

اللهم لا تحرمنا



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

اثرات نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه شنبلیله تحت تنش

سرما

نگارنده: محمد جواد بابایی

اساتید راهنما

دکتر پرویز حیدری

دکتر امین ابراهیمی

مهر ۱۳۹۹

شماره: ۱۷۵
تاریخ: ۳۹/۱۱/۹۶

باسم تعالی



فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای ... محمدجواد بابائی ...
با شماره دانشجویی ... ۹۶۰۳۳۶۴ ... رشته ... بیوتکنولوژی گیاهی .. گرایش ... بیوتکنولوژی گیاهی ...
تحت عنوان ... مطالعه اثرات نانوذرات تیتانیوم بر گیاه شنبلیله تحت تنش سرما ... که در تاریخ
۹۹/۷/۲۷ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

الف) درجه عالی: نمره ۲۰-۱۹ (ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸/۹۹-۱۸
ج) درجه خوب: نمره ۱۷/۹۹-۱۶ (د) درجه متوسط: نمره ۱۵/۹۹-۱۴
ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد
نوع تحقیق: نظری عملی

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	پرویز حیدری	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	امین ابراهیمی	استادیار	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	سید ایمان ساعدی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	مهديه پارسائیان	استادیار	
۶- استاد ممتحن دوم	شاهرخ قرنجیک	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر علی درخشان استاد مهربی

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع

مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).



تعمیرنامه

اینجانب محمد جواد بابایی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه "اثرات نانوذرات تیتانیوم بر خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه شنبلیله تحت تنش سرما" تحت راهنمایی دکتر پرویز حیدری و امین ابراهیمی متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .

- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است . تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

سرما از جمله تنش‌های غیرزیستی مهم می‌باشد که تولید محصولات کشاورزی را با مخاطراتی مواجه ساخته است. درک پاسخ گیاهان نسبت به تنش سرما، دانش بشر را در رابطه با سازوکارهای افزایش تحمل در گیاهان و توسعه ارقام مقاوم افزایش می‌دهد. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بر القای تحمل به تنش سرما در شنبلیله و ارزیابی پروفایل بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین انجام شد. تیمارها شامل دما (۲۳ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های مختلف نمونه‌برداری (۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و سطوح مختلف نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم (صفر، ۲، ۵ و ۱۰ ppm) بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که تنش سرما منجر به تخریب و تجزیه محتوای کلروفیل و کارتنوئید می‌گردد، در ضمن تحت تنش سرما، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. همچنین درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید به دلیل آسیب‌پذیری غشای سلولی و اکسیداسیون اسیدهای چرب به صورت معنی‌داری نسبت به دمای نرمال افزایش یافت. کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم به ویژه غلظت‌های ۲ و ۵ ppm به صورت معنی‌داری اثرات تنش سرما را تعدیل و منجر به افزایش تحمل شنبلیله نسبت به سرما شد. تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم، منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین (به غیر از *SMT*) گردید. بیان ژن‌های *SEP*، *SQS*، *CAS* و *SSR* تحت تاثیر تیمار ترکیبی تیمار تنش سرما و نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم (۲ و ۵ ppm) به ترتیب به میزان ۱۱، ۳۳، ۲۱ و ۱۶ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش یافتند. در ضمن برای بیشتر صفات فیزیولوژیکی غلظت ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان نمونه‌برداری ۴۸ ساعت (پس از تنش) دارای بیشترین اثرگذاری بود. در حالی که در بخش بیان ژن غلظت‌های ۵ و ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان‌های نمونه‌برداری ۲۴ و ۴۸ ساعت (پس از تنش) به صورت موثرتری بیان ژن‌ها را تحریک کردند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند به صورت موثری منجر به تحریک بیوسنتز متابولیت‌های شنبلیله و در نتیجه القای تحمل به تنش سرما گردد. در ضمن، نتایج تحقیق حاضر در مهندسی متابولیک دایوسجنین در شنبلیله قابل کاربرد است.

کلمات کلیدی: تنش سرما، شنبلیله، دی‌اکسیدتیتانیوم، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بیان ژن و بیوسنتز

دایوسجنین

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۲

فصل دوم: کلیات و مرور منابع

۲- کلیات و مرور منابع ۸

۲-۱- تنش ۸

۲-۲- تنش سرما ۸

۲-۳- پاسخ گیاهان به تنشها ۱۰

۲-۳-۱- رشد ۱۰

۲-۳-۲- محتوای کلروفیل و کارتنوئید ۱۱

۲-۳-۳- سیالیت غشا ۱۲

۲-۳-۴- محتوای پروتئین و آنزیمهای آنتیاکسیدان ۱۳

۲-۴- گیاهان دارویی ۱۶

۲-۵- شنبلیله ۱۸

۲-۶- متابولیت‌های ثانویه ۲۰

۲-۷- مسیر بیوسنتز دایوسجنین ۲۱

۲-۷-۱- برخی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز دایوسجنین ۲۴

الف) اسکوالن سنتاز (SQS) ۲۴

ب) اسکوالن اپوکسیداز (SEP) ۲۴

ج) سیکلوآرتنول سنتاز (CAS) ۲۴

- ۲۵..... (SMTs) ترانسفرازها (SMTs) ۲۵
- ۲۵..... الیسیتورها ۸-۲-۲..... ۲۵
- ۲۶..... نانوذرات ۱-۸-۲..... ۲۶
- ۲۷..... نانوذره دیاکسید تیتانیوم ۱-۱-۸-۲..... ۲۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها

- ۳۴..... مواد گیاهی ۱-۳..... ۳۴
- ۳۵..... ارزیابی صفات فیزیولوژیک ۲-۳..... ۳۵
- ۳۵..... اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کارتنوئید ۱-۲-۳..... ۳۵
- ۳۵..... قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی ۲-۲-۳..... ۳۵
- ۳۶..... اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) ۳-۲-۳..... ۳۶
- ۳۷..... اندازه‌گیری پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ۴-۲-۳..... ۳۷
- ۳۷..... تهیه بافر استخراج ۱-۴-۲-۳..... ۳۷
- ۳۷..... استخراج پروتئین کل ۲-۴-۲-۳..... ۳۷
- ۳۷..... تهیه محلول برادفورد ۳-۴-۲-۳..... ۳۷
- ۳۸..... تهیه محلول اصلی ۴-۴-۲-۳..... ۳۸
- ۳۸..... اندازه‌گیری محتوای پروتئین نمونه‌ها ۵-۴-۲-۳..... ۳۸
- ۳۹..... سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز ۶-۴-۲-۳..... ۳۹
- ۳۹..... سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۷-۴-۲-۳..... ۳۹
- ۴۰..... سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۸-۴-۲-۳..... ۴۰
- ۴۱..... بررسی بیان ژن ۳-۳..... ۴۱
- ۴۱..... استخراج RNA ۱-۳-۳..... ۴۱
- ۴۲..... ساخت cDNA ۲-۳-۳..... ۴۲

- ۳-۳-۳- طراحی آغازگرها..... ۴۳
- ۳-۳-۴- انجام واکنش PCR زمان واقعی ۴۳
- ۳-۳-۵- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها..... ۴۴
- ۳-۴- تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی..... ۴۵

فصل چهارم: نتایج و بحث

- ۴-۱- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک ۴۸
- ۴-۲- محتوای کلروفیل a ۵۰
- ۴-۳- محتوای کلروفیل b ۵۱
- ۴-۴- محتوای کلروفیل کل ۵۳
- ۴-۵- محتوای کارتنوئید ۵۴
- ۴-۶- پروتئین کل ۵۶
- ۴-۷- آسکوربات پراکسیداز ۵۸
- ۴-۸- کاتالاز ۵۹
- ۴-۹- گایاکول پراکسیداز ۶۰
- ۴-۱۰- شاخص نشت الکترولیت ۶۲
- ۴-۱۱- محتوای مالون دیآلدئید ۶۳
- ۴-۱۲- بیان ژن *SQS* ۶۵
- ۴-۱۳- بیان ژن *SEP* ۶۶
- ۴-۱۴- بیان ژن *CAS* ۶۷
- ۴-۱۵- بیان ژن *SMT* ۶۸
- ۴-۱۶- بیان ژن *SSR* ۶۹
- ۴-۱۷- بحث ۷۰

۷۰	۱-۱۷-۴	محتوای کلروفیل و کارتنوئید
۷۳	۲-۱۷-۴	پروتئین کل و آنزیم های آنتی اکسیدانی
۷۶	۳-۱۷-۴	نشت الکترولیت و محتوای مالون دی آلدئید
۷۸	۴-۱۷-۴	بررسی کیفیت RNA و صحت تکثیر اختصاصی آغازگرها
۷۹	۵-۱۷-۴	بررسی بیان ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین
۸۷		نتیجه گیری نهایی
۸۸		پیشنهادات
۹۵		منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲- مسیر پیشنهادی بیوسنتز دایوسجنین و استرول‌های گیاهی در گیاه شنبلیله ۲۳
- شکل ۲-۲- تصویری شماتیک از ساختارهای بلوری دی‌اکسید تیتانیوم ۲۸
- شکل ۱-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کلروفیل a ۴۷
- شکل ۲-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کلروفیل b ۴۸
- شکل ۳-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کلروفیل کل ۴۹
- شکل ۴-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای کارتنوئید ۵۶
- شکل ۵-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای پروتئین ۵۷
- شکل ۶-۴- نتایج مقایسه میانگین سه‌گانه اثرات دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۹
- شکل ۷-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه‌گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز ۶۰
- شکل ۸-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه‌گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ۶۱
- شکل ۹-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه‌گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر درصد نشت الکترولیت ۶۳

- شکل ۴-۱۰- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر محتوای مالون دی آلدئید..... ۶۳
- شکل ۴-۱۱- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی ژن *SQS* ۶۵
- شکل ۴-۱۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی ژن *SEP* ۵۹
- شکل ۴-۱۳- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی ژن *CAS* ۶۰
- شکل ۴-۱۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی ژن *SMT* ۶۱
- شکل ۴-۱۵- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی ژن *SSR* ۶۹

فصل اول

مقدمه

کاربرد گیاهان دارویی به عنوان دارو، از گذشته‌های دور رایج بوده است. تمایل انسان به استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض کمتر آن نسبت به داروهای شیمیایی امری اجتناب‌ناپذیر محسوب می‌گردد. از بین بیش از ۳۵۰۰۰۰ گونه گیاهی شناخته شده، حدود ۳۵۰۰۰ گونه در سراسر جهان برای اهداف دارویی استفاده می‌شوند. بشر از این گونه‌ها در تغذیه، صنایع دارویی و پزشکی، مواد ساختمانی، رنگ، ادویه‌جات و صنایع غذایی بهره می‌برد (Moradkhanin et al., 2010). مطابق با آمار سازمان بهداشت جهانی^۱، بیش از ۸۰ درصد از جمعیت کشورهای در حال توسعه از طب گیاهی استفاده می‌کنند. کاربرد داروهای گیاهی در کشورهای در حال توسعه به علت عدم وجود اثرات جانبی و یا کمترین اثرات جانبی نسبت به داروهای شیمیایی در حال افزایش است. در اروپا، حداقل از ۲۰۰۰ گونه گیاه عطری و دارویی به صورت تجاری استفاده می‌شوند. جالب آنکه حدود دو سوم از این گیاهان، بومی اروپا هستند و بخش عمده‌ای از این حجم (دو سوم) از منابع محلی و بومی برداشت می‌شوند (Zuardi, 2006).

شنبلیله با نام علمی (*Trigonalla foenum-graecum* L.)، از جمله گیاهان دارویی مهم در طب سنتی ایران و برخی از کشورهای آسیایی محسوب می‌شود، که دارای خواص درمانی بسیار ارزشمندی می‌باشد. شنبلیله دارای خواص ضد کلسترول، کاهش دهنده‌ی قند خون، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد نفخ، تسکین دهنده، مقوی عضلانی، خلط آور، ملین، ضد سنگ مثانه، تب‌بر و انگل‌کش است. موسیلاژ موجود در دانه‌های این گیاه برای التهاب روده، زخم معده و مشکلات گوارشی مفید می‌باشد (Mehrafarin et al., 2011). اهمیت این گیاه به واسطه تولید دایوسجنین است که جزء ساپوژنین‌های استروئیدی محسوب می‌گردد (Joanna et al., 2015). این متابولیت ارزشمند برای اولین بار در سال ۱۹۳۶، از گیاه *Dioscorea tokoro* جداسازی شد (Fujii and Matsukawa, 1936). از دایوسجنین در درمان بیماری‌های متابولیکی مانند چاقی، دیابت، کلسترول و چربی خون بالا، التهاب و سرطان استفاده می‌شود (Upadhyay et al., 2014).

¹ World Health Organization

در گیاهان، علاوه بر متابولیت‌های اولیه (کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و آمینواسیدها)، ترکیبات مختلفی با وزن مولکولی پایین به نام متابولیت‌های ثانویه نیز سنتز می‌شوند. در حقیقت، متابولیت‌های ثانویه به دسته‌ای از ترکیبات اطلاق می‌گردد که دارای وظایفی در فرآیندهای اصلی توسعه‌ای گیاه هستند و میزان آن‌ها در پاسخ به شرایط محیطی افزایش می‌یابد (ماحصل این تغییرات، افزایش مقاومت گیاه است). تقریباً همه متابولیت‌های ثانویه دارای خواص دارویی می‌باشند، به طوری که امروزه از اهمیت فراوانی در صنایع دارویی برخوردار هستند و به دلیل به صرفه نبودن سنتز آن‌ها از نظر شیمیایی، از گیاهان وحشی یا زراعی استخراج می‌شوند (Oksman and Inze, 2004).

با توجه به اثرات مخرب تنش‌های محیطی به ویژه کاهش رشد و عملکرد گیاهان زراعی، بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی از اهمیت زیادی برخوردار است. درک پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی نظیر شوری، خشکی، سرما و گرما جهت توسعه و اصلاح ارقام متحمل به تنش ضروری است. شرایط تنش‌زای محیطی سبب ایجاد اختلال در فعالیت‌های گیاهی می‌شود، لذا مطالعه پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی بعنوان ابزاری برای شناخت مکانیسم‌های مقاومت در گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dieriga et al., 2003). در حقیقت، به کارگیری بیوتکنولوژی در اصلاح گیاهان زراعی، به وجود منابع ژنتیکی غنی برای تحمل به تنش‌ها و پایداری عملکرد وابسته است. لذا به کارگیری راهبردهای مبتنی بر بیوتکنولوژی نیازمند تحقیقات گسترده در زمینه شناسایی عوامل مؤثر در تحمل به تنش و عوامل تنظیم‌کننده می‌باشد (Chen et al., 2002).

تنش‌های غیرزیستی منجر به ایجاد تغییراتی در بیان ژن‌های درگیر در محافظت از استرس می‌گردند. سرما یکی از مهمترین عوامل محیطی محدودکننده رشد و توسعه کشت گیاهان در سرتاسر دنیا محسوب می‌شود. اگرچه پاسخ گونه‌های مختلف گیاهی از نظر قابلیت تحمل به دمای پایین بسیار متفاوت است. سرما منجر به اختلال در فرآیندهای متابولیکی، تغییر در خواص غشاهای سلولی و اندامکی، تغییر در ساختمان پروتئین‌ها و اثرات متقابل ماکرومولکول‌ها، تغییر در محتوای قندهای سلولی و نیز تغییر در ساختار چربی‌های غشایی و نوع

اسیدهای چرب تشکیل دهنده گیاهان می‌شود. بدیهی است که گیاهان در مواجهه با هر یک از موارد فوق سازوکارهای ویژه را به کار می‌گیرند. شناخت ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان که منتج از اثرات ژنوتیپ، محیط و اثرات متقابل آن‌ها می‌باشد، در مقابله با این شرایط در برنامه‌های به نژادی ضروری است. اخیراً، کاربرد خارجی تیمارهای مختلف از قبیل اسموپروتئین‌ها، فیتوهورمون‌ها، مولکول‌های پیام‌رسان (نیتریک اکسید)، پلی آمین‌ها و نانوذرات در مقابله با آسیب ناشی از تنش‌ها در گیاهان گزارش شده است (Mittler et al., 2006; Zhu et al., 2016; Choudhury et al., 2017).

استفاده از نانوذرات به عنوان محرک با هدف کاهش اثرات مخرب تنش‌های غیر زیستی مدتی است که مورد توجه محققان قرار گرفته است. گزارش‌های زیادی مبنی بر کاهش اثرات تخریبی تنش‌های غیرزیستی در گیاهان تیمار شده با نانوذرات ارائه شده است. این ترکیبات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و محتوای مالون دی‌آلدئید در گیاهان می‌شوند و از این طریق مقاومت گیاهان را نسبت به تنش‌ها افزایش می‌دهند (Rai et al., 2018).

در برخی موارد، انتقال گیاهان دارویی از محیط زندگی (محیط بومی) به محیط زراعی منجر به کاهش میزان متابولیت ثانویه در آن‌ها می‌شود. لذا با توجه به اهمیت دایوسجنین در شنبلیله به‌عنوان یک متابولیت ارزشمند، استفاده از محرک‌های مختلف به‌منظور افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین و متعاقباً محتوای دایوسجنین ضروری به‌نظر می‌رسد. نتایج متناقضی در مورد استفاده از محرک‌های مختلف و تغییرات میزان متابولیت‌های ثانویه وجود دارد، این بدین معنی است که گیاهان مختلف پاسخ‌های متفاوتی نسبت به محرک‌ها از خود نشان می‌دهند. پاسخ گیاهان با توجه به مدت زمان در معرض بودن محرک، مرحله رشدی و غلظت‌های مختلف محرک‌ها بسیار متفاوت است. بنابراین شناسایی بهترین محرک، حساس‌ترین مرحله رشدی گیاه و مناسبترین غلظت محرک‌ها، از فاکتورهای موثر در افزایش کمیت متابولیت‌های گیاهی است (Angelova et al., 2001; Parsa and Zeinali, 2016). در این تحقیق به‌منظور بررسی اثرات تنش سرما بر گیاه شنبلیله و

همچنین کاهش این اثرات مخرب و مطالعه الگوی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با بیوسنتز دایوسجنین، از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم (TiO_2) به عنوان یک محرک کاربردی استفاده شد. درحقیقت، این تحقیق با دو هدف زیر انجام شد:

- ۱- بررسی اثرات نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بر افزایش تحمل گیاه شنبلیله تحت تنش دمایی پایین.
- ۲- مطالعه اثر نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم (به عنوان یک محرک) بر بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین.

فصل دوم

کلیات و مرور منابع

۲- کلیات و مرور منابع

۲-۱- تنش

تنش از نظر فیزیکی، به عنوان نیروی وارد شده بر واحد سطح تعریف می‌شود که می‌تواند منجر به تغییر شکل، ابعاد و اندازه و حجم جسم گردد. اثرات ناشی از این نیروی وارده ممکن است برگشت‌پذیر و یا غیرقابل برگشت باشند. از نظر زیستی، تنش به عنوان عامل محدودکننده رشد، تکثیر، تولید مثل و تولید عملکرد مناسب تعریف می‌گردد (احمدی و همکاران، ۱۳۸۳). با توجه به پتانسیل کاملاً متفاوت گیاهان در پاسخ به تنش‌ها، ارایه یک تعریف جامع و کامل برای تنش دشوار است، چرا که شرایطی که برای یک گیاه تنش محسوب می‌گردد، ممکن است برای گیاه دیگر کاملاً عادی باشد (Signorelli et al., 2019).

تنش‌های محیطی، به دو دسته زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند. حشرات، آفات و بیماری‌ها و علف‌های هرز مهمترین مثال‌ها از تنش‌های زیستی محسوب می‌شوند. از تنش‌های غیرزیستی می‌توان به سرما، گرما، شوری، خشکی، سیلاب، عدم تعادل عناصر غذایی و ... اشاره کرد (Hans et al., 1996). گیاهان طی چرخه زندگی همواره در معرض تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند و مکانیسم‌های مختلفی جهت سازش با تنش‌های زیستی و غیرزیستی در سطح سلولی و مولکولی در آن‌ها تکامل یافته است (آخوندی و حسن آبادی، ۱۳۹۳). تقاضای روزافزون تولیدات گیاهی با کاهش سطح زمین‌های قابل کشت به واسطه محدودیت منابع آب و خاک، فرسایش خاک و ... توأم شده است.

۲-۲- تنش سرما

دمای پایین یکی از عوامل محدودکننده‌ی رشد و پراکنش گیاهان محسوب می‌شود و مقدار تولید گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در طی بروز تنش دمای پایین، انرژی متابولیکی کمتری در دسترس گیاه قرار می‌گیرد، جذب مواد غذایی مختل شده، آسیمیلایسیون کاهش می‌یابد و ماحصل تمام این رویدادها توقف و

کاهش رشد گیاه است. از آنجا که گیاهان در پاسخ به تنش‌ها دارای سازوکارهای متعددی هستند، لذا سطوح مختلفی از مقاومت و تحمل را به نمایش می‌گذارند (Yadav, 2010; Rahman, 2013). تفاوت در پاسخ گیاهان نسبت به تنش سرما به رفتار گسترده آن‌ها در سطوح سلولی، غشایی، دیواره سلولی، اندامک‌ها، ریز مولکول‌ها و درشت مولکول‌ها و بیان متفاوت ژن‌های مرتبط وابسته است (آخوندی و حسن آبادی، ۱۳۹۳). بنابراین پاسخ گیاهان به تنش سرما در سطح مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی رخ می‌دهد. درک مسیر انتقال پیام در گیاهان تا حدودی پیچیده است، اگرچه پیشرفت‌های قابل توجهی در این زمینه در حال انجام است. در مسیر پیام‌رسانی، تنش توسط گیرنده‌های موجود در غشای سلول‌های گیاهی درک می‌شود، سپس این سیگنال به درون سلول منتقل شده و منجر به تولید پیام‌رسان‌های ثانویه مثل سیگنال کلسیم، گونه‌های فعال اکسیژن^۱ (ROS) و اینوزیتول فسفات‌ها^۲ می‌شود. در نتیجه پیام‌رسان‌های ثانویه از قبیل اینوزیتول فسفات‌ها سطح کلسیم سیتوسولی را تنظیم می‌کنند. تغییر در سطح یون کلسیم درون سلولی به وسیله حسگرهای کلسیمی درک می‌گردد. از آنجا که این حسگرها دارای فعالیت آنزیمی نیستند، شکل و ساختار خود را در پاسخ به میزان کلسیم تغییر می‌دهند. این پروتئین‌ها در همکاری با سایر پروتئین‌های پیام‌رسان باعث شکل‌گیری آبخاری از فسفوریلاسیون^۳ می‌شوند و در نتیجه ژن‌های اصلی مسئول تنش یا عوامل رونویسی این ژن‌ها را بیان می‌کند. در نهایت، محصولات این ژن‌ها منجر به سازگاری گیاه می‌شوند. در بحث پاسخ به تنش، هم تک تک سلول‌ها و هم مجموعه موجود به تنش پاسخ می‌دهند. تنش منجر به تحریک بیان ژن‌های تولیدکننده هورمون‌هایی از قبیل آبسزیک اسید^۴ (ABA)، سالیسیلیک اسید^۵ (SA) و اتیلن می‌گردد. تولید این مولکول‌ها، پیام‌های اولیه را تقویت می‌کند و منجر به شکل‌گیری دور دوم از فرآیندهای پیام‌رسانی می‌شوند، که ممکن است همان مسیر و یا مسیرهای متفاوت دیگری را دنبال کند (Thakur and Nayyar, 2013; Miura and Furumoto, 2013).

¹- Reactive oxygen speices

²- Inositol phosphate

³- Phosphorilation cascade

⁴- Abscisic acid

⁵- Salisilic acid

در مجموع ژن‌های پاسخ دهنده به استرس را می‌توان بر مبنای زمان پاسخگویی‌شان به دو دسته ژن‌های زود القا شونده و ژن‌های القا شونده با تأخیر تقسیم کرد. ژن‌ها با القا شوندگی سریع، پس از گذشت مدت زمان کوتاهی (چند دقیقه) از زمان آغاز تنش و اغلب خیلی سریع و گذرا بیان می‌شوند. فاکتورهای رونویسی این ژن‌ها به محض تحریک، به سنتز پروتئین‌های جدید نیازی ندارند. بر عکس، اکثر ژن‌هایی که بسیار آهسته‌تر فعال می‌شوند (ساعت‌ها بعد از درک تنش) در دسته ژن‌های القا شونده با تأخیر قرار دارند و بیان آن‌ها اغلب پایدار است. ژن‌های اصلی دخیل در تنش مثل ژن‌های مسئول دهیدراسیون، ژن‌های القا شونده با تنش سرما^۱ (KIN) و ژن‌های مسئول سرما^۲ (COR) از جمله ژن‌های کدکننده و تنظیم کننده پروتئین‌های مورد نیاز برای سنتز پروتئین‌هایی مثل پروتئین‌های^۳ LEA، آنتی اکسیدان‌ها، پروتئین‌های پایدارکننده غشا و سنتز اسمولیت‌ها می‌باشند، که در گروه دوم قرار می‌گیرند (Shilpi and Narendra, 2005).

۲-۳- پاسخ گیاهان به تنش‌ها

۲-۳-۱- رشد

رشد به عنوان افزایش در ماده خشک، حجم، طول و یا سطح سلول‌ها تعریف می‌گردد. رشد گیاه به مجموعه‌ای از عوامل مختلف از قبیل فرآیندهای درونی گیاه از جمله فتوسنتز، تنفس، انتقال، روابط آبی، میزان تورژسانس و تعادل عناصر غذایی وابسته است. کاهش رشد تحت تاثیر تنش اصولاً از طریق کاهش میزان دسترسی به کربوهیدرات‌ها و افت آماس سلول رخ می‌دهد. کاهش رشد طولی سلول حساس‌ترین پاسخ گیاهان به تنش است، چراکه رشد طولی سلول با آماس سلولی مرتبط است و آماس سلول با کاهش پتانسیل آب سلول کاهش می‌یابد (Rout and Sahoo, 2015). عکس‌العمل بافت‌ها و اندام‌های مختلف نسبت به افت پتانسیل آب یکسان نیست. رشد ریشه‌ها کم‌تر از شاخه‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد و منجر به افزایش نسبت ریشه به شاخه

¹ - Kinase

² - Cold-Regulated genes

³ - Late embryogenesis abundant

می‌شود. این موضوع به دلیل حساسیت کم‌تر ریشه‌ها نسبت به ABA است. در ضمن در این حالت با توجه به کاهش رشد شاخه و برگ‌ها، مواد اندوخته‌ای زیادتری در اختیار ریشه قرار می‌گیرد (Xu et al., 2018). تنش بسیاری از جنبه‌های متابولیسم و رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مهم‌ترین اثر تنش در طی فصل رویشی کاهش رشد سبزینه‌ای است، که توانایی گیاه برای جذب نور و در نتیجه تولید مواد فتوسنتزی را کاهش می‌دهد. در زمان تنش، گیاهان با جلوگیری از توسعه برگ‌ها میزان مصرف انرژی و کربن را در اندام‌های هوایی کاهش می‌دهند و سهم بیشتری از آسیمیلات‌های گیاه در ریشه توزیع می‌گردد که در نتیجه ریشه توانایی جذب آب و مواد معدنی بیشتری را می‌یابد (Clauw et al., 2015).

۲-۳-۲- محتوای کلروفیل و کارتنوئید

سطح برگ و فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها، دو شاخص مهم تعیین‌کننده ظرفیت فتوسنتزی گیاهان هستند. تنش منجر به کاهش فتوسنتز در گیاهان می‌شود (Sharma et al., 2015). کلروفیل مهم‌ترین رنگیزه فتوسنتزکننده است، که نور آبی و قرمز را جذب می‌کند. کلروفیل a مهم‌ترین نوع کلروفیل است که نقش بسیار مهمی در فتوسنتز ایفا می‌کند. کلروفیل b نیز به عنوان یک رنگیزه کمکی در فتوسنتز نقش دارد. در شرایط تنش، تشکیل پلاستیدهای جدید و محتوای کلروفیل‌ها کاهش می‌یابد (Sharma et al., 2015). محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی به‌عنوان یک نشانگر مهم در ارزیابی تنش در بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مسیر بیوسنتزی کلروفیل و پرولین دارای یک پیش ماده مشترک به نام گلوتامات است، لذا در شرایط تنش، میزان پرولین برگ افزایش و در نتیجه محتوای کلروفیل کاهش می‌یابد. کاهش محتوای رنگیزه‌ها، در اثر کاهش سرعت سنتز و یا در نتیجه تجزیه سریع‌تر آن‌ها، یکی از علائم محسوس تنش اکسیداتیو القاء شده توسط تنش‌های غیرزیستی است (Li et al., 2015; Zhou et al., 2018).

