

بررسی تغییرات برخی عوامل رشد گیاهچه‌های توتون (*Nicotiana tabacum*) در شرایط تنش خشکی با استفاده از نانوکلات پتاسیم

اکبر نورسته‌نیا* و سمرقند واله

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

استفاده از کودهای نانو کلاته به جای کودهای مرسوم باعث می‌شود که عناصر غذایی کود به تدریج و به صورت کنترل شده در تمام طول فصل رشد گیاه در خاک آزاد شوند. تنش خشکی یکی از تنش‌هایی است که موجب کاهش عملکرد در مزارع توتون می‌شود. کودهای پتاسیم‌دار نقش مهمی در ارتقای کیفیت توتون دارند و با توجه به نقش‌های مهمی که عنصر پتاسیم در گیاهان بر عهده دارد، در شرایط تنش خشکی میزان بالای این عنصر در گیاه آثار منفی ناشی از تنش را کاهش می‌دهد. در تحقیق حاضر، تنش خشکی توسط پلی اتیلن گلیکول با غلظت ۲۰ درصد اعمال شد. ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش، تیمار با نانوکلات پتاسیم در سه غلظت، طی ۹ روز انجام گرفت. تغییرات مقدار پرولین، پروتئین کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی، مالون‌دی‌آلدهید، فنل و محتوای داخلی پتاسیم برگ اندازه‌گیری و نتایج از طریق نرم‌افزار آماری SPSS محاسبه و گزارش شد. نتایج به دست آمده نشان داد که افزایش دوره تیماردهی توسط نانوکلات پتاسیم و استفاده از غلظت‌های بالاتر آن موجب بهبود آثار مخرب ناشی از تنش خشکی در برخی از شاخص‌های اندازه‌گیری شده در برگ گیاه توتون شد. استفاده از نانوکلات پتاسیم مقادیر پرولین، مالون‌دی‌آلدهید و فنل که از نشانه‌های وجود تنش خشکی هستند را کاهش داد. همچنین، باعث افزایش سنتز پروتئین، کاروتنوئیدها و کلروفیل‌ها شد. در نتیجه، نانوکلات پتاسیم می‌تواند تأثیرات مخرب ناشی از تنش خشکی را در زمانی کوتاه‌تر کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین کل، پرولین، پلی اتیلن گلیکول، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنل، مالون‌دی‌آلدهید، نانوکلات

پتاسیم

مقدمه

زراعی و یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در محصول توتون در اغلب نقاط جهان به ویژه مناطق خشک و نیمه‌خشک شناخته شده است (Ranjbar et

خشکی از جمله تنش‌های فیزیکی است که به عنوان

مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد و تولید گیاهان

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: morasteh@guilan.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۳۳۳۳۳۳۶۴۷

مشاهده شده است (Delauney and Verma, 1993). این افزایش غلظت، یک سازوکار مولکولی مقاومت به تنش به شمار می‌رود و در بیشتر گونه‌ها ذخیره پرولین به عنوان معیار سنجش تحمل تنش به حساب می‌آید که البته این موضوع وابسته به گونه است. تغییر در الگوی بیان پروتئین‌ها نیز یکی از پاسخ‌های متابولیک گیاه در تنش‌های محیطی است که از لحاظ کیفی و کمی با پروتئین‌هایی که در غیاب تنش بیان می‌شوند، متفاوت هستند (Feller, 2004). همچنین، پژوهش‌ها نشان می‌دهد که با شدت یافتن تنش خشکی، به تدریج فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه کاهش یافته، سطح مالون‌دی‌آلدهید در سلول افزایش می‌یابد. این امر به ذخیره H_2O_2 در سلول و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی منجر می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا موجب تخریب فراساختارهای فتوسنتزی و تنفسی می‌شود و این موضوع به عنوان یک عامل فیزیولوژیک در جهت کاهش عملکرد گیاهان در طی تنش خشکی به شمار می‌آید (Li-Ping *et al.*, 2006).

