., Retta, D., Bandoni, A.L., Gil, A., Gattuso, M., Gattuso, S., 2008. Characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina by the essential oil. Journal of Essential Oil Research. 20, 350-353.

Lyu, S., Wei, X., Chen, J., Wang, C., Wang, X., Pan, D., 2017. Titanium as a beneficial element for crop production. Frontiers in Plant Science. 8, 597.

Manivannan, P., Jaleel, C.A., Zhao, C.X., Somasundaram, R., Azooz, M.M., Panneerselvam, R., 2008. Variations in growth and pigment compositon of sunflower varieties under early season drought stress. Journal of Molecular Sciences. 3, 50-56.

Mazarie, A., Mousavi-nik, S.M., Ghanbari, A., Fahmideh, L., 2019. Effect of titanium dioxide spraying on physiological characteristics of sage (*Salvia officinalis* L.) under water stress, 12, 539-553. Environmental Stresses in Crop Sciences. [In Persian with English summary].

Mita, S., Hirano, H., Nakamura, K., 1997. Negative regulation in the expression of a sugar-inducible gene in Arabidopsis thaliana (a recessive mutation causing enhanced expression of a gene for [beta]-amylase). Plant Physiology. 114, 575-582.

Mohammadi, R., Maali-Amiri, R., Mantri, N.L., 2014. Effect of TiO2 nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. Russian Journal of Plant Physiology. 61, 768-775.

Nourafcan, H., 2018. Effect of salicylic acid on morpho-physiological characteristics of lemon verbena (*Lippia citriodora*) in in vitro and field conditions. 12, 303-316. Journal of Crop Ecophysiology. [In Persian with English summary].

Qasim, M., Ashraf, M., Ashraf, M.Y., Rehman, S.U., Rha, E.S., 2003. Salt–induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. Biologia of Plantarum. 46, 692-632.

Qi, M., Liu, Y., Li, T., 2013. Nano-TiO2 improves the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress. Biological Trace Element Research. 156, 323-328.

Yang, F., Hong, F.S., You, W.J., 2006. Influences of nano-anatase TiO2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. Biological Trace Element Research. 110, 179–190.

Zhao, G.Q., Ma, B.L., Ren, C. Z., 2007. Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence and ion content of naked oat in response to salinity. Crop Science. 41, 123-131.

Zhang, J., Zhang, Y., Du, Y., Chen, S., Tang, H., 2011. Dynamic metabonomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress. Journal of Proteome Research. 10(4), 1904-1914.

Zheng, L., Mingyu, S., Chao, L., Liang, C., Huang, H., Xiao, W., Xiaoqing, L., Yang, F., Gao, F. Hong, F., 2007. Effects of nanoanatase TiO2 on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. Biological Trace Element Research. 119, 68–76.

Zheng, l., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Huang, H., Xiaoqing, L. Hong, F., 2005. Effect of nano anatase on spectral characteristics and distribution of LHCLL on the thylakoid memberance of spinach. Biological Trace Element Research. 120, 273-283.