یکی از مکانیسم‌های عمده گیاهان تحت شرایط تنش، تنظیم اسمزی است. تنظیم اسمزی به معنی کاهش پتانسیل آب و پتانسیل اسمزی سلول‌های گیاهی در اثر تجمع مواد محلول در شرایط تنش می‌باشد که

شدت آن به شدت و طول دوره تنش، نوع و سن اندام گیاهی و رقم یا گونه گیاه وابسته است. در طی این پدیده، غلظت یون‌ها (پتاسیم، سدیم و کلسیم) را در واکوئل و نیز برخی متابولیت‌ها از قبیل اسیدهای آمینه (به‌ویژه پرولین)، قندها (به‌ویژه مونوساکاریدها)، قندهای الکلی (مثل سوربیتول و مانیتول)، پلی آمین‌ها، ترکیبات آمونیومی (به‌ویژه گلايسين بتائين)، پروتئین‌های خاص و اسیدهای آلی (به ویژه مالات و سترات) را در سیتوزول گیاه افزایش می‌یابد و در نتیجه با کاهش پتانسیل اسمزی، فشار تورژسانس سلول‌ها در سطح بالا حفظ می‌شود، تا ادامه فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه امکانپذیر گردد (Blum et al., 2017; Munns et al., 2020). حفظ تورژسانس سلول و رشد سلول، باز ماندن روزنه‌ها و تداوم فتوسنتز، حفظ بقا در طی بروز پسابدگی (دهیدراسیون) و گسترش بیش‌تر ریشه از جمله مزایای پدیده تنظیم اسمزی هستند (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). بیشتر اسمولیت‌های موثر در فرآیند تنظیم اسمزی آب‌دوست هستند و قابلیت جایگزینی آب در پروتئین‌ها و غشاها را دارند. این اسمولیت‌ها به‌عنوان «محافظت‌کننده‌های اسمزی^۱» عمل می‌نمایند و دارای نقش کارکردی در گیاه نیستند، بلکه صرفاً پایدارکننده می‌باشند. این مواد در غلظت‌های بالا اثر بازدارندگی یون‌های سمی بر فعالیت آنزیم‌ها را کاهش می‌دهند و منجر به بهبود افزایش پایداری آن‌ها می‌شوند (Ramanjulu and Bartels, 2002).

۲-۳-۳- سیالیت غشا

سیالیت غشا به طور مستقیم تحت تاثیر تغییرات دما قرار دارد، بنابراین در درک دمای پایین موثر است. تنش دمای پایین منجر به بروز تغییرات اساسی در ترکیبات گیاهی می‌شود. به عنوان مثال بروز دماهای زیر صفر در ابتدا منجر به انجماد در بخش بیرون سلولی بافت‌ها می‌شود و این شکل‌گیری هسته منجر به خروج آب از درون سلول به بخش یخ زده برون سلولی می‌گردد (Moieni-Korbekandi et al., 2014). در طی فرآیند تدریجی انجماد برون سلولی، آب درون سلول جذب توده یخ می‌شود و پلاسمولیز سلولی رخ می‌دهد (Zhang

¹ Osmoprotectants

(and Zhu, 2012). در مجموع، محتوای آب در بافت‌های گیاهان طی دوره سازگاری در برابر تنش سرما کاهش می‌یابد، که این پدیده خصوصاً در مورد ارقام متحمل محسوس‌تر است و با میزان بقای گیاه در طول فصل سرما ارتباط مستقیمی دارد. حذف مولکول‌های آب در قسمت انتهایی مولکول چربی در غشاهای سلولی منجر به بروز اختلال در نظم دو لایه غشا می‌شود. در نتیجه غشاء فشرده شده و این فشردگی غشاء را از حالت الاستیسیته ژلاتینی به حالت کریستال مایع تغییر می‌دهد (Gupta et al., 2015). گسترش این حالت منجر به انعطاف-پذیری بیشتر غشا می‌شود و غشا تخریب خواهد شد. حفظ یکپارچگی غشا در اندامک‌ها در شرایط تنش بسیار مهم است. در طی تنش سرما تغییراتی در دنباله‌های اسید چرب در فسفولیپیدهای غشا ایجاد می‌شود و اسیدهای چرب غیر اشباع افزایش می‌یابند (Subramanian et al., 2016). بنابراین بروز تغییرات جزئی در غشای سلول گیاهی علامتی از ظهور تنش است. از جمله راه‌کارهای مقابله با این شرایط می‌توان به تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش تری‌هالوزها اشاره کرد، که در حفظ سیالیت غشا و استحکام پروتئین‌های ناپایدار موثر هستند. تنش منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و در نتیجه کاهش شاخص پایداری غشای سلولی در گیاهان مختلف می‌شود. از جمله روش‌های تعیین میزان خسارت به غشای سلولی، اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها از بافت‌ها است. نشت این مواد، منجر به افزایش هدایت الکتریکی محلول می‌شود و این تغییر به‌عنوان نشانه‌ای از آسیب یا مرگ سلول تلقی می‌گردد (Liu et al., 2018). مالون دی‌آلدئید^۱ نیز از جمله محصولات سمی حاصل از تخریب غشاهای زیستی است که به‌عنوان یک نشانگر زیستی حاصل از تخریب غشاها به‌صورت رایج در ارزیابی آسیب دیدگی گیاهان تحت شرایط تنش کاربرد دارد (Gao et al., 2010).

۲-۳-۴- محتوای پروتئین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تغییر در محتوای تولید پروتئین‌های گیاهی با هدف تجزیه و یا جلوگیری از سنتز برخی از پروتئین‌ها و نیز ساخت دسته کوچکی از پروتئین‌های مخصوص تنش، از جمله تغییرات عمده بیوشیمیایی در گیاهان

¹ Malondialdehyde (MDA)

محسوب می‌شود. برای این منظور تغییرات زیادی در بیان ژن رخ می‌دهد، که منجر به فعال‌سازی و یا غیر فعال شدن تعدادی از آنزیم‌ها می‌شود (Hasan et al., 2017). کاهش محتوای پروتئین‌های محلول برگ به عنوان یکی از عوامل غیر روزنه‌ای محدودکننده فتوسنتز گیاه گزارش شده است. در شرایط تنش سرما، سنتز تقریباً ۵۰ نوع پروتئین از جمله پروتئین‌های دخیل در مکانیسم‌های تحمل به تنش اکسیداتیو^۱ که بوسیله تنظیم دقیق آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز رخ می‌دهد، تنظیم می‌شود (Gupta et al., 2014; Khan et al., 2015).

بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تبادلات گازی در طی تنش معمولاً منجر به کاهش تثبیت دی اکسید کربن و اختلال در زنجیره انتقال الکترون می‌شود و در این حالت مقادیر زیادی از گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست و میتوکندری تولید می‌شوند. این گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (محصولات فرعی متابولیسم هوازی در سلول) در مسیر انتقال پیام به‌عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه تنش عمل می‌کنند و منجر به فعال شدن واکنش‌های دفاعی سلول می‌شوند (Sofa et al., 2004)، اگرچه تولید بیش از حد آن‌ها طی تنش منجر به بروز تنش اکسیداتیو می‌گردد (Arora et al., 2002).

معمولاً تنش اکسیداتیو به علت ایجاد تداخل در نسبت ترکیبات اکسیدانی به آنتی‌اکسیدانی بوجود می‌آید. به عبارت دیگر، زمانی که میزان ترکیب‌های اکسیدانی در سلول افزایش یابد، صدمات زیادی به بافت‌ها و سلول‌ها وارد می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸)، در این حالت این گونه‌ها در تعدادی از اجزای سلولی مانند میتوکندری، کلروپلاست، میکروزوم، آپوپلاست، سیتوزول و پراکسی‌زوم فعال می‌شوند (Alscher et al., 2002). رادیکال‌های سوپراکسید ($\cdot\text{O}_2^-$)، آب اکسیژنه یا پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، اکسیژن منفرد (O_2^{\cdot}) و هیدروکسیل (OH^-) از طریق صدمه اکسیداتیو به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، رنگیزه‌ها و آنزیم‌های فتوسنتزی متابولیسم عادی سلول و گیاه را مختل می‌سازند (Ozkur et al., 2009). در گیاهان انواع

¹ Oxidative stress

مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) برای حذف رادیکال‌های آزاد اضافی و کاهش آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو وجود دارد. اسید آسکوربیک، آلفا-توکوفرول و گلوتاتیون احیاء شده¹ (GSH) از جمله مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی محسوب می‌شوند. در ضمن، بتاکاروتن و زانتوفیل‌ها و ترکیب‌های فنولی نیز به‌عنوان گروهی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی قادر به تجزیه رادیکال‌های آزاد هستند (Munne-Bosch and Penuelas, 2004). همچنین از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجود در سلول‌های گیاهان می‌توان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز یا گایاکول پراکسیداز (POD)، پلی‌فنول اکسیداز (PPO) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) اشاره کرد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در میتوکندری و کلروپلاست، یکی از مهمترین تغییرات بیوشیمیایی در گیاهان تحت تنش سرما است (Bakalova, 2004).

سرما نه تنها منجر به کاهش کلی فعالیت آنزیم‌ها و سرعت واکنش‌ها می‌شود، بلکه تغییرات فعال در متابولوم را نیز تحریک خواهد کرد. به عنوان مثال، عملکرد حفاظتی مولکول‌هایی نظیر ساکارز، ترهالوز، مالتوز، پرولین و گلیاسین بتائین تایید شده است (Chinnusamy et al., 2010). تغییرات در متابولوم در نتیجه تغییر بیان ژن‌های تنظیم شونده توسط سرما رخ خواهد داد. این تغییرات به نوبه خود می‌تواند بیانگر وقوع تنش و آسیب دیدگی سلول باشند. در مجموع، حداقل سه نوع علامت مشخصه تغییر متابولیکی در طی سرما شناسایی شده است. اولین علامت، حفظ توانایی و ظرفیت فتوسنتزی گیاهان در معرض تنش است (Chinnusamy et al., 2010; Sanghera et al., 2011). این تنظیم، از طریق حفظ اجزا کلروپلاستی از قبیل رنگیزه‌ها (اغلب کاروتنوئیدها) و پروتئین‌ها انجام می‌شود. با توجه به اینکه حفظ توازن بین انرژی حاصل و مصرف‌شده در دستگاه فتوسنتزی بسیار مهم است، لذا وضعیت احیا فتوسنتز یک علامت مشخص در طی تنش سرما محسوب می‌شود. علاوه بر تنظیم دستگاه فتوسنتزی، مسیرهای پیام‌رسانی قند نیز سازگاری گیاه به سرما را تنظیم می‌کنند. قندهایی از قبیل رافینوز، سوربیتول، مانیتول، فروکتوز و گلوکز غلظت اسمولیت‌های درون سلولی را

¹ Reduced glutathione

افزایش می‌دهند و در نتیجه نقطه انجماد سیتوپلاسم کاهش می‌یابد (Chinnusamy et al., 2010; Sanghera et al., 2011). در ضمن، در کلروپلاست نیز نشاسته برای تولید مالتوز، هیدرولیز می‌شود. بنابراین، سطوح رونویسی و فعالیت ایزوفرم‌های مختلف آمیلاز دومین مشخصه مهم محسوب می‌گردد. سومین علامت متابولیکی در تنش سرما تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول است (Król et al., 2015; Heidarvand and Amirimaali, 2010).

۲-۴- گیاهان دارویی

گیاهان دارویی، به مجموعه‌ای از گیاهان اطلاق می‌گردد که اندام‌های آن‌ها حاوی ترکیباتی با اثربخشی دارویی است و به همین دلیل در صنعت داروسازی به کارگرفته می‌شوند. تا حدود نیم قرن پیش گیاهان جز اساسی‌ترین منابع تولید دارو محسوب می‌شدند، اما با عنایت به پیشرفت دانش شیمی آلی و تلاش در جهت ساخت مولکول‌های پیچیده دارویی، تولید بیشتر مواد دارویی به‌طور مصنوعی افزایش یافت. در دهه اخیر، عوارض جانبی داروهای سنتزی، تمایل به مصرف گیاهان دارویی را افزایش داده است، به گونه‌ای که قرن بیست و یکم را قرن مطالعه و استفاده از گیاهان دارویی می‌نامند (امیدبگی، ۱۳۸۶). در گیاهان دارویی به واسطه وجود مواد موثره طبیعی و برقرای تعادل در این ترکیبات، اثرات مخرب و زیانبار به کمترین حد ممکن رسیده است. عوارض جانبی اندک و یا فقدان عوارض جانبی داروهایی با منشا گیاهی در دهه‌های اخیر به درستی به اثبات رسیده است (Ziai and Mesgarpour, 2006). در شرایط کنونی، مصرف گیاهان دارویی به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه نیز درصد قابل توجهی از داروهای عرضه شده دارای منشا گیاهی هستند. پرورش و تولید گیاهان دارویی ضمن کمک به سلامت جامعه در پیشرفت اقتصادی نیز نقش به‌سزایی دارد (Govil and Singh, 2010).

ایران دارای موقعیتی خاصی از لحاظ جغرافیایی، اقلیمی و آب و هوایی در دنیا است. کشور ایران رویشگاه بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله گیاهان دارویی می‌باشد. در ایران بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی، یعنی

رقمی معادل دو تا سه برابر تنوع ژنتیکی قاره اروپا به ثبت رسیده است. شرایط رشد مناسب گونه‌های دارویی گیاهی در ایران امکان دستیابی به تولید بالا را فراهم آورده است. در حال حاضر، ایران تنها با ۹۰ میلیون دلار، ۰/۰۹ درصد از تجارت جهانی گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است (اگر چه بخش عمده‌ای از آن به صادرات زعفران تعلق دارد) (امید بیگی ۱۳۸۵). متأسفانه، سطح زیر کشت گیاهان دارویی مهم در ایران کمتر از ده هکتار است و این سطح زیرکشت نیز فقط به حدود ۴۰ گونه محدود می‌شود، این در حالی است، که این عدد در کشور چین به حدود ۲۰۰ گونه می‌رسد.

ایران خاستگاه بسیاری از گیاهان دارویی است. در کشور ما، کشت و کار گیاهان دارویی با توجه به نیاز صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی به گیاهان دارویی به‌عنوان مواد خام اولیه در حال گسترش است (امید بیگی، ۱۳۷۹). با توجه به نیاز روز افزون در این بخش، امکان تأمین این نیاز از طبیعت غیر ممکن است. بنابراین توسعه کشت و کار گیاهان دارویی باید متناسب با نیاز روز افزون کشور افزایش یابد. روند رو به رشد مصرف گیاهان دارویی، بدون توسعه روش‌های مناسب کاشت و مدیریت و برنامه‌ریزی صحیح، می‌تواند پیامدهای نگران کننده‌ای را برای محیط زیست بدنبال داشته باشد. اگرچه قیمت تمام شده گیاهان دارویی جمع‌آوری شده از طبیعت وحشی بسیار ارزان‌تر است، اما به‌منظور جلوگیری از نابودی تنوع ژنتیکی، عدم یکنواختی محصولات جمع‌آوری شده و در بعضی موارد کیفیت پایین آن‌ها، اجرای عملیات پس از برداشت نامناسب، این روش پاسخگوی نیاز صنایع دارویی نمی‌باشند.

ارزش بازارهای جهانی داروهای گیاهی با رشد قابل توجهی همراه بوده است. از آنجا که بخش اعظمی از بازار گیاهان دارویی دنیا، به تولید متابولیت‌های ثانویه مشتق از این گیاهان تعلق دارد، لذا متابولیت‌های ثانویه از ارزش افزوده بسیار بالایی برخوردار هستند. ارزش بازار جهانی داروهای مشتق از گیاهان در سال ۲۰۰۲، با رشد ۶/۲ درصدی نسبت به سال پیش از آن، به ۱۳/۷ میلیارد دلار افزایش یافت. همچنین این مقدار در سال ۲۰۰۷ به رقمی معادل ۱۸/۸ میلیارد دلار رسید. آمریکا در سال ۲۰۰۲ بیش از ۵۰ درصد این بازار را به خود اختصاص

داده بود. با این حال انتظار می‌رود ارزش این بازار تا سال ۲۰۵۰ به رقمی معادل شش تریلیون دلار افزایش یابد (کشفی بناب، ۱۳۸۹). وجود ۱۱ اقلیم از ۱۳ اقلیم شناخته شده جهان و برخورداری از ۳۰۰ روز آفتابی در سال و اختلاف دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گرادی در ایران، یک فاکتور مناسب برای رشد و تکثیر گیاهان دارویی را فراهم آورده است، به طوریکه در این شرایط اکوژیکوی خاص، زمینه رشد و نمو گیاهان وحشی و دارویی مهیا شده است. در حال حاضر، ایران دارای بیش از ۹۰ درصد گونه‌های گیاهی جهان است (کشفی بناب، ۱۳۸۹).

۲-۵- شنبلیله

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum graceum* L. گیاهی متعلق به جنس *Trigonella* است که بیشتر گونه‌های این جنس دیپلوئید هستند ($2n=2x=16$)، اگرچه گونه‌هایی با تعداد کروموزوم‌های هاپلوئید ۸، ۹، ۱۱ و ۱۴ نیز در این جنس شناسایی شده است (Darlington and Wylie, 1955). یمن، قفقاز، اوراسیا، آفریقا، افغانستان، چین و ایران به عنوان مراکز تنوع و خاستگاه شنبلیله معرفی شده‌اند (Fury, 1955). این گیاه در استان‌های آذربایجان غربی، اصفهان، لرستان، جنوب فارس، کرمان، بلوچستان، زاهدان، خراسان و سمنان به صورت طبیعی می‌روید (Najafpour, 1994). میوه‌ها به صورت نیام و حاوی ۵۰-۲۰ دانه می‌باشند. بذور تخم مرغی شکل آن دارای بو و طعم تلخ هستند (Dini, 2006).

دانه و برگ این گیاه از نظر دارویی حائز اهمیت می‌باشند و در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، کلسترول بالا، سرطان، ضد میکروب، نقرس، سل و زخم معده موثر هستند (Yadav et al., 2004). دوره رشد این گیاه کوتاه است و نسبت به بافت خاک حساس نیست. از آنجاکه این گیاه متعلق به خانواده بقولات است، لذا با تثبیت نیتروژن به عنوان یک گیاه مناسب برای تولید کود سبز و تثبیت نیتروژن در کشاورزی مطرح است (Hasanzadeh et al., 2010). ریشه‌های این گیاه افشان و رنگ بذر آن زرد است. شنبلیله دارای ساقه‌های منشعب و برگ‌های سه برگچه‌ای و گل‌های سفید است. دانه‌های این گیاه حاوی پروتئین و آمینواسیدهای

لازین، تریپتوفان، آرژینین، هیستیدین و هیدروکسی ایزولوسین می‌باشد. همچنین، شنبلیله سرشار از آلکالوئیدهایی مانند تریگونلین است و مقادیر فراوانی از موسیلاژ، تانیک اسید، روغن‌های فرار و غیرفرار و دایوسجنین در این گیاه یافت می‌شود. برگ‌های این گیاه منبع کاملی از کلسیم، آهن، بتاکاروتن و انواع ویتامین محسوب می‌شود. شنبلیله سرشار از لکتین، کولین، مواد معدنی، کمپلکس ویتامین‌های A، B، D، آهن، فسفات، پارا آمینوبنزوئیک اسید و ترکیبات شیمیایی مهمی از جمله ساپونین‌ها، کومارین، نیکوتینیک اسید، فیتیک اسید و تریگونلین است (Sheikhlar, 2013).

حدود ۱۰۰ گونه از این گیاه در دنیا و بیش از ۳۲ گونه در ایران گزارش شده است (Habori and Raman, 1998). پراکنش وسیع کشت شنبلیله در جهان بر سازگاری این گیاه نسبت به اقلیم‌های مختلف دلالت دارد (Petropoulos, 2002). مقادیر فراوانی از ساپونین‌ها نیز در شنبلیله گزارش شده است. این ترکیبات به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی شبیه صابون به ساپونین‌ها معروف هستند. ساپونین‌ها نقش‌های اکولوژیکی مختلفی از قبیل وظایف دفاعی در مقابل حشرات و آفات و بیماری‌ها را بر عهده دارند، اگرچه برخی از آن‌ها از نظر دارویی حائز اهمیت می‌باشند. فعالیت زیستی ساپونین‌ها با خصوصیات آمفی‌پاتیک آن‌ها که شامل یک اسکلت تری‌ترپنی آب‌گریز و زنجیره‌ی هیدروکربنی آب‌دوست است، مرتبط می‌باشد (Bach and Rohmer, 2012). این ترکیبات برای حشرات مخصوصاً در مقادیر زیاد سمی هستند، که بیانگر نقش مهم ساپونین‌ها را در سیستم دفاعی گیاه است (Bach and Rohmer, 2012).

با وجود اینکه شنبلیله سرشار از ترکیبات مختلف دارویی و تغذیه‌ای است، اما این گیاه بیشتر با دایوسجنین شناخته می‌شود. مطالعات زیادی جهت شناسایی نقش دایوسجنین در درمان بیماری‌های متابولیکی (چاقی، دیابت، کلسترول بالا و چربی خون بالا)، التهاب و سرطان انجام شده است. این ترکیب در مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی^۱ در لاین‌های مختلف سلول‌های سرطانی موثر است (Upadhyay et al., 2014). خاصیت ضد سرطانی دایوسجنین با نقش این ترکیب ارزشمند در راه‌اندازی پیام‌های سلولی چندگانه در ارتباط با رشد، تمایز

^۱Apoptosis

و مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول‌های سرطانی مرتبط است (Raju and Mehta, 2008). دایوسجنین پاسخ‌های ایمنی سلولی تخصصی و غیر تخصصی را بهبود می‌بخشد. گزارشاتی از کاهش تکثیر ویروس هپاتیت C با به کارگیری دوزهای پایین دایوسجنین بدون سمیت برای سلول وجود دارد (Ashfaq and Idrees, 2014).

۲-۶- متابولیت‌های ثانویه

با توجه به اینکه گیاهان قادر به جابجایی نیستند، لذا توانایی تطابق با محیط و سازگاری به خوبی در آن‌ها نهادینه شده است. توانایی سنتز انواعی از ترکیبات شیمیایی تحت عنوان متابولیت‌های ثانویه، از جمله پاسخ‌های تطبیقی گیاهان به تنش‌های محیطی محسوب می‌شوند. این ترکیبات بخشی از ساختمان مولکولی پایه سلول محسوب نمی‌شوند و در مقادیر بسیار اندکی در بافت‌ها، اندام‌های خاص یا در مراحل خاصی از رشد تولید می‌شوند (Karuppusamy, 2009; Chaudhary et al., 2018). بیشتر متابولیت‌های ثانویه از اهمیت دارویی برخوردار هستند، زیرا سنتز شیمیایی آن‌ها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست (Oksman and Inze, 2004). در حقیقت متابولیت‌های ثانویه به گروهی از ترکیبات اطلاق می‌گردد که نقش قابل توجهی در فرایندهای اولیه حیات گیاه ندارند، بلکه در سازگاری گیاهان با محیط اطرافشان موثر هستند (Dixon, 2001). این ترکیبات دارای خواص ضدباکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی هستند و از گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند. در ضمن، این ترکیبات در جذب نور فرابنفش و حفاظت برگ‌ها در برابر آثار زیان بار این اشعه موثر هستند (Li et al., 1993). این ترکیبات همچنین از گیاهان در برابر آسیب جانوران (مانند حشرات) جلوگیری می‌کنند و یا ممکن است منجر به بروز اختلالات باروری در جانور تغذیه‌کننده شوند. متابولیت‌های ثانویه کمتر از یک درصد وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند و تولید آن‌ها به میزان قابل توجهی به مراحل رشدی و فیزیولوژیک گیاه وابسته است (Oksman et al., 2004).

متابولیت‌های ثانویه دارای فعالیت‌های زیستی متعددی هستند. از این ترکیبات به صورت گسترده‌ایی در صنایع داروسازی، پزشکی، آرایشی و بهداشتی و عطرسازی استفاده می‌شود (Wink, 1999; Alfermann et al., 1999).

(2005). آلکالوئیدهایی از قبیل مورفین (مسکن درد)، کودئین (ضد سرفه)، پاپاورین (مهارکننده فسفودی استراز)، افدرین (تحریک کننده)، کوئینین (ضد مالاریا)، رسپین (کنترل کننده فشارخون)، گالاتامین (مهارکننده استیل کولین استراز)، اسکوپولامین (ضد تهوع)، بربرین (درمان پسوریازیس)، کاپاسین (درمان دردهای روماتیک)، کولشی سین (درمان نقرس) و بسیاری ترکیبات دیگر، جزء مهمترین متابولیت های ثانویه دارویی به شمار می روند (Rao and Ravishankar, 2002; Zhoua and Wu, 2006).

امروزه روش های مختلفی برای افزایش میزان تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان عالی مورد استفاده قرار می گیرد. استفاده از الیسیتورهایی از قبیل انواع تنش های غیرزیستی، هورمون ها، اشعه، پلاسمای سرد و نانوذرات از جمله مهمترین این موارد محسوب می شوند. در حقیقت، الیسیتورها عوامل فیزیکی، شیمیایی و زیستی هستند که قادرند کیفیت و کمیت یک متابولیت در گیاه را تغییر دهند (Bourgaud et al., 2001).

۲-۷- مسیر بیوسنتز دایوسجنین

دایوسجنین از طریق مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدها^۱ تولید می شود. این مسیر با پیش ماده ی استیل کوآنزیم آ به ایزوپنتیل پیروفسفات^۲ می رسد. برای تولید دایوسجنین، مسیر لانوسترول (Lanosterol) و کلسترول (Cholesterol) و مسیر سیکلوآرتنول (Cycloartenol) و حدواسط سیتواسترول (Cytosterol) پیشنهاد شده است. سیکلوآرتنول سنتاز (Cycloartenol synthase) و لانوسترول سنتاز (Lanosterol synthase) دو آنزیم کلیدی متعلق به خانواده ی اکسیدواسکوالن سیکلازها (Oxidosqualene cyclase) هستند و در این مسیر دخالت دارند (Chaudhary et al., 2015). شناسایی مسیر بیوسنتزی دایوسجنین و ژن های مهم این مسیر در مهندسی این متابولیت حیاتی به نظر می رسد. متاسفانه اطلاعات اندکی در مورد مسیر بیوسنتزی دایوسجنین در شنبلیله وجود دارد و بیشتر اطلاعات در مورد این مسیر بیوسنتزی در سایر گیاهان مانند یام (*Dioscorea*)

¹ Isoprenoids

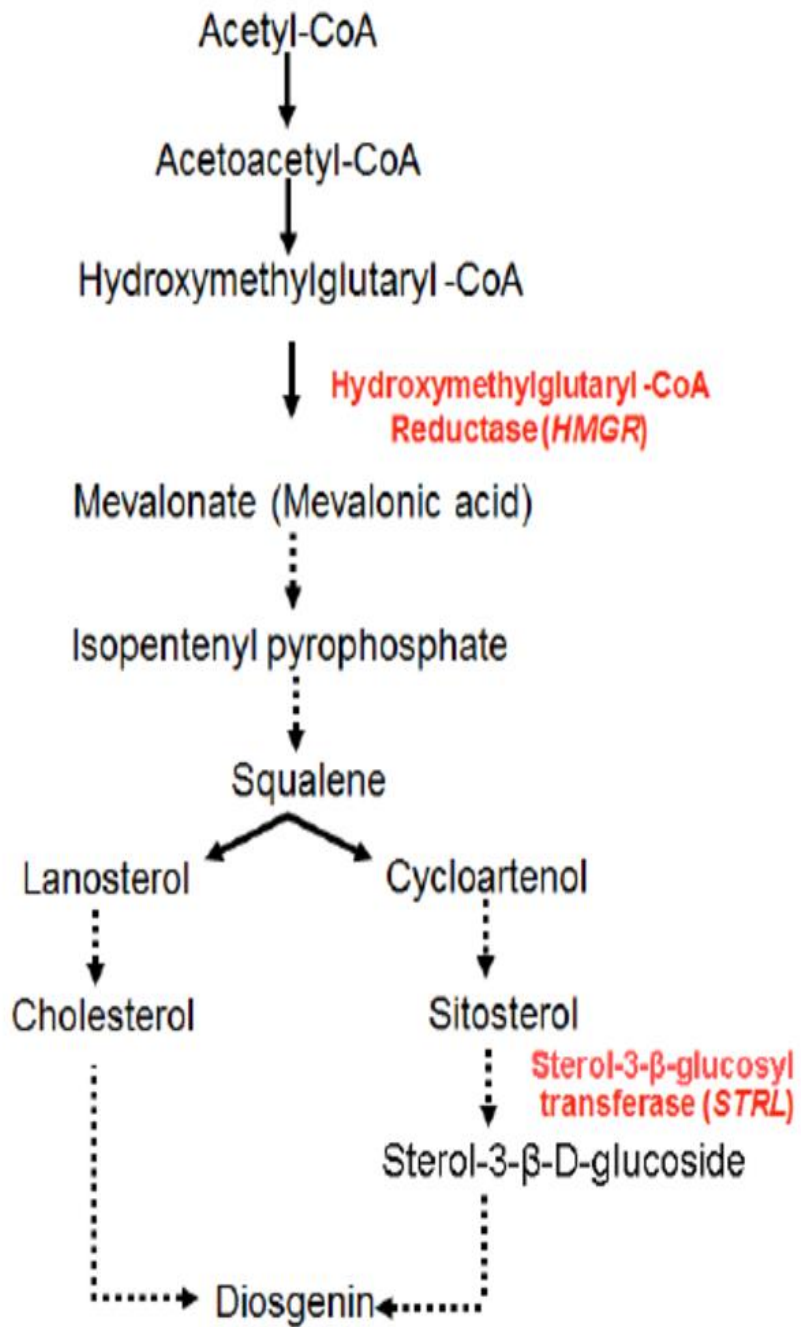
² Isopentyl pyrophosphate

villosa) و خانواده سولاناسه^۱ در دسترس است. مسیر بیوسنتز دایوسجنین دارای پیچیدگی‌های زیادی است (et al., 2019). بر طبق آخرین گزارش موجود در سال ۲۰۱۹ برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین با روش طراحی آغازگرهای دژنره^۲ شناسایی و جداسازی شدند و رابطه بین میزان بیان این ژن‌ها و محتوای دایوسجنین (با استفاده از HPLC^۳) در نه توده شنبلیله با محتوای دایوسجنین متفاوت بررسی شد (Mohammadi et al., 2019) و شمایی کلی از مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله ارایه گردید (شکل ۱-۲).