تغذیه مناسب گیاهان در کاهش اثر تنش‌های غیرزیستی، از جمله تنش خشکی مفید است (Efeoğlu *et al.*, 2009). از طرفی، تخلیه شدید عناصر غذایی و مواد آلی خاک به دلیل مدیریت نادرست و کشاورزی متراکم از عوامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان محسوب می‌شود. پتاسیم یکی از عناصر مهم در متابولیسم گیاه است که بیشتر نقش کاتالیزوری دارد و کمبود آن، مقاومت گیاه را در برابر آفات و بیماری‌ها کاهش می‌دهد (Zheng *et al.*, 2008). گیاهانی که کمبود پتاسیم در آنها مشاهده می‌شود، از شادابی کمتری برخوردار هستند و در شرایط کم‌آبی به سهولت پژمرده می‌شوند. در این گیاهان به علت کاهش پتانسیل

(*al.*, 2009). تنش خشکی توسط عوامل محدودکننده روزنه‌ای و غیر روزنه‌ای فتوسنتز را کاهش می‌دهد. از عوامل محدودکننده غیر روزنه‌ای می‌توان به کاهش یا توقف سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها اشاره کرد (Oliviera-Neto *et al.*, 2009). افزون بر این، تنش خشکی می‌تواند باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شود که می‌تواند نقش ویژه‌ای در تخریب سیستم فتوسنتزی، تخریب غشای سلولی و کلروپلاستی، کاهش مقدار رنگدانه‌های کلروفیل‌های a و b و متعاقب آن، کاهش توانایی فتوسنتز ایفا کند (Uma *et al.*, 2010). در این راستا، گیاهان قادرند با تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها از ساختارهای سلولی خود در برابر رادیکال‌های فعال تولید شده در شرایط تنش محافظت کنند (Bettaieb *et al.*, 2012). همچنین، از آنجا که ترکیبات فنلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند و در دفاع علیه گونه‌های اکسیژن فعال در زمانی که فتوسنتز به علت تنش‌های محیطی آسیب دیده است، شرکت می‌کنند (Neffati *et al.*, 2010)؛ بنابراین، افزایش ترکیبات فنلی طی دوره تنش خشکی دور از انتظار نیست (Masoudian *et al.*, 2014). پرولین یکی از عوامل عمده مقابله با تنش است و علاوه بر نقش جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد، به عنوان یک اسمولیت نیز عمل می‌کند (Jaleel *et al.*, 2008). پرولین در تعدیل فشار اسمزی سلول تحت تنش‌هایی نظیر: دمای پایین، کمبود مواد غذایی، قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین و اسیدیته بالا نیز نقش اساسی دارد. افزایش این ماده در شرایط تنش اسمزی، علاوه بر گیاهان، در دامنه وسیعی از موجودات دیگر مثل: باکتری‌ها، مخمرها، بی‌مهرگان دریایی و جلبک‌ها نیز

(Murugesu Boopathi, 2009). بر این اساس، به منظور افزایش جذب آهن، پژوهش‌های متعددی با استفاده از نانوذرات TiO_2 و SiO_2 در افزایش توانایی جذب و آب و کود در سویا (Lu *et al.*, 2002)، نانوذرات نقره در افزایش درصد جوانه‌زنی در گندم (Salehi and Tamaskoni, 2008)، نانوذرات اکسید آهن (Mazaherinia *et al.*, 2010)، نانوذرات TiO_2 در افزایش عملکرد ذرت (Moaveni and Kheiri, 2011) و نانوکلات‌های کلسیم و پتاسیم در افزایش عملکرد دانه و برخی عوامل رویشی در ریحان (Ghahremani *et al.*, 2014) در سال‌های اخیر انجام شده است که همگی بر تأثیر مثبت استفاده از کودهای نانودر عملکرد گیاهان اشاره دارند. یکی از معضلات اصلی کشت توتون در ایران، بالا بودن نیاز آبی این گیاه در طول دوره رشد است. تعیین تحمل نسبی به خشکی در توتون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ بنابراین، با ارایه راهکارهای مناسب جهت افزایش مقاومت این گیاه به خشکی، با اطمینان بیشتری می‌توان آن را در مناطق خشک و نیمه‌خشک کاشت و از آنجا که بیشترین مناطق کشت توتون در ایران دچار معضل خشکی هستند، یافتن راه حل مناسب برای افزایش مقاومت توتون به خشکی ضروری است. علاوه بر بعد تجاری و صنعتی استفاده از توتون در دنیا، امروزه این گیاه به عنوان پدیده جدیدی در صنعت گیاهان دارویی به دنیا معرفی شده است. توالی‌یابی ژنی و دستکاری بیان ژن‌های مختلف در این گیاه جهت افزایش تحمل آن به خشکی و مقابله با پاتوژن‌ها یا استفاده از نیکوتین برای درمان برخی بیماری‌ها مثل پارکینسون به خوبی گویای اهمیت دارویی توتون در دنیا است. با وجود اهمیت

اسمزی ناشی از کمبود پتاسیم، مقاومت به خشکی ضعیف بوده، حساسیت بیشتری نسبت به شوری، آسیب به سرما و حمله بیماری‌های قارچی مشاهده می‌شود (Cakmak, 2005). با توجه به نقش عنصر پتاسیم در گیاه، وجود مقدار کافی این عنصر در شرایط تنش کم آبی در تنظیم سازگاری به این تنش مؤثر است. از سوی دیگر، به دلیل تأثیرات مضر که کودهای شیمیایی در محیط زیست و کیفیت غذا ایجاد می‌کنند، مدت‌هاست که استفاده از آنها توصیه نمی‌شود (Naderi and Abedi, 2012). در نانوکودها به عنوان جایگزین کودهای مرسوم، عناصر غذایی کود به تدریج و به صورت کنترل شده در خاک آزاد می‌شوند؛ در نتیجه، از بروز پدیده مردابی شدن آب‌های ساکن و همچنین آلودگی آب آشامیدنی جلوگیری خواهد شد. در حقیقت، با بهره‌گیری از فناوری نانو در طراحی و ساخت نانوکودها، فرصت‌های جدیدی به منظور افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی و به حداقل رساندن هزینه‌های حفاظت از محیط زیست، پیش روی انسان گشوده شده است (Naderi and Abedi, 2012). تبدیل مواد به مقیاس نانو، ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و فعالیت‌های کاتالیزوری آنها را تغییر می‌دهد. علاوه بر انحلال‌پذیری بیشتر، فعالیت‌های شیمیایی و نفوذپذیری بیشتر در غشای سلولی نیز در این نانوذرات پدیدار می‌شود (Mazaherinia *et al.*, 2010). به این ترتیب، با بهره‌گیری از نانوکودها، عناصر غذایی به آرامی و با سرعت مناسب در تمام طول فصل رشد گیاه آزاد می‌شوند؛ بنابراین، به علت کاهش شدید آب‌شویی عناصر، گیاهان قادر به جذب بیشترین مقدار مواد غذایی خواهند بود (Chinnamuthu and

تنش خشکی در شرایط بهینه رشد داده شد تا به عنوان مبنایی برای مقایسه تغییرات حاصل از تنش مورد استفاده قرار گیرد. این نمونه‌ها به عنوان شاهد تنش ندیده یا "شاهد ۱" نامیده شدند و برداشت این نمونه‌ها همزمان با برداشت نمونه‌های "شاهد ۲" انجام شد. نمونه‌های شاهد ۲ نمونه‌های تنش دیده‌ای هستند که بلافاصله پس از حذف تنش خشکی برداشت شدند و به منظور تعیین آثار تنش اعمال شده بر مقادیر عوامل مورد بررسی و در مقایسه با نمونه‌های تنش ندیده در نظر گرفته شدند. پس از ۴۸ ساعت، با خارج کردن محلول هوگلند حاوی پلی اتیلن گلیکول و اضافه کردن محلول هوگلند فاقد پلی اتیلن گلیکول تنش خشکی حذف شد. گلدان‌های خارج شده از تنش، به چهار گروه تقسیم شدند. یک گروه از نمونه‌ها به عنوان شاهدی که پس از حذف تنش و تا زمان برداشت، تیمار نانوکلات پتاسیم را دریافت نکرده در نظر گرفته شده و "شاهد ۳" نامیده شد. سه گروه دیگر سه غلظت متفاوت از محلول‌های آبی ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی گرم در لیتر (ppm) نانوکلات پتاسیم را به طور جداگانه و همراه محلول هوگلند دریافت کردند. برداشت از هر یک از گروه‌های چهارگانه معرفی شده در بالا در پایان روزهای سوم، ششم و نهم صورت گرفت. نمونه‌های شاهد ۳ برای مقایسه پاسخ نمونه‌های تنش دیده‌ای که تیمار نانوکلات پتاسیم را دریافت نمی‌کنند، با پاسخ گیاهانی که تیمار نانوکلات پتاسیم را دریافت می‌کنند در نظر گرفته شده است. برگ‌ها به صورت تصادفی در فاصله میان گره‌های دوم و سوم چیده و درون فویل قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از منجمد شدن در ازت مایع، به فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد منتقل و تا زمان آنالیز نگهداری شدند.