¹ Solanaceae

² Degenerate

³ High Performance Liquid Chromatography



شکل ۱-۲- مسیر پیشنهادی بیوسنتز دایوسجنین و استرول‌های گیاهی در گیاه شنبلیله

الف) اسکوالن سنتاز^۱ (SQS)

ژن SQS، یکی از ژن‌های مهم در مسیر بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترین‌ها است. اسکوالن سنتاز، اولین آنزیم در مسیر ایزپرونوئیدها و در بیوسنتز استرول و تری‌ترین‌ها محسوب می‌شود. از طریق فعالیت این آنزیم در این مسیر، دو مولکول فارنسیل پیروفسفات با کمک اسکوالن سنتاز به یکدیگر متصل می‌شوند و در نهایت یک مولکول اسکوالن تشکیل می‌گردد (Bach and Rohmer, 2012). ارتباط مستقیمی بین سطوح بیان اسکوالن سنتاز و محصولات تری‌ترینی در گیاهان *Ganoderma lucidum* و *Panax ginseng* گزارش شده است. همچنین نقش این آنزیم در بیوسنتز فیتواسترول‌ها و تری‌ترین‌ها به اثبات رسیده است.

ب) اسکوالن اپوکسیداز^۲ (SEP)

اکسیدشدن اسکوالن از طریق آنزیم اسکوالن اپوکسیداز، منجر به تشکیل ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن در مسیر بیوسنتزی شنبلیله می‌شود. احتمالاً، یکی از دو ساختار چهار حلقه‌ای سیکلوآرتنول یا بتا‌آمیرین توسط ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن کاتالیز می‌شود (Bach and Rohmer, 2012). در حقیقت این آنزیم یکی از آنزیم‌های محدودکننده‌ی سرعت در مسیر بیوسنتزی ساپونین‌ها می‌باشد. این آنزیم اولین اکسیژناسیون را در مسیر بیوسنتزی فیتواسترول‌ها و ساپونین‌های تری‌ترینوئید کاتالیز می‌کند.

ج) سیکلوآرتنول سنتاز^۳ (CAS)

سیکلوآرتنول سنتاز می‌تواند با تغییر سیکلوآرتنول به فرم‌های رایج، ساختارهای استرولی مانند استیگماسترول، سیتواسترول یا کامپسترول را بوجود آورد. به دلیل نقش کلیدی ژن کدکننده‌ی آنزیم CAS در

¹ Squalene synthase

² Squalene epoxidase

³ Cycloartenol synthase

ساخت استرول‌های ضروری غشا، این ژن به طور گسترده‌ای در گیاهان حفاظت شده است (Bach and Rohmer, 2012)

د) استرول متیل ترانسفرازها^۱ (SMTs)

از مشتقات ایزوپرنوئید با هسته چهار حلقه‌ای استروئیدی، می‌توان به استرول‌ها اشاره کرد (Edwards and Ericsson, 1999). یکی از ویژگی‌های کلسترول و فیتواسترول‌های اصلی، تعداد کربن‌های موجود در موقعیت کربن ۲۴ است (Benveniste, 1986). در حقیقت یک یا دو کربن اضافی فیتواسترول‌ها در طول فرآیند آلکیل شدن، توسط S-آدنوزیل متیونین وابسته به C24-methyltransferase کاتالیز می‌شود. C24-methyltransferase مرحله اول را با اضافه کردن یک گروه متیل آغاز می‌کند و در ادامه C24-methyltransferase 2 و C24-methyltransferase 3 هر کدام یک گروه متیل دیگر (C2) را تا کامل شدن زنجیره جانبی اتیل، به ترکیب اضافه می‌کنند (Schaller *et al.*, 1998). در گیاهان، سیکلوآرتنول یک ترکیب آغازی برای شروع بیوسنتز استرول‌هاست، که سوسترای C24-methyltransferase نیز می‌باشد.

۲-۸- الیسیتورها^۲

الیسیتورها به دو گروه فیزیکی و شیمیایی و همچنین به دو گروه زیستی و غیرزیستی تقسیم می‌شوند (Patel and kushramurthy, 2013). الیسیتورها با تحریک پاسخ‌های دفاعی منجر به بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. الیسیتورها زیستی شامل پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، گلیکو پروتئین‌ها و یا بخش‌هایی از دیواره قارچ‌ها، گیاهان (سلولز و پکتین) و میکروارگانیسم‌ها (کیتین و گلوکان) می‌باشند (Vasconsuelo and Boland, 2007). همچنین، الیسیتورهای زیستی ممکن است دارای ترکیبات مشخصی از قبیل کیتین، کیتوزان، هیف قارچ و عصاره مخمر باشند. الیسیتورهای غیرزیستی منشا بیولوژیکی ندارند و به دو گروه

¹ Sterol methyltransferase

² Elicitors

فاکتورهای فیزیکی و ترکیبات شیمیایی تقسیم می‌شوند (Patel and Krishnamurthy, 2013). از الیستورها در پژوهش‌های مرتبط با حوزه به زیست فناوری گیاهی با هدف تحریک پاسخ‌های رشدی و سیستم دفاعی گیاه، کسب اطلاعاتی در زمینه مسیرهای بیوسنتزی و تنظیم متابولیت‌های ثانویه و تحریک افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود.

۲-۸-۱- نانوذرات

اخیراً، علم با پیشرفت‌هایی در حوزه فناوری نانو همراه بوده است. همان‌طور که از نام آن پیدا است، این دانش دارای کاربردهای عملی به‌ویژه در علوم مواد و الکترونیک است، تا اینکه صرفاً در مباحث نظری علوم مورد توجه باشد. فناوری نانو، دست‌ورزی مولکول‌های منفرد یا حتی اتم‌ها را شامل می‌شود. شاید هدف اصلی فناوری‌های نانو تولید ترکیبات سازنده اتم-اتم یا مولکول-مولکول به منظور ایجاد موادی با خصوصیات بهبود یافته یا جدید باشد. ترکیبات درونی سلول‌های بیولوژیکی در همان مقیاس نانو نیز بوسیله فناوری‌های نانو مطالعه می‌شوند. به‌عنوان یک اصل مورد توافق، متخصصین فناوری‌های نانو در زیست‌شناسی سلولی به دنبال ایجاد ساختارها، فرآیندها و اطلاعات مفید هستند. اندامک‌های سلولی از قبیل ریبوزوم‌ها ممکن است به‌عنوان نانوماشین‌ها یا نانو مونتاژ^۱ قابل برنامه‌ریزی مدنظر باشند. بنابراین فناوری‌های نانو در زیست‌شناسی مولکولی قابلیت به‌کارگیری دارد (Singh et al., 2015; Rai et al., 2018).

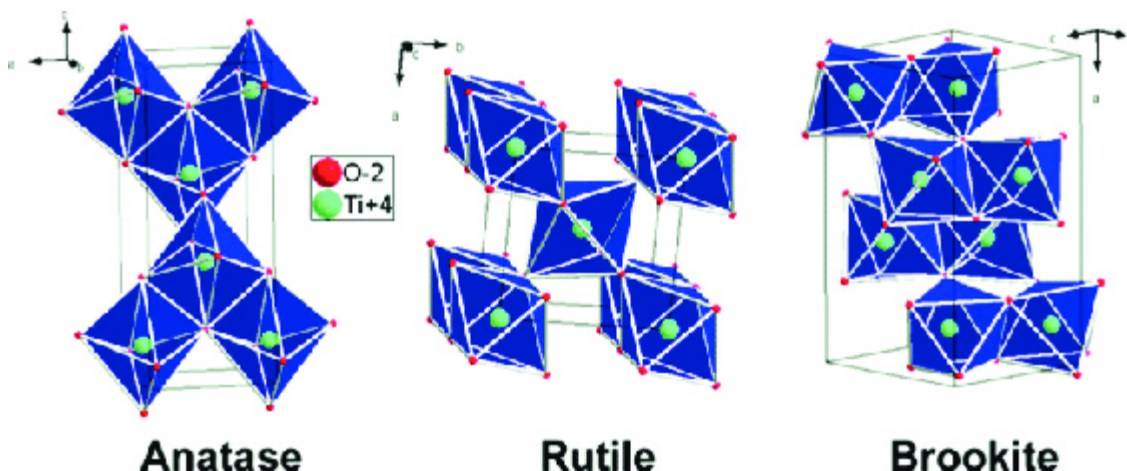
نانوذرات از نظر شکل ظاهری به درختسان‌ها (Dendrimers)، نانوسفرها (Nanospheres)، نانوکپسول‌ها (Nanocapsules)، لیپوزوم‌ها (Liposomes)، میسل‌ها (Micelles) فولرن‌ها و نانولوله‌ها (Fullerens and nano tubes) و پلی‌مرزوم‌ها (Polymeraomes) تقسیم می‌شوند. همچنین، نانوذرات از نظر ماده سازنده‌شان به دو گروه آلی و معدنی تقسیم می‌شوند. در گروه آلی، مولکول‌های آلی جزء اصلی اجزا سازنده نانوذرات محسوب می‌-

¹ Nano-Assemblers

شوند و در گروه معدنی، می‌توان به فلزاتی از قبیل آهن، طلا، نقره، روی، مس، کبالت، تیتانیوم و... و برخی از عناصر معدنی اشاره کرد. لیپوزوم‌ها، نانوتیوب‌های کربنی، نانوذرات لیپید جامد، پلیمرها در گروه ذرات آلی قرار دارند (Haley and frankey, 2008; Senior, 2008).

۲-۸-۱-۱- نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم

دی‌اکسیدتیتانیوم (TiO_2) در تولید رنگدانه سفید با هدف به‌کارگیری در صنایع رنگ، پوشش، کاغذ، مقوا، پلاستیک، جوهر پرینت، منسوجات و بافتنی‌ها، سیستم‌های کاتالیز، سرامیک‌ها، پارکتهای کف پوش، ساخت سقف‌ها، لوازم آرایشی، داروسازی، عوامل تصفیه‌کننده آب، رنگ‌های خوراکی، صنعت خودروسازی قابل استفاده است (Macwan et al., 2011). دی‌اکسیدتیتانیوم، در محلول‌های قلیایی، آب، هیدروکلریک اسید، اسید سولفوریک رقیق و حلال‌های آلی غیرقابل حل است، در حالی‌که در هیدروفلوئوریک اسید و سولفوریک اسید غلیظ و داغ به آهستگی حل می‌شود. دی‌اکسیدتیتانیوم، به واسطه خاصیت فوتوکاتالیستی خود، اشعه فرابنفش را جذب و از اثر تخریبی آن می‌کاهد. کارایی دی‌اکسیدتیتانیوم با ساختار بلوری، شکل و اندازه ذرات آن مرتبط است. روتایل، آناتاز و بروکیت، سه ساختار بلوری متداول از دی‌اکسیدتیتانیوم هستند. واحدهای بلوری در هر سه فاز، هشت وجهی‌های TiO_2 را تشکیل می‌دهند. تفاوت این سه فاز در نحوه آرایش هشت وجهی‌ها است (شکل ۲-۲). روتایل پایدارترین شکل از دی‌اکسیدتیتانیوم در فشار معمولی است، در حالی‌که دو فاز دیگر نیمه پایدار هستند. آناتاز در دماهای معمولی پایدار است، اما در دماهای بالای 550° درجه سلسیوس به آرامی به روتایل تبدیل می‌شود (Chen and Mao, 2007). دی‌اکسیدتیتانیوم قدرت بازدارندگی خوبی در برابر اشعه UV دارد و به علت غیرسمی بودن، پایداری شیمیایی در دمای بالا و پایداری دائم در حضور UV دارای کاربردهای فراوانی در مباحث عملی است (Kuznesof and Rao, 2006).



شکل ۲-۲- تصویری شماتیک از ساختارهای بلوری دی‌اکسیدتیتانیوم

در مورد استفاده از دی‌اکسیدتیتانیوم به عنوان یک محصول تجاری، تا کنون نگرانی در خصوص اثرات و مخاطرات زیست محیطی آن گزارش نشده است. این یافته‌ها با توجه به نتایج حاصل از چندین پژوهش اپیدمیولوژیکی که در آن‌ها بیش از ۲۰۰۰۰ کارگر در صنایع تولید تیتانیوم در شمال آمریکا و اروپا فعالیت داشتند، استوار است. در مجموع نتایج تحقیقات مختلف شواهدی مبنی بر بروز سرطان یا تاثیرات مخرب در این نانو ذره را ارایه نداده‌اند. نقش دی‌اکسیدتیتانیوم در افزایش و تحریک رشد گیاه و کمک به جذب عناصری از قبیل نیتروژن، فسفر، منیزیم، آهن، منگنز و روی به اثبات رسیده است (Pais, 1983). کارایی نانوذرات دی-اکسیدتیتانیوم به غلظت نانوذرات، اندازه، ساختار شیمیایی، پوشش سطحی، نحوه کاربرد، روش‌های ترکیبی و گونه‌های گیاهی وابسته است (Akbari et al., 2014). نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و اکسید روی بیشترین استفاده را در بسیاری از صنایع به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی خاص خود دارند. دی‌اکسیدتیتانیوم در افزایش کارایی دستگاه فتوسنتزی و افزایش توانایی گیاه برای جذب انرژی خورشید موثر است (Akbari et al., 2014). همچنین دی‌اکسیدتیتانیوم با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مالون دی‌آلدئید در کاهش اثرات ناشی از تنش‌ها موثر است (Akbari et al., 2014). فرم آناتاز، سبب افزایش توانایی رشد ریشه در جذب آب و مواد غذایی و در نهایت افزایش عملکرد گیاه می‌گردد (Yang and

Hong, 2006) در ضمن، آناتاز با جذب نور و تبدیل آن، از کلروپلاست محافظت می‌کند و بدین ترتیب تداوم و زمان انجام فتوسنتز را افزایش می‌دهد (Yang and Hong, 2006)

۲-۹- مروری بر مطالعات پیشین

شواهد قطعی مبنی بر کاهش اثرات تخریبی تنش‌های غیرزیستی بعد از تیمار نانوذرات تیتانیوم ارائه شده است. سطح تماس این نانوذره به دلیل کوچکی ذرات آن، با سایر مواد افزایش و در نتیجه کارایی و اثربخشی آن بیشتری می‌شود (Omid, 1998). در پژوهشی کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش وزن خشک، محتوای کلروفیل، فعالیت آنزیم روبیسکو، سرعت فتوسنتز و میزان نیتروژن در اسفناج شد (Zheng et al., 2005). نتایج پژوهش گاوو و همکاران (2006) نشان داد که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در بهبود جذب نور و تبدیل انرژی نورانی به انرژی الکتریکی و شیمیایی، جذب دی‌اکسید کربن، فعالیت روبیسکو و در نهایت جلوگیری از پیری کلروپلاست موثر است (Gao et al., 2006). در مطالعه هانگ و همکاران (2005) کاربرد نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش رشد، محتوای کلروفیل و سرعت فتوسنتز، افزایش میزان جذب نور و تسریع انتقال الکترون شد (Hang et al., 2005).

در پژوهش خاوری نژاد و همکاران (۱۳۹۵) تنش آلومینیوم به صورت معنی‌داری محتوای پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را افزایش داد. محتوای پروتئین کل در بخش ریشه و برگ به صورت معنی‌داری کاهش نیافت. در ضمن، تنش آلومینیوم منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیدازها (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پلی فنل اکسیداز (PPO) شد. در تحقیق هاشمی دهکردی و همکاران (۱۳۹۵) کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم (آناتاز) در غلظت ۱۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش محتوای کلروفیل برگ مواد جامد محلول، میزان ویتامین ث در توت فرنگی شد.

نتایج پژوهش لوو و همکاران (2001) اثرات موثر نانو اکسیدتیتانیوم و نانو اکسیدسلنیوم را در افزایش سرعت جوانه زنی بذور سویا و رشد گیاهچه‌های آن‌ها را تایید کردند. همچنین این دو نانوذره فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز را افزایش دادند (Lu et al., 2001). همچنین تحقیقات پیشین نشان داده است که نانو اکسیدتیتانیوم سبب افزایش سنتز کلروفیل، تغییر وزن خشک، عملکرد و برخی از ویژگی‌های متابولیسمی موجودات فتوسنتز کننده می‌شود، که این تغییرات غالباً با القای سامانه‌های دفاعی و کاهش قابل توجه در شاخص‌های خسارت همراه بوده است (Feizi et al., 2012; Singh et al., 2012; Mohammadi et al., 2013). همچنین در پژوهشی که توسط هاوترون و همکاران (2012) صورت گرفت، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریزوسفر سویا و در نتیجه جوانه‌زنی و رشد سویا بعد از تیمار با ترکیب نانوذرات دی‌اکسیدسلنیوم و تیتانیوم در مقادیر پایین افزایش یافت (Hawthorne et al., 2012).

نتایج پژوهش اسیل و نومن (2009) نشان داد که دی‌اکسیدتیتانیوم به واسطه پرکردن فضای بین میکرو فیبریل‌های سلولزی دارای اثرات منفی بر رشد برگ، فعالیت هیدروکسی ریشه و تعرق در گیاهچه ذرت است (Asli and Neumann, 2009). بر طبق پژوهش مارتینز و همکاران (۱۹۹۰)، کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت محلول پاشی بر روی برگ‌های فلفل باعث افزایش اسید آسکوربیک و کاسپانتین (مسئول ایجاد رنگیزه قرمز) در میوه فلفل می‌شود (Martínez et al., 1990).

در مطالعه امینی و همکاران (۲۰۱۷)، کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم با القای برخی از پاسخ‌های سلولی در طول دوره تنش سرما منجر به کاهش خسارت سلولی و بهبود سطوح تحمل در نخود شد. همچنین کاربرد دی-اکسیدتیتانیوم به صورت موثری منجر به کاهش ROSهای بین سلولی (H_2O_2) دخیل در القای تنش‌های اکسیداتیو و افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی شد (Amini et al., 2017). در پژوهش شرقی و خلیوند (۱۳۹۹)، کاربرد نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و اسید سالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید

دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پروکسیداز در شرایط تنش کمبود آب همراه بود. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که کاربرد این نانوذره قادر به تعدیل اثرات تنش خشکی است (شرقی و خلیوند، ۱۳۹۹).

نتایج پژوهش شیخی و همکاران (۱۳۹۹) نشان داد که تنش دمای بالا منجر به کاهش محتوای کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل کل، کارتنوئید و افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید و درصد نشت الکترولیت در شنبلیله می‌گردد و کاربرد ۲۴-پی‌براسینواستروئید در طول تنش به صورت قابل توجهی مانع از کاهش این صفات گردید. همچنین، کاربرد سطوح مختلف ۲۴-پی‌براسینواستروئید در دماهای بالا منجر به کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدئید و افزایش تحمل شنبلیله شد. همچنین میزان بیان ژن SSR در تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتیگراد) و سطح ۵ ppm از ۲۴-پی‌براسینواستروئید به میزان ۳/۵ برابر افزایش یافت. بیان ژن SEP (Squalene epoxidase) نسبت به شرایط دمای نرمال در سطوح ۲ و ۵ ppm به ترتیب ۲۰ و ۱۰ برابر افزایش یافت.

در پژوهش ابراهیمی بسابی و همکاران (۲۰۲۰)، کاربرد پلاسما سرد به صورت موثری منجر به افزایش بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین و افزایش محتوای کلروفیل، کارتنوئید، فعالیت کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز گردید. آن‌ها نتیجه گرفتند که کاربرد پلاسما سرد به منظور افزایش بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه و تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌تواند به عنوان یک رویکرد جدید مورد توجه قرار گیرد.

در پژوهش زاینورن و همکاران (2019)، تیمار نانوذره اکسیدروی منجر به کاهش محتوای کلروفیل، نرخ فتوسنتز، رسانایی روزنه‌ای و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در *Persicaria minor* شد (Zainuren et al., 2019). در پژوهش موساوات و همکاران (2019) بیشترین مقدار تیمول و کارواکول گونه‌های *Thymus* در غلظت

۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره روی به ترتیب در *T. daensis* و *T. kotschyanus* ثبت شد (Mosavat et al., 2019).

در یک تحقیق دیگر، اثر نانوذرات اکسید روی و مس بر محتوای متابولیت‌های ثانویه در کشت کالوس استویا (*Stevia rebaudiana*) بررسی شد. بیشترین محتوای فلاونوئید، فنل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره روی مشاهده شد (Javed et al., 2018).

با توجه به اهمیت شنبلیله بعنوان یک گیاه دارویی، در این تحقیق اثرات نانو ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر رفتار فیزیولوژیکی گیاه شنبلیله و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز متابولیت ارزشمند دایوسجنین تحت تنش سرما مورد بررسی قرار گرفت.

فصل سوم

مواد و روش ها

۳- مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی

به منظور ارزیابی اثر دی‌اکسیدتیتانیوم بر افزایش تحمل شنبلیله تحت تنش سرما و بررسی تغییرات بیان برخی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین، این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد. در این آزمایش از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم در سه سطح ۲، ۵ و ۱۰ ppm در دو شرایط دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد (تنش سرما) و ۲۳ درجه سانتی‌گراد (دمای نرمال) استفاده گردید. در ضمن در سه بازه زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش از گیاهان نمونه برداری شد. در این آزمایش ابتدا بذور گیاه شنبلیله ضدعفونی و در گلدان‌های ۲۰×۲۵×۳۰ سانتی‌متری با ترکیب پیت ماس و پرلیت کشت شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. سپس، گیاهان پنج هفته‌ای با سه سطح از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم اسپری‌پاشی شدند و گلدان‌ها به دو گروه تقسیم شدند. برای تهیه این غلظت‌ها، ابتدا مقادیر مورد نظر دی‌اکسیدتیتانیوم با ترازوی دقیق وزن و در آب دو بار تقطیر حل شدند. به منظور اطمینان از حل شدن دی‌اکسیدتیتانیوم و تهیه یک محلول با اندازه‌های نانو، محلول مورد نظر به مدت یک ساعت در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد. تعدادی از گلدان‌ها در شرایط نرمال و تعدادی دیگر به اتاقک رشد به منظور اعمال تنش سرما منتقل شدند. سپس در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تنش سرما از برگ‌های گیاه نمونه‌برداری و در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

۳-۲- ارزیابی صفات فیزیولوژیک

۳-۲-۱- اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کارتنوئید

جهت تخمین میزان کلروفیل، ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه برگ با ازت مایع به خوبی پودر و در پنج میلی‌لیتر استون ۸۰ هموژنایز گردید. سپس نمونه‌ها با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصله به فالكون‌ها جدید منتقل و با استفاده از استون به حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر افزایش یافتند (Arnon, 1967). سپس میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV 2150) و در طول موج‌های ۴۸۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر تعیین گردید و محتوای کلروفیل a ، b و کارتنوئید با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$a = \frac{V}{1000} \times W \times (A_{645} - 2/69 A_{663}) - 12/7 (A_{663}) \text{ (گرم بافت / میلی‌گرم) کلروفیل } a$$

$$b = \frac{V}{1000} \times W \times (A_{663} - 4/69 A_{645}) - 22/9 (A_{645}) \text{ (گرم بافت / میلی‌گرم) کلروفیل } b$$

$$227 \text{ (میلی‌گرم کلروفیل } b) - \text{ (میلی‌گرم کلروفیل } a) / 27 - 3 / 27 (A_{480}) - 100 = \text{ (گرم بافت / میلی‌گرم) کارتنوئید}$$

در این فرمول‌ها V و W به ترتیب نشان‌دهنده حجم نهایی محلول (۱۰ میلی‌لیتر) و وزن نمونه برگ هستند

(Arnon, 1967).

۳-۲-۲- قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی

تحميل به سرما بر اساس شاخص هدایت الکتریکی^۱ بافت‌های آسیب دیده شنبلیله پس از اعمال تیمار دی اکسید تیتانیوم اندازه‌گیری شد. برای این منظور با استفاده از دستگاه پانچ دیسک‌های با قطر ۰/۵ سانتی‌متر

¹ Electrolyte Leakage Index

از برگ‌های تهیه و به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل شدند. به‌منظور جذب بهتر آب از پمپ خلا استفاده شد. سپس لوله‌های آزمایش در دستگاه شیکر قرار گرفتند و میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC_1) با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد، لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم انکوبه شدند و به منظور کاهش دما، فالكون‌ها به مدت یک ساعت در دستگاه شیکر قرار گرفتند. در نهایت میزان هدایت الکترولیتی نمونه‌ها (EC_2) تعیین شد. مقدار شاخص خسارت بر اساس فرمول

$$I = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

محاسبه شد (Hepburn et al., 1986).

۳-۲-۳- اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA)

تجمع مالون دی‌آلدئید برگ با استفاده از محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA)^۱ تعیین شد. برای این منظور ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه برگ تازه در دو میلی‌لیتر بافر استخراج (تری کلرواستیک اسید^۲ یک درصد) هم‌وزنه و به مدت پانزده دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، یک میلی‌لیتر از فاز رویی^۳ حاصل با دو میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA نیم درصد) حاوی اسید تری-کلرواستیک اسید (TCA بیست درصد) مخلوط و در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و در نهایت به مدت ۳۰ دقیقه در درون یخ قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شدند. غلظت مالون دی‌آلدئید براساس فرمول $C = D/E$ محاسبه شد. در این فرمول D (عدد قرائت شده) و E ضریب تمایز مولار (مول/سانتی‌متر $10^5 \times 1/56$) است (Health and Packer, 1968).

¹ Thiobarbituric acid

² Trichloroacetic acid

³ Supernatant

۳-۲-۴-اندازه‌گیری پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

۳-۲-۴-۱-تهیه بافر استخراج

برای تهیه بافر استخراج، ۲/۴ گرم تریس در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل و pH آن با استفاده از محلول هیدرو کلریدریک (HCL)، بر روی ۷/۸ تنظیم شد. پس از ۲۴ ساعت قرارگیری نمونه‌های در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، pH آن مجدداً اندازه‌گیری شد و در نهایت حجم نهایی محلول با استفاده از ۲۰ سی‌سی گلیسرول و آب مقطر به ۲۰۰ سی‌سی افزایش یافت (Bradford, 1976).

۳-۲-۴-۲-استخراج پروتئین کل

برای این منظور، ابتدا نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع پودر و ۰/۲۵ گرم از بافت پودر شده به فالكون-های پانزده میلی‌لیتری منتقل و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج^۱ به آن‌ها افزوده شد. پس از ورتکس نمونه همراه با بافر استخراج، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (Bradford, 1976). مایع رویی به تیوب‌های جدیدی منتقل و از این عصاره برای قرائت مقدار پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز استفاده شد.

۳-۲-۴-۳-تهیه محلول برادفورد

ابتدا ۰/۱ گرم کوماسی بلو^۲، ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک^۳ ۸۵ درصد با یکدیگر مخلوط شدند. کوماسی بلو، اتانول و بخشی از آب مقطر با یکدیگر مخلوط و اسید ارتوفسفریک

¹ Extraction buffer

² Coomassie blue

³ Orthophosphoric acid

در یک بازه زمانی دو ساعته و قطره قطره به ترکیب اضافه شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری و سپس با آب مقطر به حجم نهایی یک لیتر رسید. در پایان محلول با استفاده کاغذ صافی فیلتر، در محیط تاریک و خنک (۴ درجه سانتی‌گراد) تا زمان شروع آزمایش نگهداری شد (Bradford, 1976).

۳-۲-۴-۴-تهیه محلول اصلی

برای تهیه محلول اصلی ۵۰ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی^۱ (BSA) به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس برای تهیه محلول کاری، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استوک حاصل، به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد (هر میلی‌لیتر از محلول حاصل شامل ۲۰۰ میکروگرم پروتئین است)، سپس غلظت‌های ۰ تا ۴۰۰ میکروگرم پروتئین آماده شدند (هر کدام از این ترکیبات شامل مخلوطی از محلول کار، آب مقطر و محلول بردفورد معادل ۳ میلی‌لیتر بود). نمونه‌های حاصل به منظور اطمینان از مخلوط شدن و رتکس و پس از ۲۰ دقیقه با دستگاه قرائت شدن (Bradford, 1976).

۳-۲-۴-۵-اندازه‌گیری محتوای پروتئین نمونه‌ها

ابتدا، سه سی‌سی محلول بردفورد^۲ با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی از هر نمونه ورتکس و پس از گذشت ۲۰ دقیقه، غلظت پروتئین هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

¹ Bovine serum albumin

² Bradford

۳-۲-۴-۶- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با روش Aebi اندازه‌گیری شد (Aebi, 1984). برای این منظور ۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) ۵۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳/۴۱ مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم با یکدیگر ترکیب شدند و فعالیت آنزیم به مدت ۵ دقیقه (در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای) ثبت گردید. فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز (ΔOD) بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین و با توجه به فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{240} \times 1 \times V_t \times d_f}{\epsilon \times l \times t \times V_s}$$

در این فرمول U: واحد آنزیمی، ΔA_{240} : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش

1: با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن در معادله (برابر ۲) تعیین می‌گردد.

V_t : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر سه میلی‌لیتر بود)، d_f : فاکتور رقیق کننده (۵۰).

t : مدت زمان واکنش (۳۰۰ ثانیه)، V_s : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۱۰۰ میکرولیتر بود).

ϵ : ضریب خاموشی برابر $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ، l : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است).

۳-۲-۴-۷- سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Dionisio-Sese and Tobia, 1988). نوع و میزان مواد لازم مورد نیاز برای سنجش آنزیم گایاکول پراکسیداز در جدول ۳-۱ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم با فاز تاخیری ۶۰ ثانیه‌ای، به مدت ۵ دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه‌ای ثبت گردید.

جدول ۳-۱- مواد مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

ماده	مولاریته	میزان مورد نیاز (میکرولیتر)
بافر فسفات پتاسیم (pH=7)	۵۰ میلی مولار	۳۰۰۰
هیدروژن پراکسید	۳/۴۱ مولار	۵
محلول گایاکول ^۱	۲۰۰ میلی مولار	۵
عصاره آنزیم	-	۱۰۰
حجم کل	-	۳۱۱۰

فعالیت ویژه آنزیم گایاکول پراکسیداز (ΔOD) به صورت تعداد میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد.

$$\text{Activity (U/ml)} = \frac{\Delta A_{240} \times 1 \times V_t \times d_f}{\epsilon \times l \times t \times V_s}$$

در این فرمول U: واحد آنزیمی، ΔA_{470} : تفاوت میزان جذب مخلوط واکنش در زمان شروع و پایان واکنش
1: با توجه به ضریب پراکسید هیدروژن (معادل ۲) تعیین می گردد.

V_t : حجم مخلوط واکنش (در این آزمایش برابر ۳ میلی لیتر بود)، d_f : فاکتور رقیق کننده (۵۰).

t : مدت زمان واکنش (۳۰۰ ثانیه)، V_s : حجم نمونه (در این آزمایش برابر ۱۰۰ میکرولیتر بود)

ϵ : ضریب خاموشی برابر $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، l : طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (برابر یک است).

۳-۲-۴-۸- سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

فعالیت این آنزیم با استفاده از روش رانیر (Ranieri et al. 2000) اندازه گیری و در طول موج ۲۹۰ نانومتر

قرائت شد. مخلوط واکنش حاوی ۵۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۲۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰

¹ Guaiacol

میلی مولار با pH=7، ۳۵۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار، ۵ میکرولیتر H₂O₂ ۳۰ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. سبش فعالیت آنزیم در طول پنج دقیقه ثبت شد.

۳-۳- بررسی بیان ژن

۳-۳-۱- استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت RNX Plus و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به منظور حذف آلودگی‌های DNA، یک میکروگرم از RNA استخراج شده تحت تیمار DNase قرار گرفت. به منظور حذف آلودگی DNA، محتویات ویال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد و پس از اضافه کردن EDTA، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (جدول ۳-۲). در ضمن کیفیت و کمیت RNA با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین گردید.

جدول ۳-۲- ترکیبات مورد استفاده به منظور حذف DNA ژنومی

مرحله	ماده	حجم (μl)	غلظت
	RNA	۱	μg
۱	Reaction buffer	۱	10X
	DNase	۱	uμl ⁻¹
	Water nuclease-free	۷	-
	Total	۱۰	-
۲	EDTA	۱	50 mM
	Total	۱۱	-

۳-۳-۲- ساخت cDNA

به منظور ساخت cDNA، از آغازگر Oligo (dT) برای اتصال به دم پلی آدنین mRNA استفاده شد. برای ساخت cDNA، از کیت (GeneALL) HyperScript Reverse transcriptase و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. ترکیبات جدول ۳-۳ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد بافر واکنش، آنزیم Reverse transcriptase، MdTT به ترکیب اضافه شد (جدول ۳-۴). سپس بترتیب ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

جدول ۳-۳- ترکیبات مورد استفاده برای ساخت cDNA

ماده	حجم (μ)	غلظت
RNA	۴/۵	$250 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$
Oligo (dT)	۱	$10 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$
DEPC Water	۷/۵	-
Master 1 total volume	۱۳	-

جدول ۳-۴- ترکیبات مورد استفاده برای ساخت cDNA

ماده	حجم (μ)	غلظت
Buffer reaction	۵	10 X
MdTT	۱	0.1
Reverse transcriptase	۱	200 U/ μ l
Master 2 total volume	۲۰	-

۳-۳-۳- طراحی آغازگرها

برای طراحی آغازگرها از برنامه آنلاین Primer 3 Plus و به منظور کنترل صحت آن‌ها از برنامه

Analyzer v.3.1 Oligo (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) استفاده شد (جدول ۳-۵).

جدول ۳-۵- آغازگرهای مورد استفاده و مشخصات آن‌ها

ژن	توالی آغازگر (۵' - ۳')		طول قطعه (bp)	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
	Forward	Reverse		
<i>SSR</i>	GGAGGCATCATACTTCTG T	CATCACTTCCTGGATTGTA	۲۱۰	۶۰
<i>SMT</i>	ACGAACAAGTTCCAGGT C	GGTGACAGGGATAACAAGA G	۲۳۰	۶۰
<i>SEP</i>	GGGGTTATTCAGATGGG TC	CCACCAGCCATTACTACAC	۲۲۰	۶۰
<i>CAS</i>	CGAGGAGATTGGTGCTG GTG	TCGTGTTGGGTGGAGATA AG	۲۳۰	۶۰
<i>SQS</i>	TTATCACCATTGGTGCTG AG	CGATGTTTCCATACAGATC CTT	۱۶۰	۶۰
<i>GAPDH</i>	ATGTAAATGATGCAGC CCTTCCACCTCTC	TATGTTTGTGTTGGTGTC AACGAGCAACGAATA G	۲۳۰	۶۱

۳-۳-۴- انجام واکنش PCR زمان واقعی

برای واکنش PCR زمان واقعی، از مستر SYBR®Green PCR Master Mix 2X (Ampliqon) استفاده

شد. واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر و با دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکی انجام شدند. در این بخش به

منظور اطمینان از عدم آلودگی اجزا از کنترل منفی نیز استفاده شد. واکنش PCR زمان واقعی، با استفاده از

دستگاه ABI Step one و مطابق با ترکیبات جدول ۳-۶ انجام شد.

جدول ۳-۶- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی

غلظت	حجم (μl)	ماده
-	۳	Nuclease Free Water
50 ngμl ⁻¹	۱	cDNA
10 pmolμl ⁻¹	۰/۵	Forward Primer
10 pmolμl ⁻¹	۰/۵	Reverse Primer
2X	۵	SYBR®Green PCR Master Mix
-	۱۰	Total

این واکنش با شرایط دمایی و زمانی ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

۳-۳-۵- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها

از تجزیه منحنی‌های ذوب^۱ به منظور ارزیابی اختصاصیت آغازگرها استفاده می‌شود، در حقیقت از مزایای PCR زمان واقعی توانایی ترسیم منحنی ذوب است. دمای ذوب مولکول DNA یک عامل مهم جهت ارزیابی اختصاصیت تکثیر آغازگرها است. منحنی ذوب پس از اتمام فرآیند PCR توسط نرم‌افزار رسم می‌گردد و به عوامل متعددی از جمله درصد بازهای C/G و اختصاصیت تکثیر بستگی دارد. برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص (هر ۵ ثانیه) به مقدار معین (مثلاً ۰/۵ درجه) کاهش می‌دهد و همزمان منحنی تغییرات فلورسنت بر حسب دما را که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌گردد. این منحنی در صورت دارای بودن تنها یک پیک مشخص و بالا بودن دمای جدا شدن دو رشته (دمای ۷۵ درجه به بالا قابل قبول است)، اختصاصی بوده و قابل قبول است.

¹ Melt curve analysis

۳-۴- تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی

به منظور تجزیه داده‌های PCR زمان واقعی، بیان نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی^۱ بر پایه فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen., 2001) محاسبه شد، که مطابق آن میزان ژن (cDNA حاصل از رونوشت) برابر با دو به توان منفی تفاوت آستانه سیکل ژن هدف تحت تنش و ژن مرجع متناظر آن (*GAPDH*) منهای تفاوت میانگین‌های آستانه سیکل ژن هدف بدون تنش و ژن مرجع متناظر آن است. آنالیز داده‌های بخش فیزیولوژیک با استفاده از برنامه R و نمودارهای با استفاده از برنامه اکسل ۲۰۱۳ رسم گردیدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن و در سطح احتمال مورد نظر انجام شد.

¹ Relative standard curve method

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴- نتایج

۴-۱- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک

نتایج تجزیه واریانس اثرات تنش سرما و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر صفات فیزیولوژیک شنبلیله در جدول شماره ۴-۱ ارائه شده است. نتایج این جدول نشان می‌دهد که اثر دما در سطح یک درصد بر همه صفات به جز محتوای کلروفیل و کارتنوئید معنی‌دار بوده است. در ضمن اثر زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نیز فقط برای فعالیت گایاکول پراکسیداز معنی‌دار نبود. همه صفات اندازه‌گیری تحت تاثیر سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم قرار گرفتند، بدین معنی که سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم در سطح یک درصد همه صفات فیزیولوژیک را تحت تاثیر قرار داد. دو صفت محتوای مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت کاتالاز تحت تاثیر اثرات دو گانه دما و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری قرار نگرفتند. نتایج جدول شماره ۴-۱ نشان می‌دهد که صرفاً فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت معنی‌داری در سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و دما تغییر نکرد، در حالی که اثر سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و دما بر سایر صفات معنی‌داری بود. همچنین صفات محتوای کارتنوئید، فعالیت آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و محتوای پروتئین کل به صورت معنی‌داری تحت تاثیر سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان نمونه‌برداری قرار گرفتند. در ضمن اکثر صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده (بجز محتوای کارتنوئید و فعالیت کاتالاز) به صورت معنی‌داری تحت تاثیر اثرات سه گانه سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم، زمان‌های نمونه‌برداری و دما قرار گرفتند.

جدول ۴-۱- نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک در شنبلیله تحت تاثیر تنش سرما و کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان‌های مختلف

نمونه‌برداری

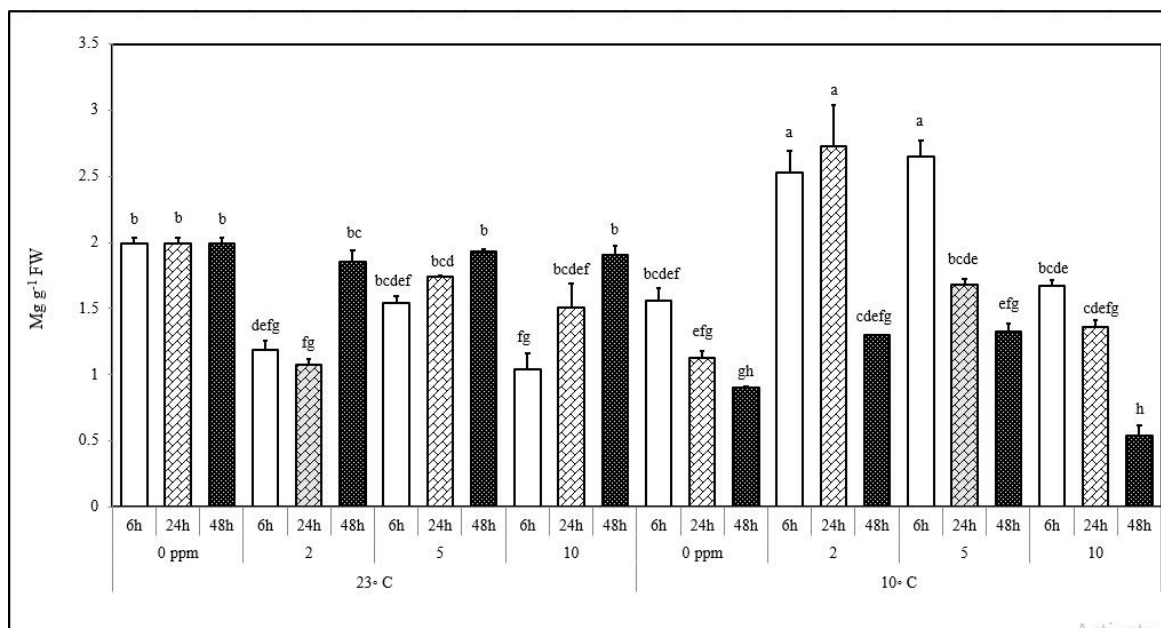
منابع تغییرات	درجه آزادی	a کلروفیل	b کلروفیل	کلروفیل کل	کارتنوئید	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	نشت الکترولیت	گایاکول پراکسیداز	مالون دی-آلدئید	پروتئین کل
میانگین مربعات											
دما	۱	۰/۰۳۸ ^{ns}	۰/۰۴۶ ^{ns}	۰/۰۵۳ ^{ns}	۰/۰۱۱ ^{ns}	۴/۵۳۴**	۵۶۸/۴**	۱۵۰/۴**	۱۳۴۴/۲**	۱۶/۵**	۳۸۱۶**
زمان	۲	۰/۰۶۴۹**	۳/۴۵۳**	۶/۵۰**	۲/۰۸۱**	۹۰/۲**	۶۰/۵**	۱۰۲/۱**	۱۷/۷ ^{ns}	۱۸/۷۰**	۳۳۳۱**
غلظت	۳	۰/۰۷۸۶**	۳/۰۶۹**	۷/۱۱**	۱/۴۹۷**	۱۳۷/۱**	۲۶۲/۱**	۸۶**	۱۶۱/۴**	۱۸/۶۷**	۲۲۳۴**
دما در زمان	۲	۴/۰۳۴**	۲/۱۸۴**	۱۲/۸۸**	۲/۰۳۵**	۴۲/۵**	۹/۶ ^{ns}	۹۷/۱**	۹۸/۴*	۱/۹۹ ^{ns}	۲۲۲۷**
دما در غلظت	۳	۲/۰۶۶**	۳/۱۱۷**	۹/۷۱**	۴/۵۴۵**	۱۶۸/۲**	۱۱/۸ ^{ns}	۷۲۸**	۲۷۷/۱**	۶۶/۲۷**	۹۰۶**
غلظت در زمان	۶	۰/۰۸۶ ^{ns}	۰/۱۱۹ ^{ns}	۲/۱**	۰/۰۶۴۵**	۵۰/۹**	۱۴/۸ ^{ns}	۱۷/۲ ^{ns}	۳۳۹/۳**	۰/۹۸ ^{ns}	۸۳۶**
دما در غلظت در زمان	۶	۴/۵۰۳**	۰/۳۸۵*	۲/۰۸۱**	۰/۱۸۵ ^{ns}	۴/۳۵**	۴/۵ ^{ns}	۲۲/۲*	۵۱/۴*	۱۳**	۱۳۵۰**
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۷	۱۹	۱۴	۱۶	۹/۶۵	۱۱	۲۸	۲۳	۱۰	۶

*, **, و ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و یک درصد و عدم معنی‌داری است

۴-۲- محتوای کلروفیل a

محتوای کلروفیل a تحت تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت کاهش یافت، اگرچه این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ضمیمه ۱). با افزایش زمان نمونه بردای از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت محتوای کلروفیل a به صورت معنی داری کاهش یافت (جدول ضمیمه ۲). در ضمن کاربر سطوح ۲ و ۵ ppm دی اکسید تیتانیوم به صورت معنی داری منجر به افزایش محتوای کلروفیل a (نسبت به عدم کاربرد دی اکسید تیتانیوم) شد (جدول ضمیمه ۳).

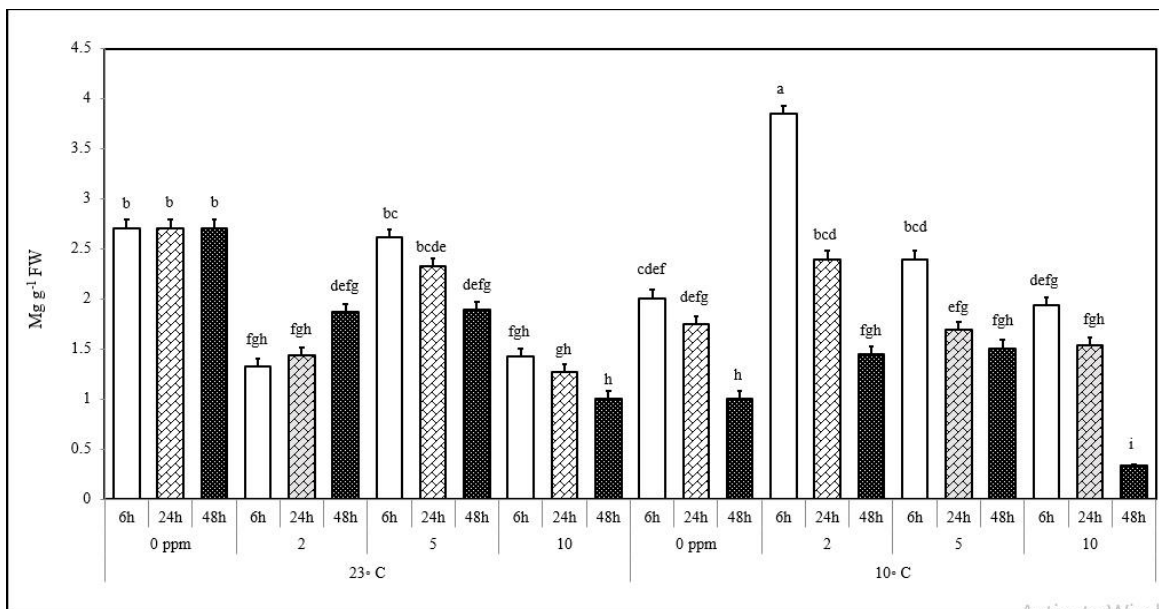
کاهش محتوای کلروفیل a، ۶ ساعت پس از شروع تنش سرما و بدون کاربرد دی اکسید تیتانیوم نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی اکسید تیتانیوم) معنی دار نبود، در حالی که محتوای کلروفیل a در همین تیمار دمایی (سرما) و بدون کاربرد دی اکسید تیتانیوم نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی-اکسید تیتانیوم) در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش به صورت معنی داری کاهش یافت. بالاترین محتوای کلروفیل a در ۶ و ۲۴ ساعت پس از شروع تنش سرما و غلظت ۲ ppm دی اکسید تیتانیوم و ۶ ساعت پس از شروع تنش سرما و غلظت ۵ ppm دی اکسید تیتانیوم بدست آمد (شکل ۴-۱).



شکل ۴-۱- نتایج مقایسه میانگین سه گانه اثرات دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسیدتیتانیوم بر محتوای کلروفیل a (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند).

۴-۳- محتوای کلروفیل b

اثرات اصلی دما، سطوح مختلف دی اکسیدتیتانیوم و زمان‌های مختلف نمونه برداری دقیقاً مشابه با کلروفیل a بود. محتوای کلروفیل b تحت تاثیر سطوح مختلف درجه حرارت کاهش یافت، اگرچه این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود (جدول ضمیمه ۱). با افزایش زمان نمونه برداری از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت محتوای کلروفیل b به صورت معنی داری کاهش یافت (جدول ضمیمه ۲). در ضمن کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm دی اکسیدتیتانیوم به صورت معنی داری منجر به افزایش محتوای کلروفیل b (نسبت به عدم کاربرد دی اکسید تیتانیوم) شد (جدول ضمیمه ۳).

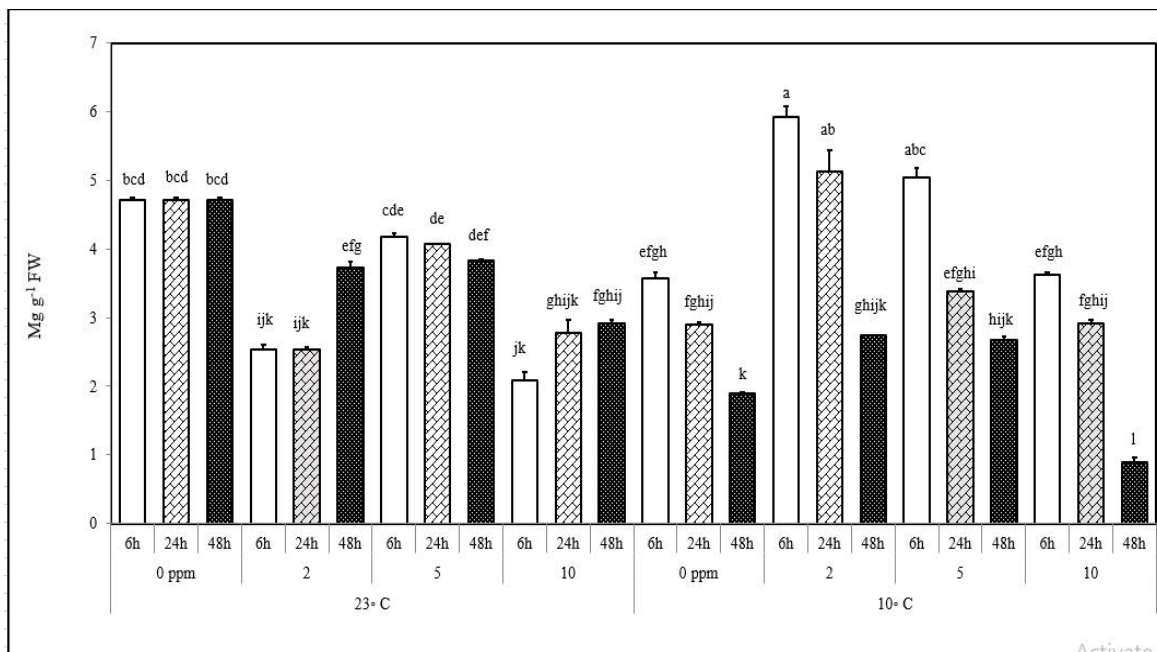


شکل ۴-۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای کلروفیل b (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

محتوای کلروفیل b به صورت معنی‌داری ۴۸ ساعت پس از تنش سرما و تحت تیمار ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم بصورت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کاهش یافت. این نتیجه حاکی از آن است که با افزایش مدت زمان تنش سرما و افزایش غلظت دی‌اکسیدتیتانیوم محتوای کلروفیل کاهش می‌یابد (شکل ۴-۲). بالاترین محتوای کلروفیل b در تیمار ۶ ساعت پس از شروع سرما و سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم ثبت شد (شکل ۴-۲). در کل می‌توان بیان کرد که انتخاب غلظت مناسب دی‌اکسیدتیتانیوم در ساعت اولیه بروز تنش سرما یک نقش محافظتی برای گیاه دارد و سبب ارتقا فتوسنتز می‌شود.

۴-۴- محتوای کلروفیل کل

با توجه به اینکه کلروفیل کل شامل مجموع کلروفیل a و b می‌باشد، لذا، محتوای آن نیز در تیمارهای اثرات اصلی دما، سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری دقیقاً مشابه با کلروفیل a و b بود. در حقیقت کاهش محتوای کلروفیل تحت تاثیر تنش سرما معنی‌دار نبود (جدول ضمیمه ۱). همچنین افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ به ۴۸ ساعت منجر به کاهش معنی‌دار کلروفیل کل گردید (جدول ضمیمه ۲). در ضمن کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم (سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم) دارای اثرات معنی‌داری بر محتوای کلروفیل کل بود (جدول ضمیمه ۳).



شکل ۴-۳- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای کلروفیل کل (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

نتایج شکل ۳-۴ نشان می‌دهد که تنش سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) به صورت معنی‌داری منجر به کاهش محتوای کلروفیل کل نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) گردید. در حالی‌که، کاربرد غلظت ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم بویژه در زمان‌های نمونه‌برداری ۶ و ۲۴ ساعت پس از شروع تنش سرما و غلظت ۵ ppm در زمان نمونه‌برداری ۶ ساعت پس از شروع تنش سرما به صورت معنی‌داری منجر به افزایش محتوای کلروفیل کل نسبت به تیمار تنش سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) گردید. کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم تحت تنش سرما و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش در مقایسه با همین تیمار دمایی (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) موثر نبود (شکل ۳-۴).

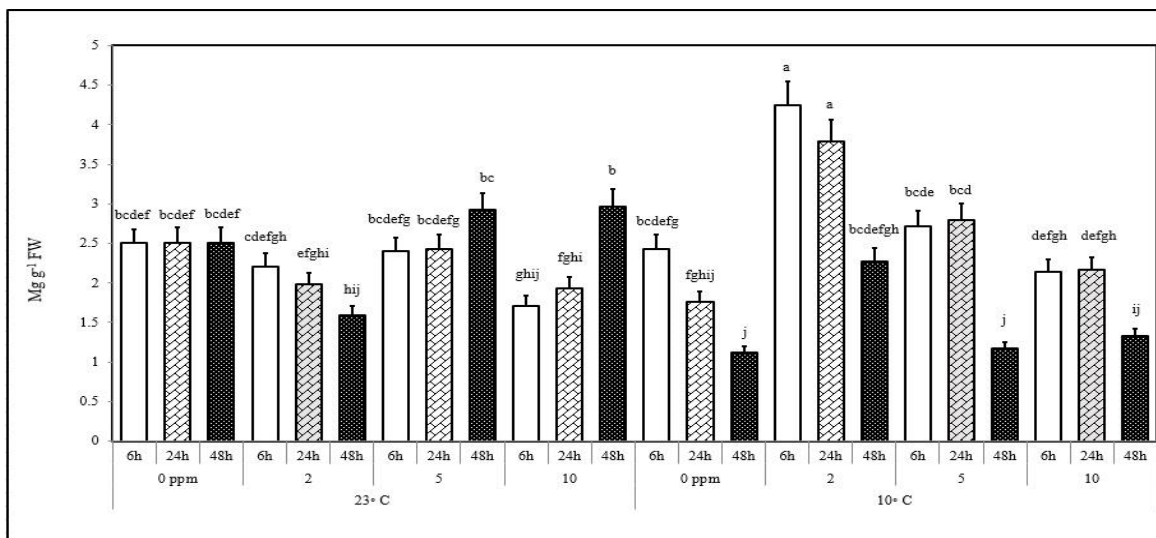
۴-۵- محتوای کارتنوئید

تنش سرما دارای اثر معنی‌داری بر کاهش محتوای کارتنوئید نبود (جدول ضمیمه ۱). افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت اگرچه منجر به کاهش محتوای کارتنوئید گردید، اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. محتوای کارتنوئید با افزایش زمان نمونه‌برداری از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت به صورت معنی‌داری کاهش یافت (جدول ضمیمه ۲). اثرات سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای کارتنوئید معنی‌دار بود، طوری‌که بالاترین محتوای (۲/۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) آن با کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم مشاهده شد (جدول ضمیمه ۳).

اثرات دوگانه دما در سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم، دما در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر روی محتوای کارتنوئید از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ضمیمه ۴، ۵ و ۶). بالاترین محتوای کارتنوئید (۳/۴۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) در تنش سرما و سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم ثبت شد. در ضمن در زمان نمونه‌برداری ۶

ساعت و کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم محتوای کارتنوئید به بالاترین مقدار (۳/۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) خود رسید. همچنین تیمار تنش سرما در مدت زمان ۶ ساعت نیز بالاترین محتوای کارتنوئید (۲/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) را به خود اختصاص داد (جداول ضمیمه ۴، ۵ و ۶).

اگرچه اثرات سه گانه دما، سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری معنی‌دار نبود، اما با توجه به اهمیت آن در روند تغییرات محتوای کارتنوئید در شکل ۴-۴ ارائه شده است. محتوای کارتنوئید ۴۸ ساعت پس از شروع تنش سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) به صورت معنی‌داری نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) کاهش یافت. محتوای کارتنوئید تحت تنش سرما (۶ و ۲۴ ساعت) و با کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم نه تنها کاهش نیافت، بلکه به صورت کاملاً معنی‌داری نسبت به همه تیمارها افزایش یافت. محتوای کارتنوئید تحت تنش سرما و با کاربرد سطوح ۵ و ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم کاهش یافت و در کل تداوم تنش سرما حتی با وجود کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم سبب کاهش محتوای کارتنوئید شد (شکل ۴-۴).

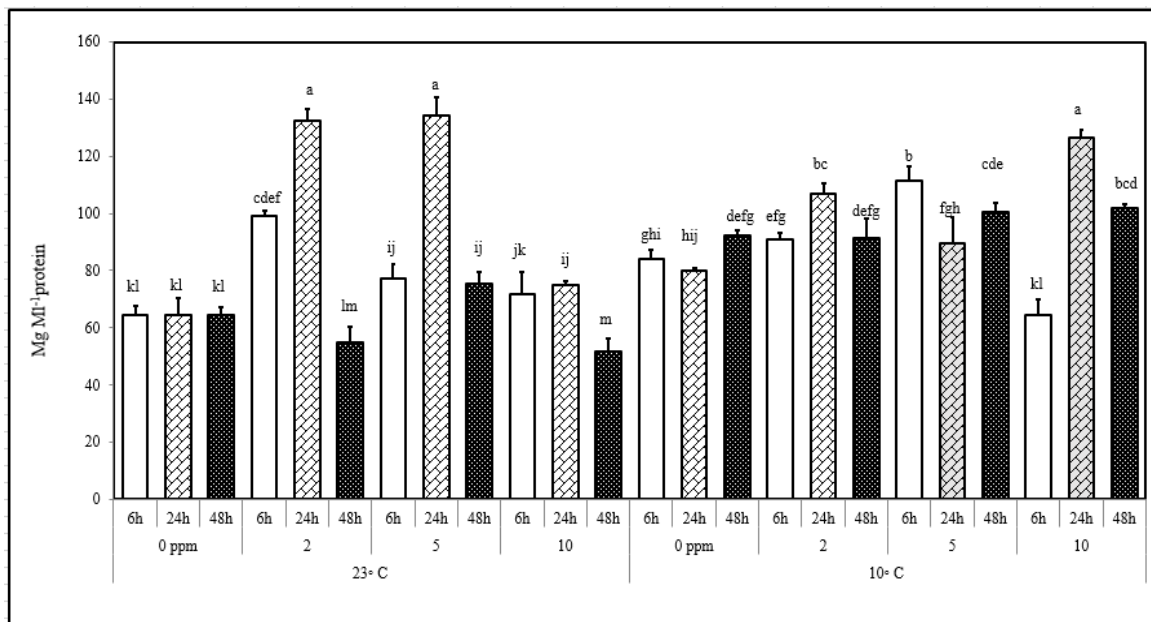


شکل ۴-۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای کارتنوئید (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

۴-۶- پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با کاهش دما از ۲۳ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۱). افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین کل شد، در حالی که محتوی پروتئین کل در زمان نمونه‌برداری ۴۸ ساعات نسبت به ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری کاهش یافت (جدول ضمیمه ۲). کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش معنی‌داری محتوای پروتئین کل گردید. محتوای پروتئین کل با کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم به ترتیب برابر با ۹۵/۹ و ۹۸/۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید (جدول ضمیمه ۳).