اقتصادی و دارویی گیاه توتون و با توجه به اهمیت تکنولوژی نانو طی دهه گذشته، هدف از تحقیق حاضر، بررسی کارآیی استفاده از نانو کود پتاسیم به منظور بهبود مقاومت گیاه در شرایط تنش خشکی و جلوگیری از افت عملکرد این محصول پرکاربرد همراه با کاهش آلودگی زیست محیطی است.

مواد و روش‌ها

برای انجام پژوهش حاضر، از بذره‌های گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*)، رقم کوکر ۳۴۷ تهیه شده از مرکز تحقیقات دخانیات گیلان (ایران) استفاده شد. این رقم متعلق به توتون‌های درشت‌برگ تیپ غربی (ویرجینیا) است که از تلاقی بین کوکر ۳۱۹ و کوکر ۲۵۸ حاصل شده و یک رقم تجاری مناسب با شرایط آب و هوایی استان‌های شمال کشور است.

بذور توتون در پتری‌دیش‌های اتوکلاو شده و روی دو لایه کاغذ واتمن شماره ۲ گذاشته و در ۴ روز اول توسط آب مقطر آبیاری شدند. از روز پنجم آبیاری با محلول هوگلند صورت گرفت. دو هفته پس از کاشت بذور توتون در پتری‌دیش‌ها، آنها را به گلدان‌هایی به قطر ۷ سانتی‌متر و ارتفاع ۸ سانتی‌متر انتقال داده و هر هفته محلول غذایی به منظور جلوگیری از نوسانات غلظت عناصر غذایی در محیط کشت و بافت گیاهی و همچنین تنظیم اسیدیته تعویض شد. ۴۰ روز بعد، گیاهچه‌های رشد یافته به گلدان‌های بزرگتر با قطر ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر انتقال یافته، به مدت ۵۰ روز در این گلدان‌ها توسط محلول هوگلند آبیاری شد. سپس، تنش خشکی توسط پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در غلظت ۲۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت اعمال شد.

یک گروه از نمونه‌ها به عنوان شاهد، بدون دریافت

جدول ۱- جدول معرفی نمونه‌های شاهد و تیمار یافته با نانوکلات پتاسیم و زمان برداشت آنها

مشخصات	نمونه‌های آزمایشی	شاهد ۱	شاهد ۲	شاهد ۳	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
اعمال تنش خشکی	-	۴۸ ساعت	۴۸ ساعت	۴۸ ساعت	۴۸ ساعت	۴۸ ساعت	۴۸ ساعت
نوع تیمار پس از اعمال تنش خشکی	-	-	-	محلول هوگلند	پتاسیم (۱۵ میلی‌گرم بر لیتر)	پتاسیم (۲۵ میلی‌گرم بر لیتر)	پتاسیم (۳۵ میلی‌گرم بر لیتر)
زمان برداشت نمونه‌ها	پیش از آغاز تنش	پس از پایان تنش	پس از پایان تنش	پس از ۹ روز پس از ۶، ۳ و ۹ روز پس از	پس از ۹ روز پس از ۶، ۳ و ۹ روز پس از	پس از ۹ روز پس از ۶، ۳ و ۹ روز پس از	پس از ۹ روز پس از ۶، ۳ و ۹ روز پس از

و با نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و رنگدانه‌های فتوسنتزی با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استخراج شدند. شدت جذب محلول به دست آمده در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل M501، شرکت CamSpec، چین) در مقابل شاهد ثبت شد. در نهایت، برای تعیین مقدار کلروفیل و همچنین کاروتنوئید کل از رابطه‌های ۱ و ۲ استفاده شد. در این روابط، V حجم استون به میلی‌لیتر و W وزن تر برگ بر حسب گرم است. غلظت کلروفیل و کاروتنوئید کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ است.

$$\text{Chl.a} = (12.25 A_{663} - 2.79 A_{646}) \times V/W \quad \text{Chl.b} = (21.50 A_{646} - 5.1 A_{663}) \times V/W \quad \text{رابطه ۱:}$$

$$\text{Chl.T} = \text{Chl.a} + \text{Chl.b} \quad \text{Car.} = (1000 A_{470} - 1.82 \text{Chl.a} - 85.02 \text{Chl.b})/198 \times V/W \quad \text{رابطه ۲:}$$

اندازه گیری فنل کل: سنجش مقدار فنل کل با روش Gao و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد که نیازمند استفاده از معرف فولین-سیوکالتیو و استاندارد گالیک اسید است. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده و غلظت فنل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد.