محتوای پروتئین کل تحت تاثیر تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) به صورت معنی‌داری افزایش یافت. کاربرد تمامی سطوح دی‌اکسیدتیتانیوم در همه زمان‌های نمونه‌برداری (به جز تنش سرمای ۶ ساعت و سطح ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم) منجر به افزایش محتوای پروتئین کل نسبت به شرایط نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) شد. بالاترین محتوای پروتئین کل در تیمار سرما و با کاربرد سطح ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم (در زمان نمونه‌برداری ۲۴ ساعت) و همچنین تحت شرایط دمای نرمال در سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم (در زمان نمونه‌برداری ۲۴ ساعت) ثبت شد (شکل ۴-۵).

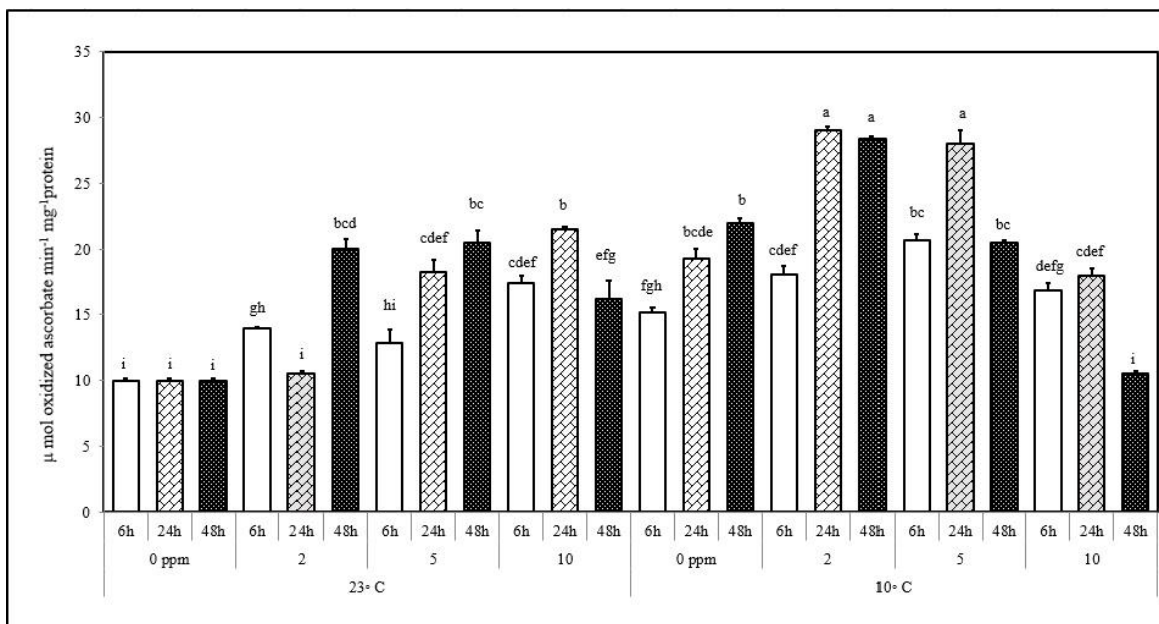


شکل ۴-۵- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای پروتئین کل (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

۴-۷- آسکوروبات پراکسیداز

فعالیت آسکوروبات پراکسیداز با کاهش دما از ۲۳ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۱). با افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت، فعالیت آسکوروبات پراکسیداز به صورت معنی‌داری افزایش یافت، این در حالی است که فعالیت این آنزیم در ۴۸ ساعت بعد از تنش نسبت به ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری تغییر نکرد (جدول ضمیمه ۲). کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت آسکوروبات پراکسیداز گردید. بالاترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب در سطوح ۵ و ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم مشاهده شد (جدول ضمیمه ۳).

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش اثرات تنش دمایی، کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم و مدت زمان نمونه‌برداری در شکل ۴-۶ ارائه شده است. با توجه به شکل ۴-۶، فعالیت آسکوروبات پراکسیداز بعنوان یک آنتی‌اکسیدان تحت تاثیر تنش سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) و در همه زمان‌های نمونه‌برداری به صورت معنی‌داری نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) افزایش یافت. در ضمن، کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم تحت شرایط تنش سرما منجر به افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار دمای نرمال (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم گردید. فعالیت آسکوروبات پراکسیداز، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش سرما با کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم و ۲۴ ساعت پس از شروع تنش سرما در سطح ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به سایر تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافت و بالاترین مقادیر را به خود اختصاص دادند.



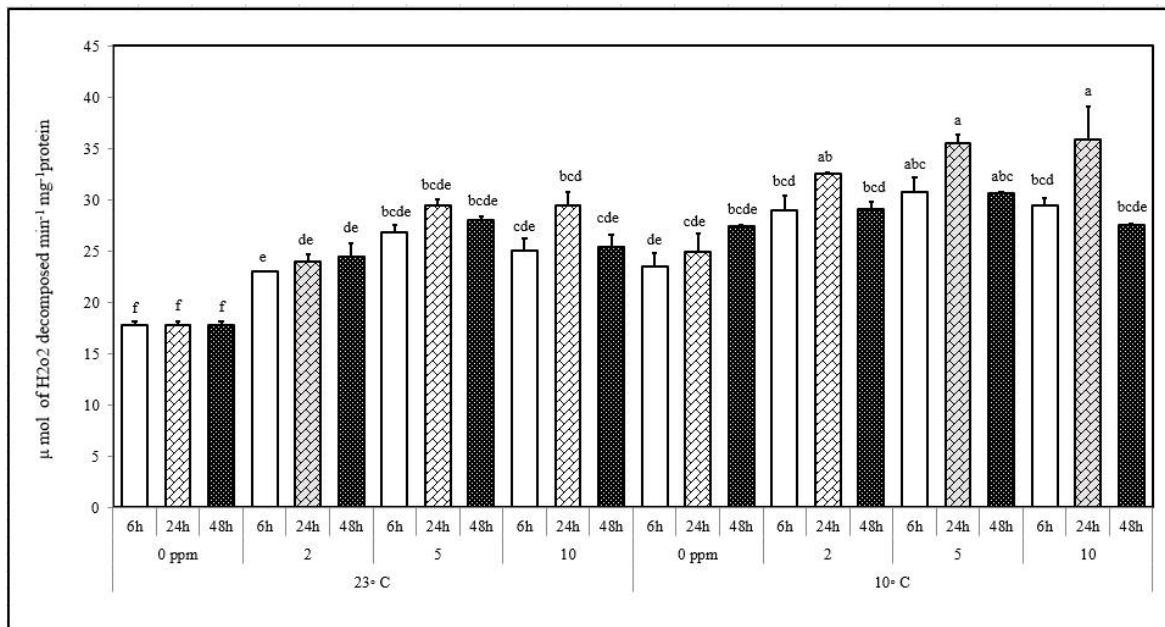
شکل ۴-۶- نتایج مقایسه میانگین سه گانه اثرات دما، زمان و سطوح مختلف دی اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال ۱ درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری با یکدیگر نیستند).

۴-۸- کاتالاز

فعالیت کاتالاز با کاهش دما از ۲۳ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۱). با افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت، فعالیت کاتالاز به صورت معنی‌داری افزایش یافت، این در حالی است که فعالیت این آنزیم در ۴۸ ساعت بعد از تنش نسبت به ۶ ساعت بعد از تنش به صورت معنی‌داری تغییر نکرد (جدول ضمیمه ۲). کاربرد سطوح مختلف دی اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت آسکوربات پراکسیداز گردید. بالاترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب در سطوح ۵ و ۱۰ ppm دی اکسیدتیتانیوم مشاهده شد (جدول ضمیمه ۳).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با کاهش دما (بدون کاربرد دی اکسیدتیتانیوم) میزان فعالیت کاتالاز نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی اکسیدتیتانیوم) افزایش می‌یابد. اعمال تمامی سطوح

دی‌اکسیدتیتانیوم در تنش سرما و در تمامی زمان‌های برداشت منجر به افزایش معنی‌داری فعالیت این آنزیم نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) شد. در کل فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم حتی در دمای نرمال نسبت به عدم کاربرد آن (در دمای نرمال) افزایش یافت، که این افزایش حاکی از آن است که تیمار دی‌اکسیدتیتانیوم تا حدودی سبب ایجاد تنش در گیاه می‌شود (شکل ۴-۷).

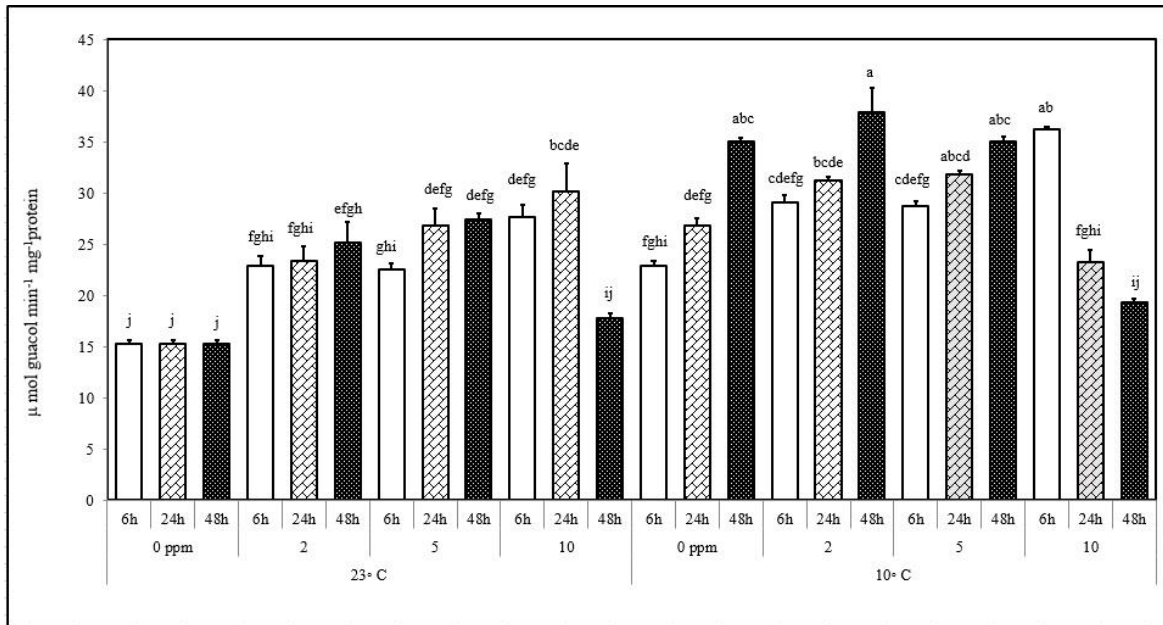


شکل ۴-۷- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم کاتالاز (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

۴-۹- گایاکول پراکسیداز

فعالیت گایاکول پراکسیداز با کاهش دما از ۲۳ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۱). افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت اثر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نداشت (جدول ضمیمه ۲). اگر چه کاربرد سطوح مختلف دی-

اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم شد، اما میزان فعالیت این آنزیم در سطوح ۲، ۵ و ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نبود (جدول ضمیمه ۳).



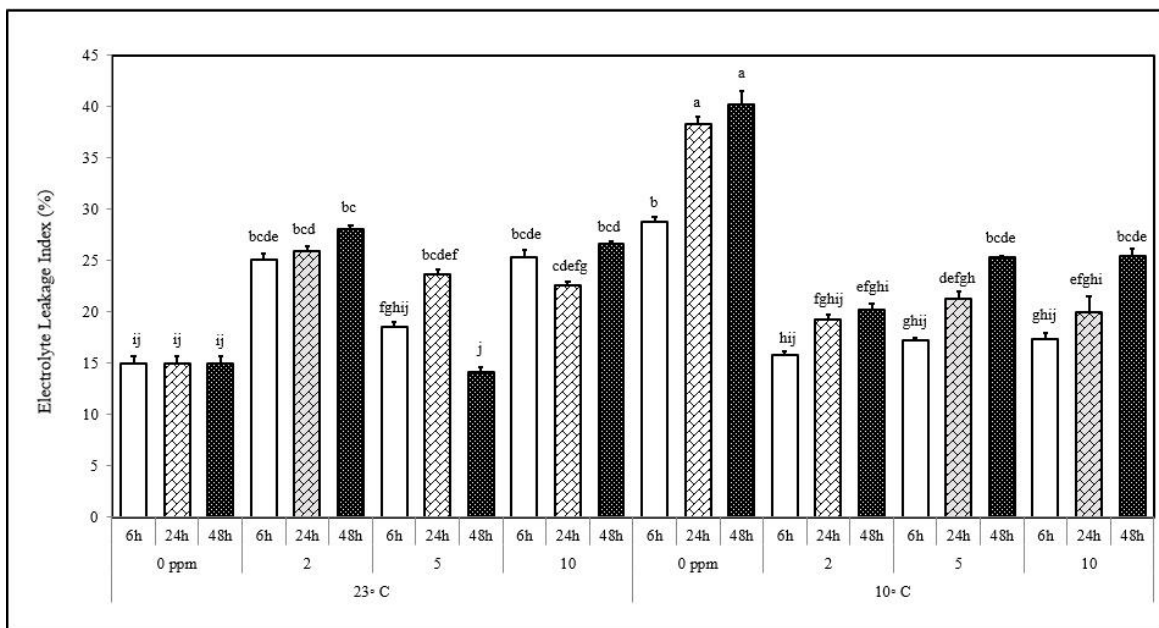
شکل ۴-۸- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با شروع تنش سرما (عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) و تداوم تنش به صورت معنی‌داری نسبت به دمای نرمال (عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) افزایش یافت. کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم (همه سطوح) در تنش سرما و در تمامی زمان‌های برداشت (۶، ۲۴ و ۲۸) منجر به افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به دمای نرمال (عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) شد (شکل ۴-۸).

۴-۱۰- شاخص نشت الکترولیت

شاخص نشت الکترولیت بعنوان یک عامل مرتبط با پایداری سلول مورد بررسی قرار می‌گیرد. درصد شاخص نشت الکترولیت با کاهش دما از ۲۳ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۱). با افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۲۴ ساعت، درصد شاخص نشت الکترولیت به صورت معنی‌داری افزایش یافت، این در حالی است که این میزان در ۴۸ ساعت بعد از تنش نسبت به ۲۴ ساعت به صورت معنی‌داری تغییر نکرد (جدول ضمیمه ۲). کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به کاهش درصد شاخص نشت الکترولیت نسبت به عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم شد. درصد شاخص نشت الکترولیت در سطوح ۵ و ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم کمترین میزان را (به ترتیب ۲۲/۳۷ و ۲۲/۰۲ درصد) به خود اختصاص داد (جدول ضمیمه ۳).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که شاخص نشت الکترولیت با شروع تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به دمای نرمال (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) به صورت کاملاً معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۹). بالاترین میزان درصد نشت الکترولیت با اعمال تنش سرما و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌های ۲۴ و ۲۸ ساعت پس از تنش سرما مشاهده شد. کاربرد همه سطوح دی‌اکسیدتیتانیوم تحت شرایط تنش سرما و در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری (۶، ۲۴ و ۴۸) به صورت موثری منجر به کاهش درصد شاخص نشت الکترولیت نسبت به تیمار سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) شدند (شکل ۴-۹).



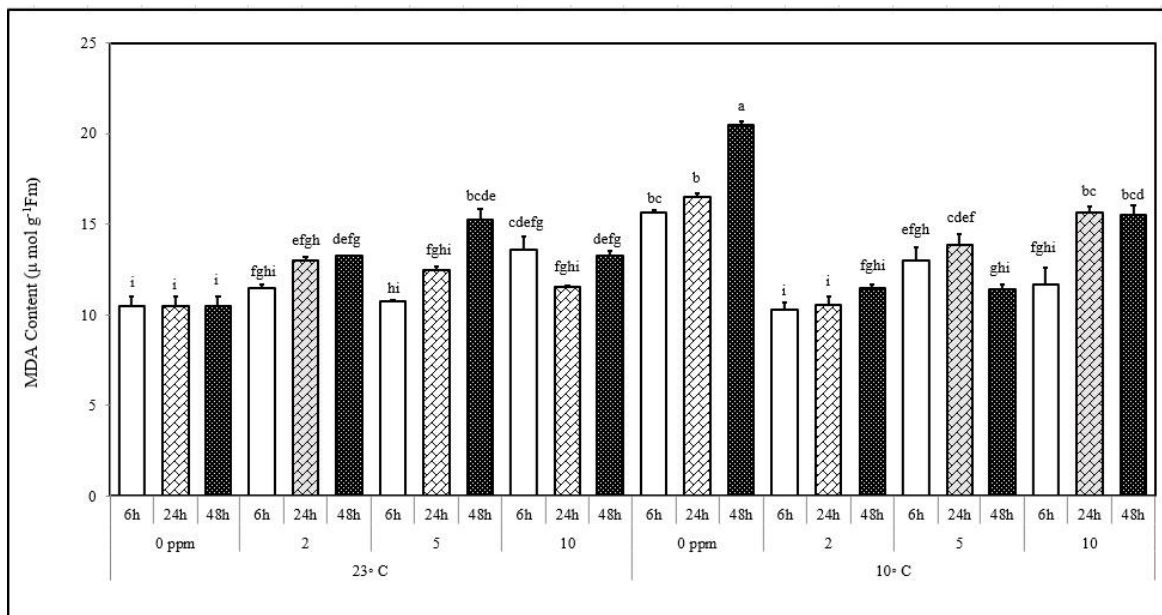
شکل ۴-۹- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر درصد نشت الکترولیت (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

۴-۱۱- محتوای مالون دی‌آلدئید

محتوای مالون دی‌آلدئید با کاهش دما از ۲۳ درجه سانتی‌گراد به ۱۰ درجه سانتی‌گراد به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۱). با افزایش زمان نمونه‌برداری از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت، محتوای مالون دی‌آلدئید به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ضمیمه ۲). کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید نسبت به عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم شد. کمترین محتوای مالون دی‌آلدئید در سطوح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم مشاهده شد (جدول ضمیمه ۳).

مشابه با روند تغییرات درصد نشت الکترولیت، محتوای مالون دی‌آلدئید تحت تاثیر تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به تیمار نرمال (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و عدم کاربرد دی

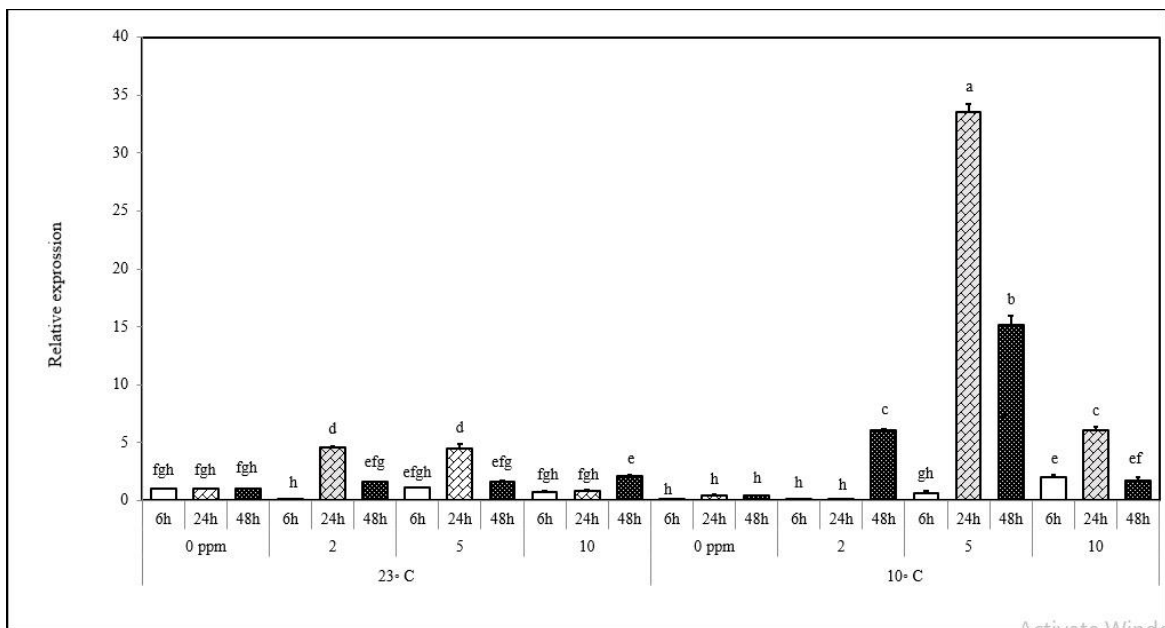
اکسیدتیتانیوم) به صورت معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین محتوای مالون دی‌آلدئید در تیمار تنش سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم و ۴۸ ساعت پس از تنش سرما) مشاهده شد. کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم (تمامی سطوح) تحت تاثیر تنش سرما و در همه زمان‌های نمونه‌برداری منجر به کاهش معنی‌داری محتوای مالون دی‌آلدئید نسبت به تیمار سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) شد. در کل تداوم تنش سرما (۴۸ ساعت) و استفاده از غلظت‌های بالاتر از دی‌اکسیدتیتانیوم (۱۰ ppm) باعث افزایش آسیب به دیواره سلولی و افزایش محتوای مالون دی‌آلدئید در سلول شد (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای مالون دی‌آلدئید (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

۴-۱۲- بیان ژن *SQS*^۱

بیان ژن *SQS* به صورت معنی‌داری در شرایط نرمال دمایی تحت تاثیر کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم قرار گرفت. بطوری‌که بیان این ژن تحت شرایط نرمال دمایی و پس از کاربرد سطوح ۲، ۵ و ۱۰ ppm دی‌اکسید تیتانیوم (۲۴ ساعت) به ترتیب ۴/۶، ۴/۵ و ۲/۱۵ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم افزایش یافت. بیان این ژن تحت تاثیر تنش سرما و عدم کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم نسبت به تیمار دمای نرمال و عدم کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم تغییر معنی‌داری نداشت. بیان ژن *SQS* که ۲۴ ساعت پس از شروع تنش سرما در سطح ۵ ppm دی-اکسید تیتانیوم ۳۳ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم افزایش یافت (شکل ۴-۱).

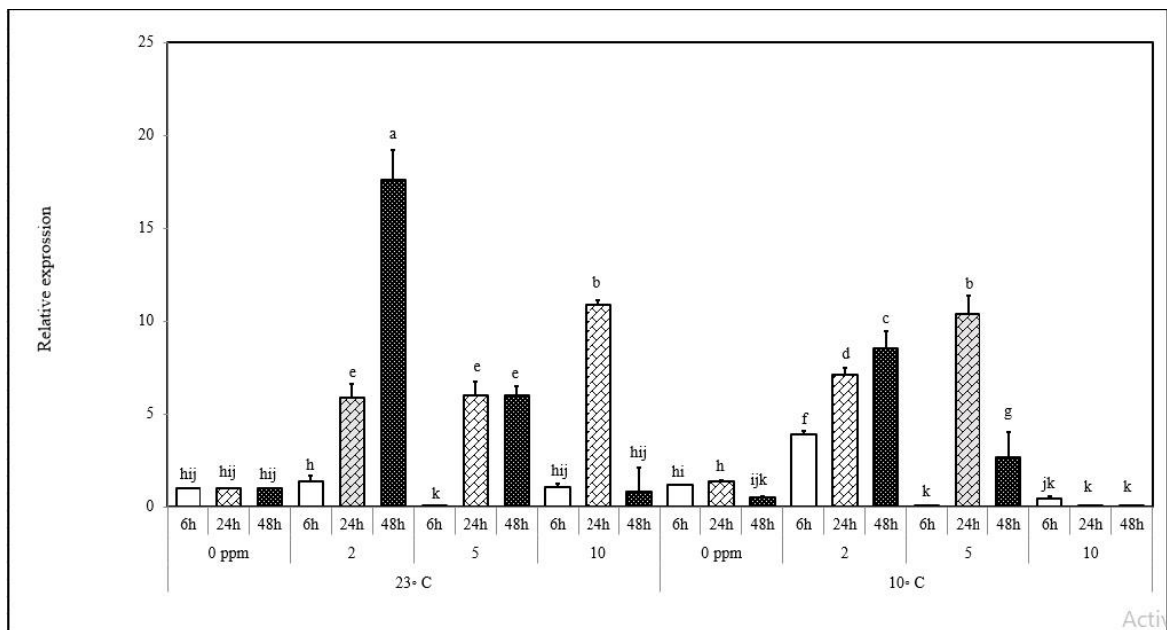


شکل ۴-۱۱- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسید تیتانیوم بر بیان نسبی ژن *SQS* (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

¹ Squalene synthase

۴-۱۳- بیان ژن *SEP*^۱

نتایج این تحقیق نشان داد الگوی بیان ژن *SEP* به صورت معنی‌داری تحت تاثیر اثرات متقابل غلظت‌های دی‌اکسیدتیتانیوم و دما قرار می‌گیرد. کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم در شرایط نرمال دمایی و ۴۸ ساعت پس از نمونه‌برداری منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به تیمار دمایی نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم گردید (۱۸ برابر). در ضمن در شرایط نرمال دمایی، بیان این ژن با کاربرد سطوح ۵ و ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم (۲۴ ساعت) نسبت به شرایط نرمال (عدم کاربرد دی-اکسیدتیتانیوم) به ترتیب ۶ و ۱۱ برابر افزایش یافت (شکل ۴-۱۲). کاربرد سطح ۲ ppm دی-اکسیدتیتانیوم به ترتیب در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع تنش سرما منجر به افزایش ۴، ۷ و ۸ برابری بیان این ژن نسبت به شرایط نرمال دمایی (عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) شد (شکل ۴-۱۲).

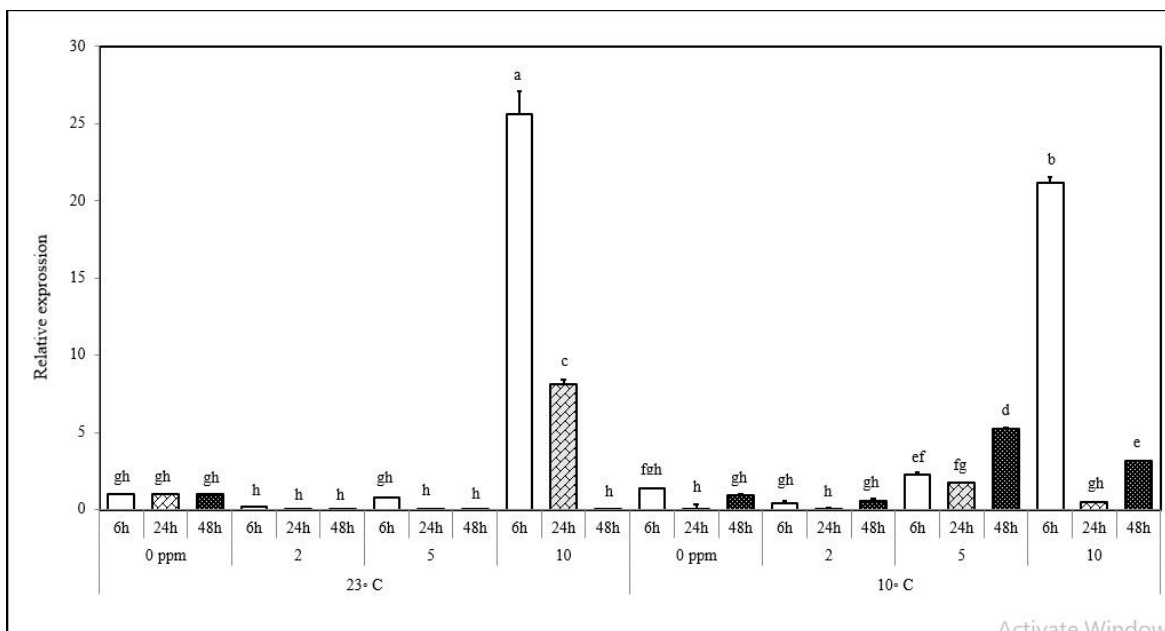


شکل ۴-۱۲- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر بیان ژن *SEP* (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

¹ Squalene epoxidase

۴-۱۴- بیان ژن CAS

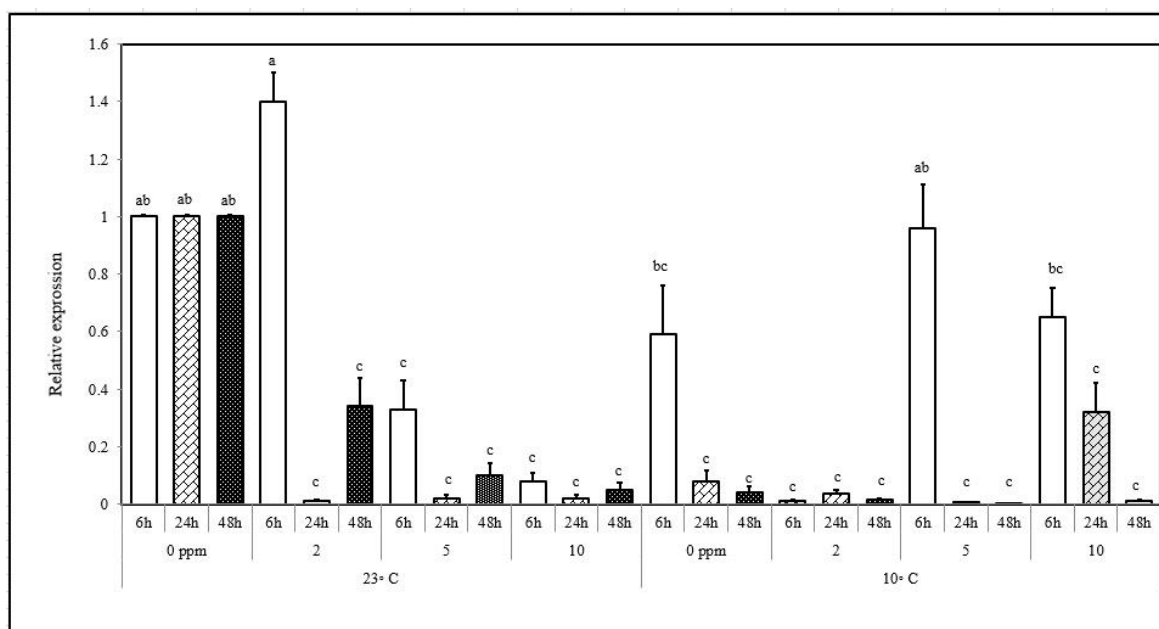
بیان ژن CAS تحت تاثیر دمای نرمال و با کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم کاهش یافت، در حالی که با کاربرد سطح ۱۰ ppm، بیان این ژن به ترتیب در زمان‌های برداشت ۶ و ۲۴ ساعت به میزان ۲۶ و ۸ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش یافت. بیان ژن CAS در شروع تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم تغییر محسوسی نداشت. در شرایط تنش سرما (۶ ساعت پس از تنش) و با کاربرد سطح ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم، بیان ژن CAS تقریباً ۲۱ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش نشان داد (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۳- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر بیان ژن CAS (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند).

۴-۱۵- بیان ژن *SMT*

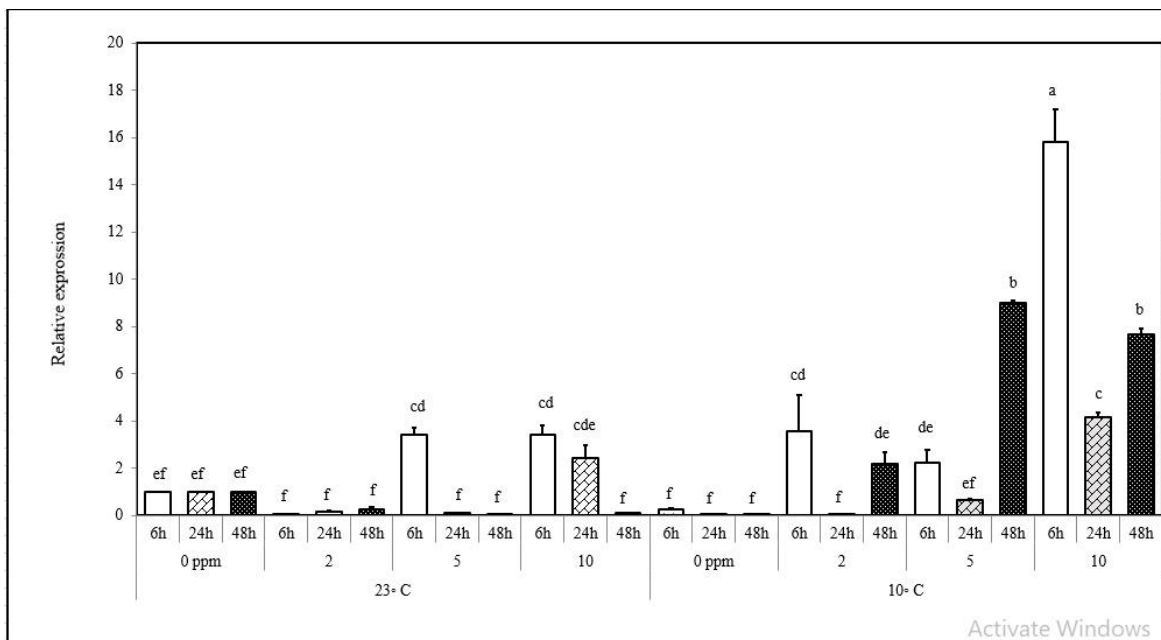
نتایج الگوی بیان ژن *SMT* نشان داد که بیان این ژن در بیشتر تیمارهای آزمایشی نسبت به شرایط دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم کاهش می‌یابد. بیان ژن *SMT* در شرایط دمای نرمال با کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم ۱/۴ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسید تیتانیوم افزایش یافت و به بالاترین مقدار خود رسید. همچنین بیان این ژن در شرایط تنش سرما و کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم (در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری) نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم کاهش یافت (شکل ۴-۱۴). نتایج حاکی از آن است که تنش سرما و کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم به‌عنوان یک عامل تاثیرگذار منفی سبب کاهش بیان ژن *SMT* در شبلیله می‌شوند.



شکل ۴-۱۴- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر بیان ژن *SMT* (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

۴-۱۶- بیان ژن SSR^۱

بیان این ژن در تیمار تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم تغییر معنی‌داری نداشت. در شرایط نرمال (دمای نرمال)، کاربرد سطوح ۵ و ۱۰ ppm (بعد از گذشت ۶ ساعت) منجر به افزایش بیان این ژن نسبت به عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم (شرایط نرمال دمایی) شد (شکل ۴-۱۵). بیان ژن SSR در سطح ۵ ppm (۴۸ ساعت پس از تنش سرما) و ۱۰ ppm (۶ ساعت پس از تنش سرما) دی‌اکسیدتیتانیوم به ترتیب ۹ و ۱۶ برابر نسبت به دمای نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش یافت. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، پروفایل بیان این ژن به صورت معنی‌داری تحت تاثیر اثرات متقابل دما، سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری به صورت معنی‌داری تغییر کرده است (شکل ۴-۱۵).



شکل ۴-۱۵- نتایج مقایسه میانگین اثرات سه گانه دما، زمان و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم بر بیان ژن SSR (مقایسه میانگین با روش دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شده است). ستون‌ها با حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نیستند.

¹ Sterol side chain reductase

۴-۱۷-۱- محتوای کلروفیل و کارتنوئید

تداوم فتوسنتز برگ تحت شرایط تنش یکی از شاخص‌های فیزیولوژیکی مقاومت به تنش محسوب می‌گردد. کلروفیل‌ها، مولکول‌های حیاتی دریافت‌کننده انرژی خورشید هستند، که در نهایت و طی فرآیند فتوسنتز آن را به ماده خشک تبدیل می‌کنند. در حقیقت رنگدانه‌های فتوسنتزی، دارای نقش اساسی در متابولیسم گیاهان هستند. ظرفیت فتوسنتزی یک گیاه از طریق سطح برگ و فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها تعیین می‌گردد. محتوای کلروفیل و در نتیجه مقدار فتوسنتز تحت شرایط تنش کاهش می‌یابد (Kalaji et al., 2016; Bresson et al., 2015; Shah et al., 2017).

تنش سرما منجر به کاهش سرعت و توقف فتوسنتز می‌گردد، که این فرآیند احتمالاً با کاهش سطح رونوشت پروتئین و توقف عملکرد LHCHII (کمپلکس تشکیل دهنده اکسیژن) مرتبط است. در این حالت، الکترون‌های زنجیره انتقال الکترون به منظور تشکیل انواع گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه O_2 مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحت تنش سرما، تولیدگونه‌های فعال اکسیژن و تجمع آن‌ها افزایش یافته و منجر به فعال‌سازی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Hajihashemie et al., 2018; Eremina et al., 2016).

در این پژوهش محتوای کلروفیل تحت شرایط تنش سرما کاهش یافت، که ممکن است به علت افزایش محتوای پرولین اتفاق افتاده باشد، چرا که این دو دارای پیش ماده مشترکی (گلوتامات) هستند. از آنجا که محتوای پرولین تحت تنش سرما افزایش می‌یابد، این عامل منجر به کاهش محتوای کلروفیل شده است (Khalid et al., 2010). تنش سرما نه تنها مانع از سنتز کلروفیل شده است، بلکه به نظر می‌رسد که تخریب کلروفیل را نیز به همراه داشته است (شکل‌های ۱-۴، ۲-۴ و ۳-۴). تحت شرایط تنش، کلروپلاست‌ها تحزیه می‌شوند و محتوای کلروفیل کاهش می‌یابد. کاهش محتوای رنگیزه‌ها، چه در

اثر کاهش سرعت سنتز و چه در نتیجه تجزیه سریع تر آن‌ها یکی از علائم آشکار تنش اکسیداتیو القاء شده توسط تنش‌های غیرزیستی می‌باشد (Hajihashemie et al., 2018; Eremina et al., 2016).

محتوای کلروفیل a در گیاهان تیمار شده با ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تحت تنش سرما به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل‌های ۱-۴، ۲-۴ و ۳-۴). کاربرد ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم تحت شرایط تنش سرما، نه تنها از تجزیه و تخریب کلروفیل جلوگیری کرد، بلکه منجر به افزایش محتوای کلروفیل نیز شد. این امر به خصوص در سطح ۲ ppm و زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت و در سطح ۵ ppm و زمان ۶ ساعت مشهودتر بود (شکل ۱-۴).

محتوای کلروفیل b نیز روندی مشابه با کلروفیل a داشت. به‌طوریکه تجزیه آن همزمان با شروع تنش سرما آغاز شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت به پایین‌ترین میزان خود رسید. اعمال تیمار نانوذره دی-اکسیدتیتانیوم به صورت موثری مانع از کاهش محتوای کلروفیل b شد. حداکثر میزان کلروفیل b در سطح ۲ ppm و بازه زمانی ۶ ساعت پس از تنش سرما مشاهده شد. نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان شنبلیله شده است، که این امر به نوبه خود مانع از تخریب کلروفیل یا تحریک بیوسنتز آن گردید (شکل ۲-۴).

محتوای کلروفیل کل نیز تحت شرایط تنش سرما به صورت معنی‌داری کاهش یافت و کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم به خصوص در سطوح ۲ و ۵ ppm منجر به افزایش معنی‌داری در محتوای کلروفیل کل شد. در حقیقت محتوای کلروفیل با به کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm از نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم نه تنها کاهش نیافت، بلکه بیوسنتز آن نیز تحریک شد، در حالی‌که کاربرد سطح ۱۰ ppm فقط به صورت موثری از تخریب کلروفیل جلوگیری کرد و افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار تنش سرما (بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم) در آن مشاهده نشد (شکل ۳-۴).

در یک پژوهش، کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش وزن خشک، سنتز کلروفیل و برخی از ویژگی‌های متابولیسمی جلبک شد، که این تغییرات غالباً با القاء سامانه‌های دفاعی و کاهش قابل توجه در شاخص‌های خسارت همراه بوده است (Singh et al., 2012).

کارتونئیدها، از غشاهای کلروپلاستی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از استرهای زیستی و غیرزیستی محافظت می‌کنند. این مولکول‌های حیاتی قادر هستند تا به صورت مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن را غیرفعال کنند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). در حقیقت، یکی از مهم‌ترین وظایف کارتئونئیدها، جلوگیری از آسیب اکسیداتیو از طریق تعدیل سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل و حفاظت نوری است. با توجه به اینکه تحت شرایط تنش محتوای کارتئونئید کاهش می‌یابد، لذا کارتئونئید قادر به ایفای نقش حفاظتی خود نخواهند بود. در این تحقیق، اعمال تنش سرما منجر به کاهش محتوای کارتئونئید نسبت به دمای نرمال شد (شکل ۴-۴)، اگرچه این کاهش در کوتاه مدت معنی‌دار نبود. اما در بلند مدت (۲۴ و ۴۸) به صورت معنی‌داری کاهش یافت. کاهش در محتوای کارتئونئید احتمالاً به علت اکسیداسیون توسط گونه‌های فعال اکسیژن و تخریب ساختار آن‌ها است (Abdallah et al., 2016; Kalaji et al., 2016).

محتوای کارتئونئید با کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم به بالاترین میزان خود رسید، در حقیقت کاربرد نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم مانع از تخریب کارتئونئید و افزایش تحریک بیوسنتز آن شد. نتایج این تحقیق نشان داد که عکس‌العمل محتوای کلروفیل و کارتئونئید تحت تنش سرما و سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم تقریباً یکسان است، چرا که تحت شرایط تنش محتوای این مولکول‌های حیاتی کاهش یافت و کاربرد سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم مانع از تخریب و افزایش بیوسنتز این ترکیبات شد. در ضمن در سطح ۱۰ ppm و تحت تنش سرما نیز محتوای کلروفیل و کارتئونئید حفظ شد (شکل ۴-۴). دی‌اکسیدتیتانیوم از طریق تحریک و افزایش فعالیت پروتئین‌های دخیل در فتوسنتز، از جمله فروکتوز ۱-۶ بی فسفاتاز (چرخه کلونین) و آنزیم‌های گلوکواپوژناز و تغییر در چرخه پنتوز فسفات

(که در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نقش دارد) و همچنین تحریک بیوسنتز کلروفیل منجر به افزایش فتوسنتز و عملکرد گیاه می‌شوند (Kiss et al., 1985).

گزارش شده است که نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم موجب افزایش سرعت فتوسنتز، افزایش بیوسنتز کلروفیل و افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو می‌شوند. به علاوه، آن‌ها در جلوگیری از پیری کلروپلاست و به صورت یک دریافت‌کننده زیستی در بهبود جذب نور و تبدیل انرژی نوری به انرژی شیمیایی نقش دارند (Gao et al., 2006).

بنظر می‌رسد که جذب موادی مانند نیتروژن و منیزیم و محتوای کلروفیل با کاربرد نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش می‌یابد (Zheng et al., 2007). در گیاه اسفناج کاربرد نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم موجب افزایش رشد از طریق افزایش در میزان کلروفیل و سرعت فتوسنتز، افزایش میزان جذب نور، تسریع انتقال الکترون و افزایش کارایی از طریق تغییر حالت انرژی نوری شد (Hang et al., 2005). هرچند کاربرد نانوذرات در گیاه گندم تاثیری بر میزان کلروفیل ایجاد نکرده است (Larue et al., 2012).

۴-۱۷-۲- پروتئین کل و آنزیم های آنتی اکسیدانی

تحقیقات نشان داده‌اند که در طی تنش پروتئین‌های جدیدی ساخته می‌شوند یا محتوای برخی از پروتئین‌های موجود افزایش می‌یابد. در طی کاهش دما، فرآیندهای سلولی و متابولیکی تغییر می‌یابند و این تغییرات منجر به تجمع پروتئین‌هایی از قبیل پروتئین‌های محلول و پروتئین آپوپلاستی می‌شوند. پروتئین‌های شوک سرمایی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند آسکوربات، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و غیره در پاسخ به تنش دمای پایین و تجمع پروتئین‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و یا تنظیم‌کننده‌های کیناز مواردی از این گروه‌ها هستند (Close TJ, 1997; Hughes and Dunn, 1996; Jarillo et al., 1994; Wisniewski et al., 1999).

در تحقیق حاضر محتوای پروتئین کل تحت تاثیر تنش سرما به صورت معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش احتمالا بدلیل افزایش بیان برخی ژن‌ها از قبیل ژن‌های وابسته به متابولیسم اولیه، تنظیم اسمزی، تغییر ساختمان، رفع سمیت و همچنین افزایش بیان پروتئین‌های LEA می‌باشد. در ضمن محتوای پروتئین کل در گیاه شنبلیله تیمار شده با سطوح ۲ و ۵ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم تحت تنش سرما به صورت معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴-۵). در پژوهش رسولی و همکاران (۱۳۹۵) محلول پاشی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر روی گیاه بادمجان تحت تنش خشکی منجر به افزایش محتوای پروتئین شد.

سلول‌های گیاهی به‌منظور مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی به یک سیستم جاروب کننده رادیکال‌های آزاد مجهز هستند. آسکوربات، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی دارای اثرات قابل توجهی بر روی رشد و نمو گیاهان و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های محیطی است (Dixit et al., 2001). در این پژوهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش سرما به صورت معنی‌داری افزایش یافت. این رخداد به علت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش نیاز گیاه به تجزیه آن‌ها صورت گرفته است. کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم (سطوح ۲ و ۵ ppm) منجر به افزایش فعالیت این آنزیم شد و این افزایش در حقیقت قدرت گیاه را برای تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌دهد و متعاقبا منجر به افزایش تحمل گیاه شنبلیله می‌گردد (شکل ۴-۶). نتایج مطالعات نشان داده است که تحریک فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم احتمالا با کاهش محتوای H_2O_2 همراه می‌باشد و بدین ترتیب تحمل به سرما در گیاه افزایش می‌یابد (سعید امینی و همکاران، ۱۳۹۶). در واقع تحت تنش سرما، سلول‌ها به سمت ایجاد یک هموستازی جدید در انرژی و متابولیت برای سازگاری بیشتر تمایل دارند. همچنین در

مطالعات پیشین میزان آنزیم آسکوربات پروکسیداز در گیاه نخود تحت تنش سرما افزایش نشان داده است (Amini et al., 2017).

کاتالاز یکی از مهمترین تجزیه‌کننده‌های H_2O_2 در گیاهان محسوب می‌شود. این فرآیند با تبدیل H_2O_2 به آب و O_2 انجام می‌شود. در این پژوهش با شروع تنش سرما، فعالیت کاتالاز به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال دمایی افزایش یافت. در ضمن تیمار گیاهان با سطوح مختلف دی-اکسیدتیتانیوم به صورت موثری منجر به افزایش فعالیت کاتالاز شد (شکل ۴-۷). نانوذرات دی-اکسیدتیتانیوم احتمالاً تحریک‌کننده مسیرهای پیام‌رسانی خاصی هستند و تا حدودی به تنظیم تغییرات متابولیک در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از سرما منجر کمک می‌کنند و در نهایت منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (Hossain et al., 2015; Manke et al., 2013).

اثرگذاری نانوذرات روی بر افزایش بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در خیار تایید شده است (Mosa et al., 2018). (Moaveni et al., 2011) همچنین اثبات شده است که نانوذرات دی-اکسیدتیتانیوم در شرایط تنش در *Calendula officinalis* منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می‌شود (Moaveni et al., 2011). همچنین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در سویا بعد از تیمار گیاهان با TiO_2 و SiO_2 افزایش یافته است (Lu et al., 2002). در *Caralluma tuberculata* بیشترین محتوای فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در محیط رشد حاوی ۹۰ میکروگرم بر لیتر نانوذره نقره مشاهده شده است (Ali et al., 2019).

گایاکول پروکسیداز از جمله مهمترین گروه از پروکسیدازها محسوب می‌شود و به عنوان تامین‌کننده پتانسیل هیدروژن عمل می‌کند. واکنش گایاکول با پراکسید هیدروژن منجر به تشکیل ترکیبی به نام تترایاکوکوئینون می‌شود (Amiri et al., 2011). ایجاد تغییرات در دیواره سلولی بواسطه تنظیم هورمونی، مکانیسم‌های دفاعی، تجزیه ایندول استیک اسید و افزایش مقاومت نسبت به تنش سازش از

جمله مهمترین وظایف گایاکول پروکسیداز محسوب می‌شود (رحمانی و همکاران، ۱۳۹۲). در این تحقیق فعالیت گایاکول پراکسیداز تحت شرایط تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال افزایش یافت. در ضمن کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به افزایش بیشتر این آنزیم تحت شرایط تنش سرما شد (شکل ۴-۸). تحقیقات پیشین نشان داده است که محلول پاشی با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در گیاه ذرت سینگل کراس منجر به افزایش فعالیت گایاکول پروکسیداز می‌شود (شرقی و خلیلوند، ۱۳۹۹). نتایج پژوهش امینی و همکاران (2017) نیز نشان داده است که در گیاهان تیمار شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم میزان بیان نسی ژن‌های آسکوربات پروکسیداز، *ATPase*، ژن‌های دخیل در کمپلکس بازآرایی کروماتین و چاپرونین 60 در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش می‌یابد (Amini et al., 2017).

۴-۱۷-۳- نشت الکتروولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید

تنش‌های غیرزیستی موجب از بین رفتن تعادل بین تولید و تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه افزایش ناگهانی گونه‌های فعال اکسیژن در اندام‌های مختلف گیاهی مانند کلروپلاست و میتوکندری می‌شوند (Singh and Tuseja, 2010). حضور گونه‌های فعال اکسیژن چنانچه به صورت موثری حذف نشوند منجر به ایجاد خسارت به ماکرومولکول‌های سلولی نظیر لیپیدها و آنزیم‌ها می‌شوند (Hui-Ping et al., 2012). چربی‌های غشا، اولین هدف گونه‌های فعال اکسیژن هستند، بطوری‌که پراکسیداسیون این اسیدهای چرب منجر به تولید مالون دی‌آلدئید می‌شود. مالون دی‌آلدئید بعنوان یک شاخص زیستی پراکسیداسیون چربی و نشانه‌ی مهمی از حساسیت گیاهان در برابر تنش محسوب می‌شود (Lata et al., 2011; Turkan et al., 2005). همانطور که ذکر شد، مالون دی‌آلدئید شاخصی از میزان خسارت تنش اکسیداتیو است. افزایش کمتر سطح مالون دی‌آلدئید در ارقام گیاهی بیانگر مقاومت نسبی آن‌ها در برابر تنش است (Hui-Ping et al., 2012; Lata et al., 2011).

در تحقیق حاضر محتوای مالون دی‌آلدئید و درصد نشت الکترولیت با شروع تنش سرما به صورت معنی‌داری افزایش یافتند و گذشت زمان از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت منجر به افزایش بیشتر این دو شاخص شد. کاربرد سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت معنی‌داری منجر به کاهش درصد نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید تحت شرایط تنش سرما شد، که این اثر به معنی کاهش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشا و تعدیل اثرات تنش سرما است. اگرچه همه غلظت‌های دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت موثری مانع از کاهش این دو شاخص شدند، اما سطح ۲ ppm برای هر دو شاخص بسیار موثرتر بود و اثرات منفی تنش سرما را کاهش داد (شکل ۴-۹ و ۴-۱۰). تاثیر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید ناشی از القای مسیرهای انتقال پیام است که در نهایت منجر به تنظیم تغییرات متابولیک در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش سرما می‌شود (Yadav, 2010). در شرایط تنش، مالون دی‌آلدئید به علت افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمایی و نشت یونی، افزایش می‌یابد و متعاقب آن تولید رادیکال‌های آزاد باعث صدمه به لیپیدها و اسیدهای چرب غشا می‌گردد و در نهایت رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدرو پراکسی تولید می‌شوند. رادیکال‌های جدید تولید شده، عاملی برای سرعت بخشیدن به واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها محسوب می‌شوند (Guo et al., 2018; Yadav, 2010).

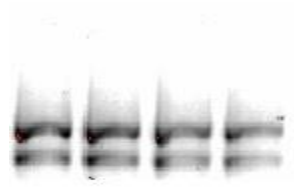
میزان مالون دی‌آلدئید را با تداوم شدت تنش افزایش می‌یابد (Lata et al., 2011). نتایج یک پژوهش نشان داد که غلظت پایین دی‌اکسیدتیتانیوم (غلظت ۵ ppm) در طی تنش سرما در ژنوتیپ‌های نخود منجر به کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید و درصد نشت الکترولیت می‌شود. حضور دی‌اکسیدتیتانیوم در سلول‌ها در طی تنش سرما احتمالاً باعث القای مسیرهای پیام‌رسانی می‌شود و تا حدودی در تنظیم تغییرات متابولیک در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش سرما نقش دارد (Mohammadi et al., 2013).

از نشت الکتروولیت به عنوان یک شاخص مهم برای ارزیابی میزان خسارت غشاء تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی به طور وسیعی استفاده می‌شود (Silva et al., 2010). افزایش میزان نشت غشاء در شرایط تنش سرما در این تحقیق به عنوان شاخصی از آسیب‌پذیری غشا در نظر گرفته می‌شود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال تیمار دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به کاهش روند افزایشی شاخص نشت الکتروولیت می‌شود. در این پژوهش، سرما باعث تغییر شکل غشا از فاز کریستال مایع به فاز ژل (نیمه جامد) شد و بدین ترتیب فعالیت غشا مختل گردید (Baeka and Skinner., 2003; Thomashow, 1998). در شرایط تنش سرما، درصد نشت الکتروولیت به علت آسیب بافت‌ها افزایش می‌یابد، فعالیت غشا مختل می‌شود و الکتروولیت‌های داخل سلول به خارج از آن نشت می‌کنند (Hanna and Bischofa, 2004). در حقیقت، تغییر در ساختار و ترکیب اسیدهای چرب، کربوهیدرات‌ها، فعالیت‌های متابولیکی، محتوای پروتئین، فعالیت آنزیمی، نشت الکتروولیت‌های بین سلولی و آمینو اسیدها از جمله مهمترین و معمول‌ترین صدمات ناشی از تنش سرما هستند (Gusta and Tyler, 1982). کاهش میزان نشت الکتروولیت در گیاهان شنبلیله تیمار شده با دی‌اکسیدتیتانیوم به علت تحریک مسیرهای پیام‌رسانی توسط این نانوذرات است، که تا حدودی در تنظیم تغییرات متابولیکی در برابر تنش‌های اکسیداتیو ناشی از تنش سرما موثر است (Sofa et al., 2004).

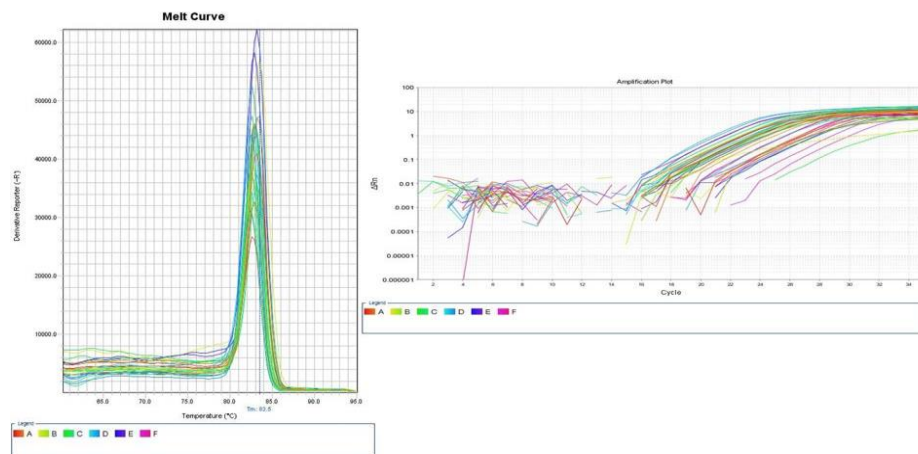
۴-۱۷-۴- بررسی کیفیت RNA و صحت تکثیر اختصاصی آغازگرها

قبل از بررسی بیان ژن‌ها بایستی کیفیت RNA استخراج شده مورد بررسی قرار گیرد. در این پژوهش ابتدا کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد کنترل شد. همانطور که در شکل ۴-۱۶ مشخص است، RNA استخراج شده دارای کیفیت قابل قبولی است. در ضمن، قبل از آنالیز داده‌های بیان ژن، از آنالیز منحنی ذوب و تکثیر به منظور تایید صحت داده‌ها استفاده شد (شکل

۴-۱۷). در این شکل منحنی تکثیر سیگموئیدی شکل است و منحنی ذوب نیز کاملاً تک پیک بوده و دمای ذوب آن بیشتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (اختصاصی بودن پرایمرها را تایید شد).



شکل ۴-۱۶- RNA استخراج شده تعدادی از تیمارهای این تحقیق (از ژل آگارز با غلظت یک درصد استفاده شده است).



شکل ۴-۱۷- منحنی ذوب (سمت چپ) و منحنی تکثیر (سمت راست) ژن CAS

۴-۱۷-۵- بررسی بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز دایوسجنین

ژن اسکوالن سنتاز (*SQS*) نقش مهمی در تنظیم کانال کربن در متابولیت اولیه و ثانویه دارد. این ژن اولین مرحله آنزیمی مسیر ایزوپرنوئیدها را در بیوسنتز استرول و تری‌ترین‌ها کاتالیز می‌کند (Ye et al., 2014). بیان این ژن با شروع تنش سرما تغییر معنی‌داری نسبت به شرایط نرمال نداشت. این

درحالی بود که بیان ژن مذکور بعد از اعمال سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم (۲، ۵ و ۱۰ ppm) و تحت تنش دمایی پایین به ترتیب ۶ (۴۸ ساعت)، ۳۳ (۲۴ ساعت) و ۶ (۲۴ ساعت) برابر نسبت به تیمار دمایی نرمال و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم افزایش یافت (شکل ۴-۱۱).

ژن اسکوالن اپوکسیداز (*SEP*)، اولین مرحله اکسیژناسیون را در مسیر بیوسنتز استرول‌ها با اکسید کردن مولکول اسکوالن انجام می‌دهد. آنزیم اسکوالن اپوکسیداز با کسید کردن اسکوالن منجر به تشکیل ۲ و ۳ اکسیدواسکوالن می‌گردد (Han et al., 2010). در این پژوهش، بیان ژن *SEP* در شرایط نرمال دمایی و بار کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به شرایط نرمال ۱۸ برابر افزایش یافت. در ضمن، بیان این ژن تحت تنش سرما و در شرایط عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم اگرچه نسبت به شرایط دمایی نرمال و عدم کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم (۶ و ۲۴ ساعت پس از تنش) افزایش یافت، اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۴-۱۲). در پژوهش شیخی و همکاران (۱۳۹۹) میزان بیان ژن *SEP* تحت تنش دمایی بالا و در سطوح ۲ و ۵ ppm براسینواستروئید به ترتیب ۲۰ و ۱۰ برابر نسبت به شرایط دمایی نرمال افزایش یافت. تولید متابولیت‌های ثانویه در اغلب گیاهان تحت تنش ملایم افزایش می‌یابد. در حقیقت، در تنش ملایم روزه‌های گیاهی همچنان باز هستند و در این حالت فتوسنتز کاهش نمی‌یابد، لذا پیش‌ماده‌های مورد نیاز برای سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه به میزان کافی وجود دارد (Llusia et al., 2006). در شرایط تنش شدید، شدت فتوسنتز و در نتیجه میزان تولید پیش‌ماده‌ها بیوسنتز متابولیت‌ها کاهش می‌یابد. مشخص شده است که در چنین شرایطی درصد بیش‌تری از کربن تثبیت شده در فتوسنتز صرف تولید این ترکیب‌ها می‌شود. علت این موضوع به عملکرد اکوفیزیولوژیکی این متابولیت‌ها (دفاع و محافظت گیاه در برابر تنش‌های غیر زنده و تنش ناشی از پاتوژن‌ها از طریق ذخیره در گیاه و انتشار در محیط اطراف) برمی‌گردد. علاوه بر در شرایط تنش، گیاه تحت نسبت به آسیب پاتوژن‌ها و حشرات مستعد است، بنابراین تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و متابولیت‌های ثانویه با نقش حفاظتی

موثرتر افزایش می‌یابد (Delfinea et al., 2005). به نظر می‌رسد که تنش دمایی پایین و همچنین اثر متقابل دمایی پایین و نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم به خوبی به عنوان یک عامل محرک خارجی در افزایش بیان دو ژن *SQS* و *SEP* عمل کرده‌اند.

سیکلوآرتنول سنتاز (*CAS*)، منجر به شکل‌گیری ساختارهای استرولی از قبیل استیگما استرول، سیتواسترول یا کامپسترول می‌گردد. این ژن، ۲ و ۳- اکسیدواسکوالن را به سیکلوآرتنول که سوبسترای مورد نیاز در مسیر تبدیل به فیتواسترول‌ها و دیگر استرول‌های گیاهی محسوب می‌شود، تبدیل می‌کند. تحت شرایط تنش سرما بیان این ژن نسبت به شرایط نرمال تغییر معنی‌داری نداشت. کاربرد سطح ۲ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم منجر به کاهش اندکی در بیان ژن مذکور نسبت به شرایط نرمال شد. بیان این ژن در سطوح ۵ و ۱۰ دی‌اکسیدتیتانیوم و تحت تنش سرما به ترتیب ۵ (۴۸ ساعت) و ۲۱ (۶ ساعت) برابر افزایش یافت (شکل ۴-۱۳). در حقیقت اعمال تیمار ترکیبی تنش سرما و دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت قابل توجهی منجر به افزایش ژن مذکور گردید. در یک مطالعه بیان ژن *CAS* تحت تاثیر تنش خشکی تغییر نشان نداد (Nasrollahi et al., 2014).

سیکلوآرتنول، در گیاهان ترکیب آغازی برای شروع بیوسنتز استرول‌هاست، که سوبسترای C24-methyltransferase هم محسوب می‌شود (Diener et al., 2000). مسیر استرول به دو بخش مجزا تقسیم می‌شود: در بخش اول، استات به وسیله چند مرحله در مسیر موالونات به اپوکسی اسکوالن تبدیل می‌شود و در بخش دوم اپوکسی اسکوالن به سیکلوآرتنول تبدیل می‌گردد (Nes et al., 1999). تبدیل سیکلوآرتنول به ۲۴-متیلن سیکلوآرتنول عمدتاً به وسیله یک نوع استرول C24-methyltransferase وابسته به *SMT1* (S-adenosyl-Met 1) انجام می‌شود (Schaeffer et al., 2001). C24-methyltransferase یک گروه متیل را به سیکلوآرتنول اضافه می‌کند و همچنین می‌تواند مرحله دوم متیلاسیون یعنی تبدیل ۲۴-متیلن لوفنول به ۲۴-اتیلیدن لوفنول البته با کارایی پایین‌تر را نیز کاتالیز

کند (Benveniste, 1986). با توجه به نتایج تحقیق حاضر، بیان ژن *SMT* در تمامی تیمارهای این آزمایش پایین بود، اگرچه اختلافات بین تیمارهای آزمایش در بعضی از تیمارها معنی‌دار بود، اما در مجموع بیان این ژن تغییرات قابل توجهی نداشت (شکل ۴-۱۴). در پژوهش شیخی و همکاران (۱۳۹۹)، کاربرد ۲۴-پی‌براسینواستروئید بعد از گذشت ۲۴ ساعت موجب افزایش بسیار معنی‌داری در بیان ژن *SMT* به میزان ۶ برابر گردید. مقایسه نتیجه تحقیق حاضر با تحقیق شیخی و همکاران (۱۳۹۹) نشان می‌دهد که عکس‌العمل ژن‌ها به محرک‌های مختلف از قبیل سرما و گرما، براسینواستروئید، نانوذرات کاملاً متفاوت است. بنابراین مطالعه عکس‌العمل ژن‌های مختلف تحت شرایط تیماری متفاوت و یا گونه‌های یک جنس می‌تواند در افزایش دانش ما درباره پاسخ مسیرهای متابولیکی به انواع محرک‌ها مفید باشد. همچنین بیان ژن‌های *SSR*، *SQS* و *SMT* تحت تاثیر تیمار پلاسمای سرد به ترتیب ۵/۲۶، ۳/۴۲ و ۳ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته است (Ebrahimibasabi et al., 2020).

بیوسنتز دایوسجینین در شنبلیله در ابتدا با Acetyl-COA شروع می‌شود و اسکوالن از طریق مسیر موالونات سنتز می‌گردد. سپس بیوسنتز کلسترول از ۲ و ۳ اکسیدواسکولن شروع و تا سیکلوآرتنول ادامه می‌یابد. پس از این مرحله سیکلوآرتنول به عنوان سوبسترا برای دو ژن *Δ24-reductase* و *C24-methyltransferase* مورد استفاده قرار می‌گیرد. *C24-methyltransferase* با متیله کردن کربن ۲۴، مسیر را به سمت تولید فیتواسترول‌ها پیش می‌برد و در مقابل ژن *Δ24-reductase* که به عنوان آنزیم کلیدی و تعیین کننده مسیر شناخته شده است، با شکستن پیوند دو گانه مسیر را به سمت سنتز کلسترول هدایت می‌کند (Sonawane et al., 2017). در این پژوهش بیان ژن *SSR* تحت تنش سرما و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم کاهش یافت، در حالی که تیمار گیاهان تحت تنش سرما با سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت معنی‌داری منجر به افزایش بیان این ژن شد. بیشترین بیان این ژن در تیمار ۱۰ ppm دی‌اکسیدتیتانیوم و تحت تاثیر تنش سرما (۶ ساعت) به میزان ۱۶ برابر نسبت به دمای نرمال

و بدون کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم ثبت شد (شکل ۴-۱۵). دو ژن *SSR* و *SMT* در مسیر بیوسنتز دایوسجنین با یکدیگر رقابت می‌کنند، به‌طوری‌که ژن *SSR* مسیر را به سمت بیوسنتز دایوسجنین و ژن *SMT* مسیر را به سمت بیوسنتز سایر ترکیبات از جمله براسینواستروئیدها هدایت می‌کند (Zolfaghari et al., 2020; Mohammadi et al., 2020). در این تحقیق بیان ژن *SMT* تغییر چندانی نداشت، در حالی‌که بیان ژن *SSR* با اعمال تیمار دمای پایین و کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت بسیار معنی‌داری افزایش یافت. این نتیجه گیری نشان می‌دهد که استفاده از دی‌اکسیدتیتانیوم و سرما همراه با یکدیگر احتمالاً می‌تواند یک روش کارا برای افزایش محتوای دایوسجنین در شنبلیله باشد، چرا که این تیمار ترکیبی منجر به افزایش بیان ژن اصلی (*SSR*) شد، در حالی‌که بیان ژن *SMT* (ژن رقیب) که مسیر بیوسنتز دایوسجنین را به سمت تولید دیگر استرول‌های گیاهی هدایت می‌کند، کاهش یافت.

در یک پژوهش، اثر نانوذره نقره را بر روی بهبود خصوصیات رشدی و افزایش محتوای دایوسجنین بررسی شد. نتایج نشان داد که این نانوذره به صورت معنی‌داری بر روی پارامترهای رشدی از قبیل تعداد برگ، طول ریشه و ساقه و وزن تر موثر است. همچنین کاربرد نانو ذره نقره منجر به افزایش ۳۰ درصدی محتوای دایوسجنین در گیاهان تیمار شده گردید (Jasim et al., 2017). نتیجه پژوهش عبادولاهی و همکاران (۲۰۱۹) در مورد اثر نانوذرات پرلیت و نانوکامپوزیت‌های TiO_2 /پرلیت بر کشت کالوس گل راعی نشان داد که نانوذرات پرلیت و نانوکامپوزیت‌های TiO_2 /پرلیت به عنوان یک عامل محرک کاربردی برای تولید هایپرسیپین و سودوهایپرسیپین در کشت کالوس گل‌راعی موثر هستند (Ebadollahi et al., 2019).

اندازه کوچک نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم به نفوذ موثر و سریع آن‌ها به درون سلول کمک می‌کند و منجر به تحریک بیان ژن در سلول‌های گیاهی می‌شود. وجود محرک‌هایی مانند نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در محیط ممکن است به عنوان یک عامل تنش‌زا عمل کند و باعث افزایش فعالیت‌های

دفاعی گیاه و در نتیجه تحریک بیان ژن تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه در گیاه شود. در پژوهش کریم-زاده و همکاران (2014) محلول پاشی با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در شرایط تنش کم آبی منجر به افزایش بیان ژن *RAS* گردید (Kamalizadeh et al., 2014). خدایاری و همکاران (2015) نیز نشان دادند که استفاده از نانوذرات نقره باعث افزایش بیان ژن‌های *DIOX2*, *DBOX*, *tydc7* و *bbe1* می‌گردد (Khodayari et al., 2015). در یک پژوهش کاربرد نانوذرات روی و کبالت باعث افزایش بیان ژن‌های *STR* و *D4H* و *DAT* در گیاه پروانش شد (رضایی و همکاران، ۱۳۹۵).

بنظر می‌رسد نانوذرات با تحریک وضعیت ردوکس سلولی و فیتوهورمون‌ها، منجر به ایجاد سیگنالینگ خاصی می‌شود که به واسطه آن رونویسی از ژن‌های هسته تحت تاثیر قرا می‌گیرد. پژوهش‌های متعددی بر اثرگذاری نانوذرات بر فیتوهورمون‌ها، *NO* و رونویسی از ژن‌ها در گونه‌های مختلف گیاهی تأکید دارند (Babajani et al., 2019; Oluwaseun and Sarin, 2017).

علاوه بر این، نانوذرات، بسته به غلظت و ساختارشان موثر هستند. نانوذرات در غلظت‌های پایین، در تحریک بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه موثر می‌باشند، با این حال، غلظت‌های بالای آن‌ها احتمالاً، باعث ایجاد سمیت و اختلال در فرآیندهای سلولی می‌شوند. نتایج پژوهش حاضر نیز تایید کرد که چه در بخش فیزیولوژی و چه در بخش بیان ژن (برای بیشتر صفات و نه صرفاً همه صفات) سطوح ۲ و ۵ ppm از دی‌اکسیدتیتانیوم به صورت موثری اثرات تنش سرما در گیاه را کاهش داد و منجر به افزایش بیان ژن‌های بیوسنتز دایوسجنین شد، در حالی که اثرگذاری سطح ۱۰ ppm به صورت معنی‌داری کمتر از دو غلظت دیگر بود (در مورد بعضی از صفات حتی به واسطه اثرات سمی دارای اثرات منفی بود).

نتایج مطالعات مختلف بر اثرگذاری نانوذرات بر تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تأکید کرده‌اند. در توافق با یافته‌های ما، گزارش شده است که نانو ذره سلنوم با تحریک متابولیسم ثانویه از طریق القای بیان ژن‌های *RAS* و *HPPR* در *Melissa officinalis* همراه است (Babajani et al., 2019). معروفی و

همکاران (۲۰۱۹) به منظور ارزیابی بیان برخی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز دایوسجنین در شنبلیله از تیمارهای متیل جاسمونات با غلظت نیم میلی‌مولار و سالیسیلیک اسید با غلظت یک میلی‌مولار در بازه‌های زمانی صفر، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان‌دهنده‌ی عدم تغییر بیان ژن *CAS* در گیاهان تحت تیمار با سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان شاهد بود، در حالی‌که، بیان ژن‌های ژن‌های *SQS* و *SMO* در برخی زمان‌ها افزایش یافت.

با توجه به رشد فزاینده صنعت فناوری نانو در همه جهات زندگی بشر، یک ضرورت حیاتی در مطالعات بیشتر در این مورد به منظور شناسایی اثرات آن‌ها در تمامی جوانب زندگی بشر احساس می‌شود. اگرچه، نانوذرات بر تمامی جنبه‌های رشد گیاه از قبیل مورفولوژی، فیزیولوژی و متابولوم اثرگذار است، اما هنوز تناقض‌ها و ابهاماتی در این مورد بویژه درباره تاثیرگذاری آن‌ها بر متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (Marshlin et al., 2017).

مکانیسم افزایش متابولیت‌های ثانویه بعد از تیمار با نانوذرات هنوز به درستی مشخص نشده است (Khodakovskaya et al., 2011; Kohan-Baghkheirati and Geisler-Lee, 2015). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد نانوذرات مشابه سایر تنش‌ها، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را از طریق تحریک مسیرهای انتقال پیام تغییر می‌دهند. در حقیقت، جریان کلسیم، افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده را می‌توان از جمله اثرات نانوذرات در گیاه در نظر گرفت. در بیشتر مطالعات، از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن به عنوان یکی از اثرات نانوذرات یاد شده است (Mahjouri et al., 2018). در حقیقت، گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در اثر تیمار با نانوذرات به عنوان یک پیام برای تحریک متابولیسم ثانویه در گیاهان عمل می‌کنند (Marshlin et al., 2017). تحریک واکنش‌های پیام‌رسانی تنش با واسطه کلسیم سیتوزولی و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه آرابیدوپسیس بعد از تیمار با نانوذرات گزارش شده است (Sosan et al., 2016). پیشنهاد شده است که

در گیاهان ممکن است پیام‌رسانی تنش اکسیداتیو مبتنی بر مُدل‌های آبشاری MAPK کنترل شود (Kohan-Baghkheirati and Geisler-Lee, 2015). لذا، تحریک مسیرهای پیام‌رسانی باعث تحریک بیان ژن و در نهایت تغییر در محتوای متابولیت‌های ثانویه می‌شود.

نتیجه گیری نهایی

کاربرد نانوذرات با توجه به اثرات مفید بر تحریک سیستم دفاعی گیاه و القای مقاومت در دهه گذشته به یکی از زمینه‌های تحقیقاتی جذاب تبدیل شده است (Rastogi et al., 2017). در این پژوهش از دی‌اکسیدتیتانیوم با هدف تحریک سیستم دفاعی و افزایش تحمل شنبلیله نسبت به تنش سرما استفاده شد. به صورت جالبی، کاربرد این نانوذره نه تنها مانع از کاهش محتوای کلروفیل و کارتنوئید تحت تنش سرما شد، بلکه به‌صورت موثری محتوای کاروفیل و کاروتنوئید را افزایش داد، که این افزایش قطعاً منجر به افزایش بازده فتوسنتز و تولید عملکرد خواهد شد. در ضمن نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز شرایط مناسب برای تجزیه گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از تنش سرما را فراهم آورد و بدین ترتیب مانع از افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب دیواره سلولی و نشت این ترکیبات به خارج از سلول شد.

در این تحقیق اثر نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم و تنش سرما بر بیان برخی از ژن‌های مسیر بیوسنتز دایوسجنین بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد دی‌اکسیدتیتانیوم از طریق تحریک مسیرهای پیام‌رسانی قادر به تغییر بیان ژن‌های شنبلیله است. نتایج بررسی‌های مختلف ثابت کرده‌اند که اثرات نانوذرات با توجه به اندازه و ساختارشان، غلظت و مرحله رشدی گیاهان متفاوت است، بنابراین توجه این فاکتور، لزوم تحقیقات بیشتری را در مورد اثرات این نانوذرات بر ویژگی‌های گیاهان را می‌طلبد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که دی‌اکسیدتیتانیوم یک محرک کاربردی موثر به منظور تحریک بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه و در نتیجه تعدیل اثرات سرما در شنبلیله است.

پیشنهادات

- ۱- کاربرد سایر ساختارهای دی‌اکسیدتیتانیوم ، چرا که پاسخ گیاهان تا حدود زیادی به نوع ساختار نانوذره وابسته است.
- ۲- استفاده از دی‌اکسیدتیتانیوم با اندازه ذرات و یا غلظت‌های متفاوت.
- ۳- سنجش میزان نهایی دایوسجنین بعد از تیمار گیاهان با دی‌اکسیدتیتانیوم به منظور تایید اثرگذاری دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای دایوسجنین در شنبلیله.
- ۴- بررسی اثر دی‌اکسیدتیتانیوم بر محتوای کامل متابولیتی گیاه شنبلیله.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات سطوح مختلف دما بر صفات فیزیولوژیک در شنبلیله

سطح مختلف دما	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	آسکورات پراکسیداز	کاتالاز	نشت الکترولیت	گایاکول پراکسیداز	مالون دی آلدئید	پروتئین کل
۱۰°C	۱/۶۰ a	۱/۷۸ a	۳/۳۹ a	۲/۳۳ a	۲۰/۵۳ a	۲۹/۶۸ a	۲۴/۱۰ a	۳۲/۸۱ a	۱۳/۸۴ a	۹۴/۹۳ a
۲۳°C	۱/۶۵ a	۱/۹۴ a	۳/۵۶ a	۲/۳۰ a	۱۵/۰۸ b	۲۴/۰۷ b	۲۱/۲۱ b	۲۴/۱۶ b	۱۲/۲۷ b	۸۰/۳۷ b

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات زمان‌های مختلف نمونه‌گیری بر صفات فیزیولوژیک در شبلیله

پروتئین کل	مالون دی- آلدئید	گایاکول پراکسیداز	نشت الکترولیت	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	زمان‌های مختلف نمونه‌گیری
۸۲/۹۰ b	۱۲/۱۲ c	۲۷/۵۱ a	۲۰/۳۶ b	۲۵/۶۷ b	۱۵/۶۲ b	۲/۵۴ a	۳/۹۶ a	۲/۲۳ a	۱/۷۷ a	۶ h
۱۰۱/۰۷ a	۱۳/۰۱ b	۲۹/۱۳ a	۲۳/۲۳ a	۲۸/۶۸ a	۱۹/۳۰ a	۲/۴۲ a	۳/۵۵ b	۱/۸۹ b	۱/۶۵ a	۲۴ h
۷۸/۹۹ c	۱۳/۸۹ a	۲۸/۸۲ a	۲۴/۳۶ a	۲۶/۲۸ b	۱۸/۵۱ a	۱/۹۸ b	۲/۹۲ c	۱/۴۷ c	۱/۴۵ b	۴۸ h

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر صفات فیزیولوژیک در شنبلیله

سطح مختلف TiO ₂	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	نشت الکترولیت	گیاکول پراکسیداز	مالون دی آلدئید	پروتئین کل
۰ ppm	۱/۵۹ b	۱/۸۵ b	۳/۰۵ b	۲/۱۳ c	۱۴/۳۹ c	۲۱/۵۰ c	۲۵/۳۵ a	۲۴/۱۰ b	۱۴/۰۲ a	۷۴/۸۷ c
۲ ppm	۱/۷۸ a	۲/۲۸ a	۳/۹۷ a	۲/۶۸ a	۱۹/۹۷ a	۲۷/۰۰ b	۲۲/۳۷ b	۲۹/۸۶ a	۱۱/۶۸ c	۹۵/۹۰ a
۵ ppm	۱/۶۸ a	۲/۰۷ a	۳/۶۶ a	۲/۴۱ b	۲۰/۱۲ a	۳۰/۱۹ a	۲۲/۰۲ c	۳۰/۷۷ a	۱۲/۷۹ b	۹۸/۰۰ a
۱۰ ppm	۱/۳۴ c	۱/۲۵ c	۲/۱۳ c	۲/۰۴ c	۱۶/۷۵ b	۲۸/۹۹ b	۲۲/۸۷ b	۲۹/۲۱ a	۱۳/۵۳ ab	۸۱/۸۳ c

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف دما در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بر صفات فیزیولوژیک در شنبلیله

پروتئین کل	مالون دی-آلدئید	گایاکول پراکسیداز	نشت الکترولیت	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	(دما*زمان)
۸۹/۷۵ a	۱۲/۶۷ bc	۳۱/۷۲ a	۱۹/۷۸ c	۲۸/۱۹ b	۱۷/۷۲ c	۲/۸۸ a	۴/۵۴ a	۲/۴۳ a	۲/۱۰ a	۱۰ °C*۶ h
۷۸/۰۵ b	۱۴/۱۴ a	۳۱/۴۸ a	۲۴/۷۲ b	۳۲/۲۱ a	۲۳/۵۵ a	۲/۶۳ ab	۳/۵۸ b	۱/۸۵ b	۱/۷۳ bc	۱۰ °C*۲۴ h
۹۶/۴۸ a	۱۴/۷۲ a	۳۵/۲۲ a	۲۷/۸۰ a	۲۸/۶۵ b	۲۰/۳۳ b	۱/۴۷ d	۲/۰۵ c	۱/۰۷ c	۰/۹۷ e	۱۰ °C*۴۸ h
۷۶/۲۲ b	۱۱/۵۷ d	۲۳/۳۰ bc	۲۰/۹۵ c	۲۳/۱۵ c	۱۳/۵۲ e	۲/۲۰ c	۳/۳۷ b	۲/۰۳ b	۱/۴۴ d	۲۳ °C*۶ h
۹۶/۱۵ a	۱۱/۸۹ cd	۲۶/۷۷ b	۲۱/۷۵ c	۲۵/۱۴ c	۱۵/۰۵ d	۲/۲۱ c	۳/۵۲ b	۱/۹۴ b	۱/۵۸ cd	۲۳ °C*۲۴ h
۶۴/۱۸ c	۱۳/۰۶ b	۲۲/۴۲ c	۲۰/۹۳ c	۲۳/۹۰ c	۱۶/۶۸ c	۲/۴۹ bc	۳/۷۹ b	۱/۸۷ b	۱/۹۲ ab	۲۳ °C*۴۸ h

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف دما در سطوح مختلف دی اکسید تیتانیوم بر صفات فیزیولوژیکی در شبلیله

پروتئین کل	مالون دی آلدئید	گایاکول پراکسیداز	نشت الکترولیت	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	کاروتنوئید کل	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	(دما*TiO ₂)
۸۲/۹۰ bc	۱۷/۵۵ a	۳۱/۷۰ bc	۳۵/۷۷ a	۲۵/۲۷ cd	۱۸/۸۳ c	۱/۷۷ d	۲/۷۹ c	۱/۵۹ cd	۱/۲۰ e	۱۰ °C *۱۰ ppm
۷۳/۹۵ c	۱۰/۷۸ d	۳۷/۰۷ a	۱۸/۴۱ c	۳۰/۱۹ ab	۲۵/۱۵ a	۳/۴۳ a	۴/۶۰ a	۲/۴۱ ab	۲/۱۹ a	۱۰ °C *۲ ppm
۹۶/۲۸ ab	۱۲/۷۶ c	۳۴/۰۰ ab	۲۱/۲۷ c	۳۲/۳۰ a	۲۳/۰۴ b	۲/۲۳ bc	۳/۷۰ b	۱/۸۶ c	۱/۸۳ b	۱۰ °C *۵ ppm
۹۹/۲۳ a	۱۴/۲۸ b	۲۸/۴۴ c	۲۰/۹۳ c	۳۰/۹۸ ab	۱۵/۱۲ d	۱/۸۸ cd	۲/۴۷ c	۱/۲۷ d	۱/۱۹ e	۱۰ °C *۱۰ ppm
۷۵/۰۲ c	۱۰/۵۰ d	۱۶/۵۰ e	۱۴/۹۲ d	۱۷/۷۳ e	۹/۹۵ e	۲/۵۰ b	۴/۷۱ a	۲/۷۱ a	۱/۹۹ ab	۲۳ °C *۱۰ ppm
۹۲/۷۹ ab	۱۲/۵۹ c	۲۲/۶۵ d	۲۶/۳۳ b	۲۳/۸۱ d	۱۴/۷۹ d	۱/۹۳ cd	۲/۹۳ c	۱/۵۵ cd	۱/۳۷ de	۲۳ °C *۲ ppm
۹۰/۷۸ ab	۱۲/۸۳ c	۲۷/۵۵ c	۱۸/۷۶ c	۲۸/۰۹ bc	۱۷/۲۰ c	۲/۵۸ b	۴/۰۲ b	۲/۲۸ b	۱/۷۴ bc	۲۳ °C *۵ ppm
۵۶/۸۱ d	۱۲/۷۸ c	۲۹/۹۷ bc	۲۴/۸۱ b	۲۶/۶۴ cd	۱۸/۳۹ c	۲/۲۰ bc	۲/۵۹ c	۱/۲۳ d	۱/۴۹ cd	۲۳ °C *۱۰ ppm

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف دی‌اکسیدتیتانیوم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بر صفات فیزیولوژیکی در شنبلیله

پروتئین کل	مالون دی- آلدئید	گایاکول پراکسیداز	نشت الکترولیت	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	کاروتنوئید کل	کلروفیل b	کلروفیل a	(زمان *TiO ₂)	
۷۹/۴۸ cdef	۱۳/۰۸ bcde	۲۱/۷۲ fg	۲۱/۸۳ cd	۲۰/۶۱ d	۱۲/۵۹ e	۲/۴۶ bcde	۴/۱۴ ab	۲/۳۶ ab	۱/۷۷ abc	۶ h*۰ ppm
۹۰/۱۰ bcd	۱۰/۹۰ f	۲۵/۳۲ ef	۲۰/۴۴ cde	۲۵/۹۹ bc	۱۵/۹۵ cd	۳/۲۲ a	۴/۲۳ ab	۲/۳۶ ab	۱/۸۶ ab	۶ h*۲ ppm
۹۸/۳۹ ab	۱۱/۸۸ def	۲۸/۰۷ cde	۱۷/۸۶ e	۲۸/۸۱ ab	۱۶/۷۶ cd	۲/۵۶ bcd	۴/۶۱ a	۲/۵۱ a	۲/۰۹ a	۶ h*۵ ppm
۶۳/۹۷ f	۱۲/۶۳ cde	۳۴/۹۳ ab	۲۱/۳۱ cde	۲۷/۲۸ ab	۱۷/۱۶ c	۱/۹۳ f	۲/۸۵ d	۱/۶۸ de	۱/۳۶ de	۶ h*۱۰ ppm
۷۳/۷۶ def	۱۳/۵۰ bcd	۲۴/۲۲ ef	۲۶/۶۳ a	۲۱/۳۴ d	۱۴/۶۰ de	۲/۱۳ def	۳/۸۰ bc	۲/۲۳ abc	۱/۵۶ bcde	۲۴ h*۰ ppm
۹۱/۴۳ abcd	۱۱/۷۸ ef	۲۴/۶۸ ef	۲۲/۶۰ bcd	۲۸/۲۵ b	۱۹/۷۵ b	۲/۸۸ ab	۳/۸۳ bc	۱/۹۲ bcd	۱/۹۰ ab	۲۴ h*۲ ppm
۱۰۸/۵۹ a	۱۳/۱۸ bcde	۳۳/۱۹ bc	۲۲/۴۴ bcd	۳۲/۴۶ a	۲۳/۱۳ a	۲/۶۲ bc	۳/۷۲ bc	۲/۰۱ bcd	۱/۷۱ bcd	۲۴ h*۵ ppm
۷۴/۶۲ def	۱۳/۶۰ bc	۳۴/۴۲ ab	۲۱/۲۷ cde	۳۲/۶۶ a	۱۹/۷۳ b	۲/۰۵ ef	۱/۹۰ e	۱/۴۰ e	۱/۴۳ cde	۲۴ h*۱۰ ppm
۸۳/۶۴ bcde	۱۵/۰۰ a	۲۶/۳۵ def	۲۷/۵۹ a	۲۲/۵۵ cd	۱۵/۹۷ cd	۱/۸۱ f	۳/۳۰ cd	۱/۸۵ cde	۱/۴۵ cde	۴۸ h*۰ ppm
۶۸/۵۸ ef	۱۲/۳۷ cdef	۳۹/۵۸ a	۲۴/۰۹ abc	۲۶/۷۷ b	۲۴/۲۲ a	۱/۹۳ f	۳/۲۴ cd	۱/۶۶ de	۱/۵۷ bcde	۴۸ h*۲ ppm
۷۳/۶۱ def	۱۳/۳۱ bcde	۳۱/۰۶ bcd	۱۹/۷۵ de	۲۹/۳۰ ab	۲۰/۴۷ b	۲/۰۴ ef	۳/۲۵ cd	۱/۷۰ de	۱/۵۴ bcde	۴۸ h*۵ ppm
۹۵/۴۸ abc	۱۴/۳۷ ab	۱۸/۲۸ g	۲۶/۰۳ ab	۲۶/۴۸ b	۱۳/۳۷ e	۲/۱۵ cdef	۱/۹۰ e	۰/۶۷ f	۱/۲۳ e	۴۸ h*۱۰ ppm

منابع

۱. احمدی، ع.، پ، احسان زاده و ف، جباری. ۱۳۸۳. مقدمه ای بر فیزیولوژی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران.
۲. آخوندی، م.، زارع حسن آبادی، م. ۱۳۹۳. تلاقی بین علامت رسانی تنش های زیستی و غیر زیستی در گیاهان، مجله ایمنی زیستی، دوره ۷، شماره ۱.
۳. افشارمحمدیان، م؛ انصاری پیری، ز. ۱۳۹۶. تاثیر سطوح مختلف سرما روی پروتئین کل، پرولین و فعالیت برخی از آنتی اکسیدان های آنزیمی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni). مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۲.
۴. امید بیگی، ر. ۱۳۷۹. رهیافتهای تولید و فرآوری گیاهان دارویی. تهران، جلد اول، چاپ دوم، انتشارات طراحان نشر.
۵. امید بیگی، ر. ۱۳۸۶. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد یک و دو، چاپ چهارم، انتشارات آستان قدس رضوی، ص ۷۹۰.
۶. امینی، ز؛ حداد، ر. ۱۳۹۲. نقش رنگیزه های فتوسنتزی و آنزیم های آنتی اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو، مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران).
۷. امینی، س؛ معالی، ر؛ سلطانی. ۱۳۹۶. برخی تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی القا شده به وسیله نانوذرات تیتانیوم دی اکسید تحت تنش سرما در نخود زراعی، ژنتیک نوین، دوره دوازدهم، شماره ۱، صفحه ۱۹-۲۸.
۸. خاوری نژاد، ر؛ نجفی، ف؛ رضایی ارمی، س. ۱۳۹۵. پاسخ های فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاه گوجه فرنگی تحت تنش آلومینیوم. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی.

۹. رحمانی، ع؛ صیقلی، ن؛ ابراهیم زاده، ح. ۱۳۹۲. بررسی سینتیک فعالیت پراکسیداز در غلظت های مختلف گایاکول در بنه های زعفران زراعی. مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، دوره ۳، شماره ۱۱.
۱۰. رسولی، ف؛ عابدینی، ف؛ زاهدی، س. ۱۳۹۵. بررسی کاربرد نانوذره دی اکسیدتیتانیوم بر خصوصیات فیزیولوژیکی و پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه بادمجان تحت تنش کم آبیاری. دوفصلنامه علوم سبزی ها، سال ۲، شماره ۴، صفحات ۳۷-۵۱.
۱۱. رضایی، ز؛ حسینی، ر؛ اصغری، ب. ۱۳۹۵. بررسی تاثیر نانوذرات روی و کبالت بر بیان ژن های DAT، STR و D4H در سوسپانسیون سلولی گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*). مجله سلول بافت، جلد ۷، شماره ۴.
۱۲. کافی، م، برزوئی، ا، صالحی، م، کمندی، ع، معصومی، ع، نباتی، ج. ۱۳۸۸. فیزیولوژی تنش های محیطی در گیاهان. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. شماره ۳۹۴، ۵۰۲ ص.
۱۳. کشفی بناب، ع. ۱۳۸۹. مزیت نسبی اقتصادی کشت و تجارت گیاهان دارویی در ایران و ارزش آن در بازارهای جهانی. بررسی های بازرگانی. دوره جدید ۸. شماره ۴۴، صفحه ۶۷-۷۸.
۱۴. معروفی، ا؛ لطفی، م؛ اسماعیلی، ا؛ دستان، د. ۱۳۹۸. بررسی بیان ژن های کلیدی بیوسنتز دیوسژنین در گیاهان دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) در پاسخ به سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران).
۱۵. شیخی، ش، ابراهیمی، ا، حیدری، پ، عامریان، م. ۱۳۹۹. بررسی اثر اپی براسینواستروئید بر بیوسنتز دایوسجنین در گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت شرایط تنش دمایی بالا. دانشکده کشاورزی. دانشگاه صنعتی شاهرود.

۱۶. یدالهی، ف. ساطعی، آ. قربانعلی، م. ل. ۱۳۹۰. اثر آلومینیوم بر رشد، مقدار پروتئین، کلروفیلها و

میزان تجمع آلومینیوم در جلبک (*Dunaliella salina* Teodoresco) فصلنامه پژوهش های

علوم گیاهی، ۶(۲): ۱۱-۱۷.

17. Abdallah, S. B., Aung, B., Amyot, L., Lalin, I., Lachâal, M., Karray-Bouraoui, N., & Hannoufa, A. (2016). Salt stress (NaCl) affects plant growth and branch pathways of carotenoid and flavonoid biosyntheses in *Solanum nigrum*. *Acta physiologiae plantarum*, 38(3), 72.
18. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126). Academic Press.
19. Akbari, G.A., Morteza E., Moaveni, P., Alahdadi, I., Bihamta, M.R. & Hasanloo, T., (2014). Pigments apparatus and anthocyanins reactions of borage to irrigation, methylalcohol and titanium dioxide. *International Journal of Biosciences*, 4: 192-208.
20. Al-Habori, M., & Raman, A. (1998). Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(4), 233-242.
21. Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z. U. R. (2019). Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 715-724.
22. Alscher, R.G., Erturk, N., Heat, S.L. 2002. Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plant. *J. Exp. Bot.* 153: 1331-1341.
23. Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2001). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20, 72-83.
24. Amini S, Maali-Amiri R, Mohammadi R, Kazemi-Shahandashti SS (2017). cDNA-AFLP analysis of transcripts induced in chickpea plants by TiO₂ nanoparticles during cold

25. Amiri, A., S.R. Parsa, M. Nezami, and A. Ganjeali. (2011). The effects of drought stress at different phenological stages on growth indices of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in greenhouse conditions. *Pulses Research* 1: 69-84. (In Persian).
26. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1): 112-121.
27. Arora, A., Sairam, R.K., Sriuastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82: 1227-1238.
28. Ashfaq, U. A., & Idrees, S. (2014). Medicinal plants against hepatitis C virus. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(11), 2941.
29. Asli S. and Neumann PM. (2009). Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant cell environ*, 32:577-584.
30. Babajani, A., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z. O., & Eslami, B. (2019). Differential growth, nutrition, physiology, and gene expression in *Melissa officinalis* mediated by zinc oxide and elemental selenium nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(24), 24430-24444.
31. Bach, T. J., & Rohmer, M. (Eds.). (2012). *Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: New concepts and experimental approaches*. Springer Science & Business Media.
32. Baeka, K. H., and D. Z. Skinner. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Sci.* 165: 1221-1227.
33. Bakalova, S., A. Nikolova and D. Nedeva. (2004). Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30: (1-2), 64-77.
34. Benveniste, P. (1986). Sterol biosynthesis. *Annual review of plant physiology*, 37(1): 275-308.
35. Blum, A. (2017). Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, cell & environment*, 40(1), 4-10.

36. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
37. Bresson, J., Vasseur, F., Dauzat, M., Koch, G., Granier, C., & Vile, D. (2015). Quantifying spatial heterogeneity of chlorophyll fluorescence during plant growth and in response to water stress. *Plant Methods*, 11(1), 1-15.
38. Chaudhary, S., Chaudhary, P. S., Chikara, S. K., Sharma, M. C., & Iriti, M. (2018). Review on fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and its important secondary metabolite diosgenin. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(1), 22-31.
39. Chaudhary, S., Chikara, S.K., Sharma, M.C., Chaudhary, A., Alam Syed, B., Chaudhary, P.S., Mehta, A., Patel, M., Ghosh, A. and Iriti, M. (2015). Elicitation of Diosgenin Production in *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) Seedlings by Methyl Jasmonate. *International journal of molecular sciences*, 16(12): 29889-29899
40. Chen X, Kanokporn T, Zeng Q, Wilkins TA, Wood AJ. (2002). Characterization of the V-H⁺ ATPase in the resurrection plant *Tortola ruralis*: accumulation and polysomal. *J Exp Bot*, 53: 367-372.
41. Chinnusamy, V., Zhu, J. K., & Sunkar, R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. In *Plant Stress Tolerance* (pp. 39-55). Humana Press.
42. Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
43. Clauw, P., Coppens, F., De Beuf, K., Dhondt, S., Van Daele, T., Maleux, K., ... & Inzé, D. (2015). Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 167(3), 800-816.
44. Darlington, C. D. & Wylie, A. P. (1955). *Chromosome atlas of flowering plants*. (2nd edn.). Allen, G. and Unwin, L. p 519, London, UK.
45. Delfinea, S., Loreto, F., Pinellia, P., Tognettia, R.A. (2005). Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and peppermint. *Agr. Ecosyst. Environ.* 106: 243-252.

46. Diener, A.C., Li, H., Zhou, W.-x., Whoriskey, W.J., Nes, W.D. and Fink, G.R. (2000). Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *The Plant Cell*, 12(6): 853-870.
47. Dieriga, D. A., M.C Grieve and M.C Shannon. (2003). Selection for salt tolerance in *lesquerella fendleri*. *Industrial Crops and Products* 17:15-22.
48. Dini, M. (2006). Scientific name of medicinal plants used in traditional medicine. Forest and Rangeland Research Institute Publication, Iran, 299-300.
49. Dionisio-Sese, M. L., & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1), 1-9.
50. Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2001). Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum*). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1101-1109.
51. Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839): 843-847.
52. Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993). Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell*, 5: 171–179.
53. Ebadollahi, R., Jafarirad, S., Kosari-Nasab, M., & Mahjouri, S. (2019). Effect of explant source, perlite nanoparticles and TiO₂/perlite nanocomposites on phytochemical composition of metabolites in callus cultures of *Hypericum perforatum*. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
54. Ebrahimibasabi, E., Ebrahimi, A., Momeni, M., & Amerian, M. (2020). Elevated expression of diosgenin-related genes and stimulation of the defense system in *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) by cold plasma treatment. *Scientia Horticulturae*, 271, 109494.
55. Edwards, P. A., & Ericsson, J. (1999). Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 157-185.
56. Eremina, M., Rozhon, W., & Poppenberger, B. (2016). Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 73(4), 797-810.

57. Feizi H, Moghaddam PR, Shahtahmassebi N, Fotovat A. (2012). Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germination and seedling growth. *Biological Trace Element Research*, 146:101-106.
58. Fujii, K. and Matsukawa, T. (1936). Saponins and sterols. 8. Saponin of *Dioscorea tokoro* Makino. *J pharm Soc Japan*, 56: 408-414.
59. Furry, A. (1955). *Les Cahiers de la Recherche Agronomique*. Soil Science.
60. Gao, J.C., Wang, H.X., Li, X.X. (2010). Relationship between soluble protein, MDA, and jujube (*Ziziphus mauritiana*) tree cold hardiness. *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*. 23: 18-20.
61. Gorelick, J. and Bernstein, N. (2014). Chapter Five - Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites. In L. S. Donald (Ed.), *Advances in*
62. Govil, J. N. and Singh, V. K. (2010). *Recent progress in medicinal plants*. vol 1. Studium Press. Texas.
63. Guo, X., Liu, D., & Chong, K. (2018). Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. *Journal of integrative plant biology*, 60(9), 745-756.
64. Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., ... & Pakuwal, U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(11), 4405-4409.
65. Gupta, S. M., Agarwal, A. N. K. U. R., Kumar, K. A. M. A. L., Arya, M. C., & Nasim, M. O. H. A. M. M. E. D. (2015). Physiochemical response of air purifying indoor plants under cold stress. *International Journal of Biochemistry*, 2(1), 1-7.
66. Gusta, L. V., D. B. Fowler and N. J. Tyler. (1982). Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In: *Plant cold hardiness and freezing stress mechanisms and crop implications*, Vol. 2, Li P.H. & Sakai A.(Eds.). Academic Press, New York, 23-40.
67. Hajhashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J., Djalovic, I., & Siddique, K. H. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in plant science*, 9, 1430.

68. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 2008; 26(1): 57-64.
69. Hanna, B., and J. C. Bischofa. (2004). Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobio*. 48: 8-21.
70. Han, J.-Y., In, J.-G., Kwon, Y.-S. and Choi, Y.-E. (2010). Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*. *Phytochemistry*, 71(1): 36-46.
71. Hans. J.; Bohnert and richad. G., 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants Elsevier science 14.89.97
72. Hasan, M., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X. Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z. Y. (2017). Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in plant science*, 8, 1492.
73. Hasanzadeh E, Rezazadeh SH, Shamsa SF, Dolatabadi R, Zarringhalam J (2010). Review on photochemistry and therapeutic properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). *Journal of Medicinal Plants* 2(34):1-18. [in Persian with English abstract]
74. Hawthorne J, Musante C, Sinha S K. and White J C. (2012). Accumulation and phytotoxicity of engineered nanoparticles to *Cucurbita Pepo*. *Inter. Journal of Phytoremediation*, 14: 429-442
75. Heath, R.L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*, 125: 189-198.
76. Heidarvand, L., & Amiri, R. M. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress?. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), 419-431.
77. Hepburn HA, Naylor REL, Stokes DT. (1986). Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness. *Ann Appl Biol* 108:164–165.
78. Hong, F., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z., Gu, F., Wu, C., Ma, Z., Zhou, J & Yang, P. (2005). Influences of nano-TiO₂ on the chloroplast aging of spinach under light, *Biol. Trace Elem. Res.* 104 (3): 249–260.
79. Hossain, Z., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Plant responses to nanoparticle stress. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26644-26653.

80. Hui-Ping, D., Chang-Juan, S., An-Zhi, W., Tuxi, Y., Wen-Qing, S. and, Bai-Li, F. (2012). Leaf senescence and photosynthesis in foxtail millet (*Setaria italica* L) varieties exposed to drought conditions. Australian Journal of Crop Science 6: 232-237.
81. Hu, Y., Jiang, Y., Han, X., Wang, H., Pan, J., & Yu, D. (2017). Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones. Journal of Experimental Botany, 68(6), 1361-1369.
82. Jasim, B., Thomas, R., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2017). Plant growth and diosgenin enhancement effect of silver nanoparticles in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Saudi Pharmaceutical Journal, 25(3), 443-447.
83. Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., & Gurel, E. (2018). Elicitation of secondary metabolites in callus cultures of Stevia rebaudiana Bertoni grown under ZnO and CuO nanoparticles stress. Sugar Tech, 20(2), 194-201.
84. Joanna Ciura, Magdalena Szeliga and Tyrka, M. (2015). Optimization of in vitro culture conditions for accumulation of diosgenin by fenugreek. Medicinal Plants Studies, 3(3): 22-25.
85. Jones H.G, Jones M.B. (1989). Introduction: some terminology and common mechanisms, in: H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (Eds.), Plants Under Stress, Cambridge university Press, Cambridge, pp. 1–10.
86. Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., ... & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. Acta physiologiae plantarum, 38(4), 102.
87. Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., ... & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. Acta physiologiae plantarum, 38(4), 102.
88. Kamalizadeh M, Bihamta M R, Peyghambari SA, Hadian J. (2014). Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Dragonhead Affected by Nanoparticles. J. G3M. 12(1).

89. Kareem A., Mohamed E., Kalidoss R., Alawadhi H., Elnaggar A., Sylvie Wartanian, Emy Ibrahim and Hala Hani. (2018). Copper Nanoparticles Induced Genotoxicity, Oxidative Stress, and Changes in Superoxide Dismutase (SOD) Gene Expression in Cucumber (*Cucumis sativus*). *Plants*.
90. Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
91. Khalid, K.A., da Silva, J.A.T., Cai, W. (2010). Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of *Pelargonium odoratissimum* (L.). *Sci. Hort.* 125:159-166.
92. Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13772-13799.
93. Khan, N., Bano, A., & Zandi, P. (2018). Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root growth of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in drought tolerance. *Journal of plant interactions*, 13(1), 239-247.
94. Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Nedosekin, D. A., Dervishi, E., Biris, A. S., Shashkov, E. V., ... & Zharov, V. P. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1028-1033.
95. Kiss, F., Deak, G. Feher, M. Balogh, A. Szabolsci, L. and Pais, I. (1985). The effect of titanium and gallium in photosynthetic rate of algae. *Journal of Plant Nutrition* 8: 825-832.
96. Kohan-Baghkheirati, E., & Geisler-Lee, J. (2015). Gene expression, protein function and pathways of *Arabidopsis thaliana* responding to silver nanoparticles in comparison to silver ions, cold, salt, drought, and heat. *Nanomaterials*, 5(2), 436-467.

97. Król, A., Amarowicz, R., & Weidner, S. (2015). The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *Journal of plant physiology*, 189, 97-104.
98. Lata, C., Jha, S., Sreenivasulu, N. and Prasad, M. (2011). Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars. *Protoplasma* 248: 817-828
99. Larue, C., Laurette, Herlin-Boime, J.N. Khodja, H. Fayard, Flank, B.A.M., Brisset, F & Carriere, M. (2012). Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum*): Influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment*, 431:197-208.
100. Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G. and Last, R.L. (1993). Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. *Plant Cell*, 5: 171–179.
101. Li, S., Yang, W., Yang, T., Chen, Y., & Ni, W. (2015). Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi*—a cadmium accumulating plant. *International Journal of Phytoremediation*, 17(1), 85-92.
102. Liu, C. T., Wang, W., Mao, B. G., & Chu, C. C. (2018). Cold stress tolerance in rice: physiological changes, molecular mechanism, and future prospects. *Yi chuan= Hereditas*, 40(3), 171-185.
103. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
104. Lu C.M., Zhang C.Y., Wu J.Q. and 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.
105. Lu, M., Zhang, C., Wen, Q., Wu, R. and Tao, X. (2001) Effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Science* 21: 68–172
106. Lusia, J., Uelas, J. P., Alessio, G.A., Estiarte, M. (2006). Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic

compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. *Physiol. Plantarum*. 127: 632-649.

107. Mahjouri, S., Movafeghi, A., Divband, B., & Kosari-Nasab, M. (2018). Toxicity impacts of chemically and biologically synthesized CuO nanoparticles on cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 135(2), 223-234.
108. Macwan, D.P., Dave, P.N. and Chaturvedi, S. (2011). A review on nano-TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. *Journal of Materials Science*, 46(11), pp.3669-3686.
109. Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*, 2013.
110. Marstin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in plant science*, 8, 832.
111. Martínez-Sánchez F., Gimenez J. L., Martínez-Canadas M. A., Pastor J. J. and Alcaraz C. F. (1990). Micronutrient composition in several portions of *Capsicum* plants and their relation with red fruit color. *Acta Aliment*, 19:177-185.
112. Mehrafarin, A., Qaderi, A., Rezazadeh, S., Naghdi Badi, H., Noormohammadi, G. and Zand, E. (2010). Bioengineering of important secondary metabolites and metabolic pathways in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 3(35): 1-18.
113. Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.
114. Miura, K., & Furumoto, T. (2013). Cold signaling and cold response in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5312-5337.
115. Moaveni, P., Lotfi, M., Aliabadi Farahani, H. and 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(4): 63-67.
116. Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F., Hashempour, H. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil

constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 129, 561-574.

117. Mohammadi, M., Mashayekh, T., Rashidi-Monfared, S., Ebrahimi, A. & Abedini, D. (2019). New insights into diosgenin biosynthesis pathway and its regulation in *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytochemical Analysis*, 31 (2), 1-13.
118. Mohammadi, R., Maali-Amiri, R., & Abbasi, A. (2013). Effect of TiO₂ nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biological trace element research*, 152(3), 403-410.
119. M
oieni-Korbekandi, Z., Karimzadeh, G., & Sharifi, M. (2014). Cold-Induced Changes of Proline, Malondialdehyde and cChlorophyll in Spring Canola Cultivars. *J. Plant Physiol. Breed*, 4, 1-11.
120. Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A., & Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), 2753-2759.
121. Mosavat, N., Golkar, P., Yousefifard, M., & Javed, R. (2019). Modulation of callus growth and secondary metabolites in different *Thymus* species and *Zataria multiflora* micropropagated under ZnO nanoparticles stress. *Biotechnology and applied biochemistry*, 66(3), 316-322.
122. Munne-Bosch, S., Penuelas, J. (2004). Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Sci.* 166: 1105-10.
123. Munns, R., Passioura, J. B., Colmer, T. D., & Byrt, C. S. (2020). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytologist*, 225(3), 1091-1096.
124. Najafpour Navaei, M. (1994). Regarding Fenugreek. *Research Institute of Forest and Rangelands*, 6, 3-11. (In Farsi)
125. Nasrollahi, V., Mirzaie-asl, A., Piri, K., Nazeri, S., & Mehrabi, R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the

biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*).
Phytochemistry, 103, 32-37.

126. Nes, W.D., McCourt, B.S., Marshall, J.A., Ma, J., Dennis, A.L., Lopez, M., Li, H. and He, L. (1999). Site-Directed Mutagenesis of the Sterol Methyl Transferase Active Site from *Saccharomyces cerevisiae* Results in Formation of Novel 24-Ethyl Sterols. *The Journal of organic chemistry*, 64(5): 1535-1542.
127. Oksman Caldentey, K.M. and Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9): 433-440.
128. Oluwaseun, A. C., & Sarin, N. B. (2017). Impacts of biogenic nanoparticle on the biological control of plant pathogens. *Pollut Res*, 24(15), 13700-13709.
129. Ozkur, O., Ozdemir, F., Bor, M. and Turkan, I. (2009). Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf to drought. *Environ. Exp. Bot.* 66: 487-492.
130. Pais, I., (1983). The biological importance of titanium. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 3-131.
131. Parsa, M. & Zeinali, A. (2016). Effects of salicylic acid elicitor on the production of tropane alkaloids (atropine and scopolamine) in hairy roots and in vitro roots cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Scientific Journal Management System*, 32(4), 655-666.
132. Patel, H. and Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in Plant Tissue Culture. *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2: 60-65.
133. P
etropoulos, G. A. (Ed.). (2002). *Fenugreek: the genus Trigonella*. CRC Press.
134. Rahman, A. (2013). Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiologia plantarum*, 147(1), 28-35.
135. Rai, P. K., Kumar, V., Lee, S., Raza, N., Kim, K. H., Ok, Y. S., & Tsang, D. C. (2018). Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture. *Environment international*, 119, 1-19.

136. R
aju, J., & Mehta, R. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutrition and cancer*, 61(1), 27-35.
137. Ramanjulu, S., Bartels, D. (2002). Drought and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* 25: 141-151.
138. Ranieri, A., Castagna, A., & Soldatini, G. F. (2000). Differential stimulation of ascorbate peroxidase isoforms by ozone exposure in sunflower plants. *Journal of Plant Physiology*, 156(2), 266-271.
139. Rao, R.S. and Ravishankar, G.A. (2002). Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol*, 20: 101-153.
140. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H. M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review. *Frontiers in chemistry*, 5, 78.
141. Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24.
142. Saeed, S., Ali, H., Khan, T., Kayani, W. and Khan, M.A. (2017). Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* Wall ex Benth., a high valued endangered medicinal plant. *Physiology and molecular biology of plants*, 23(1), pp.229-237.
143. Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W., & Singh, N. B. (2011). Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Current genomics*, 12(1), 30.
144. Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P. and Schaller, H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2; 1. *The Plant Journal*, 25(6): 605-615.
145. Schaller, H., Bouvier-Navé, P. and Benveniste, P. (1998). Overexpression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a sterol-C241-methyltransferase in tobacco modifies the ratio of 24-methyl cholesterol to sitosterol and is associated with growth reduction. *Plant physiology*, 118(2): 461-469.

146. Senior JH. Nanoparticulate drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2008; 34(1):116.
147. Shah, S. H., Houborg, R., & McCabe, M. F. (2017). Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 7(3), 61.
148. Sharma, D. K., Andersen, S. B., Ottosen, C. O., & Rosenqvist, E. (2015). Wheat cultivars selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. *Physiologia plantarum*, 153(2), 284-298.
149. S heikhlar, A. (2013). *Trigonella foenum-graecum* L.(fenugreek) as a medicinal herb in animals growth and health. *Science International*, 1(6), 194-198.
150. Shilpi, M., and T. Narendra. (2005). Cold, Salinity and drought stresses: An overview. *Archives Biochem Biophys* 444: 139-158
151. Signorelli, S., Tarkowski, Ł. P., Van den Ende, W., & Bassham, D. C. (2019). Linking autophagy to abiotic and biotic stress responses. *Trends in plant science*, 24(5), 413-430.
152. Silva, E. N., Ferreira-Silva, S. L., Fontenete, A. V. Ribeiro, R. V., Viegas, R. A. and Silveira, J. A. (2010). Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolate and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology* 167: 1157-1164.
153. Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., & Singh, S. C. (2015). Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity. *Int J Pharm Sci Invent*, 4(8), 25-40.
154. Singh, D., Kumar, S., Singh, S. C., Lal, B. & Singh, N. B. (2012). Applications of liquid assisted pulsed laser ablation synthesized TiO₂ nanoparticles on germination, growth and biochemical parameters of *Brassica oleracea* var. Capitata. *Science of Advanced Materials*, 4(3-4), 522-531

155. Singh-Gill, S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
156. Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., Masia, A. (2004). Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive tree in response to drought stress. *Physiol. Plantarum* 121: 56-58.
157. Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondealdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Sciences*, 166 (2): 293-302.
158. Sonawane, P.D., Pollier, J., Panda, S., Szymanski, J., Massalha, H., Yona, M., Unger, T., Malitsky, S., Arendt, P. and Pauwels, L. (2017). Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism. *Nature plants*, 3(1): 16205.
159. Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., ... & Colbeck, I. (2016). Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *The Plant Journal*, 85(2), 245-257.
160. Su
bramanian, P., Kim, K., Krishnamoorthy, R., Mageswari, A., Selvakumar, G., & Sa, T. (2016). Cold stress tolerance in psychrotolerant soil bacteria and their conferred chilling resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) under low temperatures. *PloS one*, 11(8), e0161592.
161. Thakur, P., & Nayyar, H. (2013). Facing the cold stress by plants in the changing environment: sensing, signaling, and defending mechanisms. In *Plant Acclimation to Environmental Stress* (pp. 29-69). Springer, New York, NY.
162. Thomashow, M. F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1-8
163. Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant and drought-sensitive subjected to polyethyleneglycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-231

164. Uemura, M., and S. Yoshida. (1986). Studies on freezing injury in plant cells. *Plant Physiol.* 80: 187-195.
165. Upadhyay, S., Phukan, U.J., Mishra, S. and Shukla, R.K. (2014). De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal saponin biosynthesis in *Asparagus racemosus*. *BMC genomics*, 15(1): 746.
166. Wink, M., Alfermann, A.W., Franke, R., Wetterauer, B., Distl, M., Windhovel, J., Krohn, O., Fuss, E., Garden, H., Mohagheghzaden, A., Wildi, E. and Ripplinger, P. (2005). Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents. *Plant Genetic Resour*, 3: 90-100.
167. Xu, G., Yang, S., Meng, L., & Wang, B. G. (2018). The plant hormone abscisic acid regulates the growth and metabolism of endophytic fungus *Aspergillus nidulans*. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
168. Yadav, U. C., Moorthy, K. & Baquer, N. Z. (2004). Effects of sodium-orthovanadate and *Trigonella foenum-graecum* seed on hepatic and renal lipogenic enzymes and lipid profile during alloxan diabetes. *Journal of Biosciences*, 29, 81-91.
169. Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development*, 30(3), 515-527.
170. Yang, F. and Hong, S. (2006). Influence of nano anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research* 110:179-190.
171. Ye, Y., Wang, R., Jin, L., Shen, J., Li, X., Yang, T., Zhou, M., Yang, Z. and Chen, Y. (2014). Molecular cloning and differential expression analysis of a squalene synthase gene from *Dioscorea zingiberensis*, an important pharmaceutical plant. *Molecular biology reports*, 41(9): 6097-6104.
172. Yuan, P., Yang, T., & Poovaiah, B. W. (2018). Calcium signaling-mediated plant response to cold stress. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3896.
173. Zainuren, N. F., Ibrahim, M. H., Abdullah, C. A. C., & Najihah, T. S. (2019). Growth, carbon assimilation and quality of kesum (*Persicaria minor*) as exposed to zinc oxide nanoparticles. *Annual Research & Review in Biology*, 1-15.

174. Zhang, J., & Zhu, W. (2012). Effects of chilling stress on contents of chlorophyll and malondialdehyde in tomato seedlings. *Acta Agriculturae Shanghai*, 28(3), 74-77.
175. Zheng, L., Mingyu, S., Chao, L., Liang, C., Huang, H., Xiao, W., Xiaoqing, L., Yang, F., Gao, F. and Hong, F. (2007). Effects of nanoanatase TiO₂ on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. *Biological Trace Element Research* 119:68–76.
176. Zhou, R., Wu, Z., Wang, X., Rosenqvist, E., Wang, Y., Zhao, T., & Ottosen, C. O. (2018). Evaluation of temperature stress tolerance in cultivated and wild tomatoes using photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59(4), 499-509.
177. Zhoua, L.G. and Wu, J.U. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Nat Prod Rep*, 23: 789–810.
178. Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324.
179. Zolfaghari, F., Rashidi-Monfared, S., Moieni, A., Abedini, D., & Ebrahimi, A. (2020). Improving diosgenin production and its biosynthesis in *Trigonella foenum-graecum* L. hairy root cultures. *Industrial Crops and Products*, 145, 112075.
180. Zuardi, A. W. (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28(2), 153-157.

Abstract

Cold stress is one of the important abiotic stresses, which has endangered the production of agricultural products. Understanding the response of plants to cold stress increases human knowledge about the mechanisms of increasing tolerance in plants and the development of resistant cultivars. The aim of this study was to investigate the effect of titanium dioxide nanoparticle on tolerance induction in fenugreek under cold stress and to evaluate the expression profile of some genes involved in the biosynthesis pathway of diosgenin. Treatments in this experiment included temperature (23 and 10°C), different harvest times (6, 24 and 48 hours) and different levels of titanium dioxide nanoparticle (0, 2, 5 and 10 ppm). The results of this study showed that cold stress leads to degradation and decomposition of chlorophyll and carotenoid content. In addition, under cold stress, the activity of antioxidant enzymes such as catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase was increased. Under cold stress, the percentage of electrolyte leakage and malondialdehyde content due to cell membrane vulnerability and oxidation of fatty acids was increased significantly compared to normal temperature as well. The expression of *SEP*, *SQS*, *CAS* and *SSR* genes under low temperature stress and titanium dioxide nanoparticle treatment was up-regulated by 11, 33, 21 and 16 times, respectively, compared to normal temperature (no application of titanium dioxide nanoparticles). In addition, for most physiological traits, concentration of 2 ppm and harvest time of 48 hours had the greatest effect, while in gene expression, concentrations of 5 and 10 and harvest times of 24 and 48 stimulated gene expressions more effectively. Overall, the results of this study revealed that the application of titanium dioxide could effectively stimulate the biosynthesis of primary and secondary metabolites and thus induce tolerance to cold stress in fenugreek. In addition, the results of the present study might be applied in the metabolic engineering of diosgenin in fenugreek.

Keywords: Cold stress, Fenugreek, Titanium dioxide, Antioxidant enzymes, Gene expression and Diosgenin biosynthesis



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis Plant biotechnology

The effects of TiO₂ nanoparticles on physiological and molecular properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under cold stress

By: Mohamad Javad Babaei

Supervisors:

Dr. Parviz Heidari

Dr. Amin Ebrahimi

October 2020