سنجش پتاسیم درون برگ: تعیین میزان یون پتاسیم با روش نشر شعله‌ای (AES) صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا جذب محلول‌های استاندارد تعیین و سپس طیف جذب محلول‌های پتاسیم در ۱۰ میلی‌لیتر

اندازه گیری پرولین: اندازه‌گیری پرولین مطابق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) با استفاده از معرف نین‌هیدرین انجام شد. از محلول استاندارد برای تعیین مقدار پرولین موجود در نمونه‌ها استفاده شد.

اندازه گیری پروتئین کل: برای اندازه‌گیری پروتئین کل از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. غلظت پروتئین موجود در نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد با کمک آلومین گاوی محاسبه شد.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئیدها: برای سنجش کلروفیل و کاروتنوئید ۰/۵ گرم برگ تر از هر تکرار توزین

اندازه گیری مالون‌دی‌آلدهید: اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید (MDA) با روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. سپس، جذب کمپلکس MDA+TBA در ۵۳۲ نانومتر ثبت شد. جذب سایر رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر گردید. برای محاسبه غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی $155 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ استفاده شد و در نهایت، مقدار مالون‌دی‌آلدهید که محصول واکنش پراکسیداسیون لیپیدهاست، بر اساس نانومول در گرم وزن تر محاسبه شد.

نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

پرولین: مقادیر پرولین در غلظت‌های ۲ و ۳ در برداشت اول و تمام غلظت‌های برداشت‌های دوم و سوم نسبت به شاهد ۲ کاهش معنی‌دار نشان داد. بیشترین کاهش مقدار پرولین در غلظت ۳ در برداشت دوم و سوم (میانگین ۶/۶۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک) نسبت به شاهد ۲ (میانگین ۱۹/۹۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد و کمترین کاهش مربوط به غلظت ۱ نانوکلات پتاسیم و شاهد ۳ در برداشت اول (میانگین ۱۵/۷۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) دیده شد (شکل ۱).

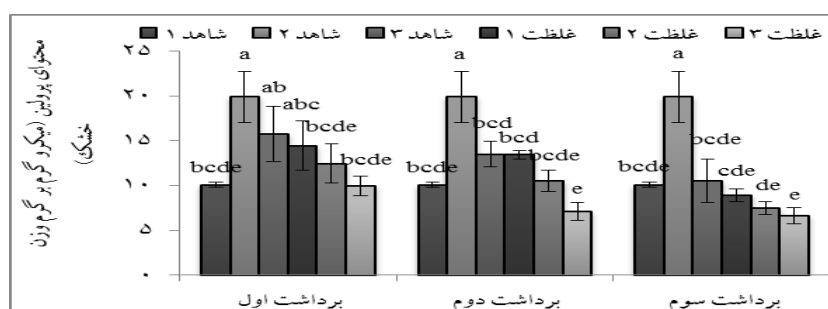
پروتئین: بیشترین مقادیر پروتئین نسبت به شاهد ۲، در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ با میانگین ۵۶/۵ میلی گرم بر گرم وزن تر در برداشت سوم و کمترین مقادیر پروتئین مربوط به تمام غلظت‌های برداشت اول و برداشت دوم و شاهد ۳ در برداشت سوم با میانگین ۳۵/۲۷ میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش شد (شکل ۲).

کلریدریک اسید مربوط به هر تیمار توسط دستگاه شعله‌سنجی (مدل 51-ca، شرکت Perkin Elmer، آمریکا) اندازه‌گیری شد، میزان یون پتاسیم مشخص شده در این روش، از میزان یون درون بافتی کسر شد تا میزان جذب یون پتاسیم توسط گیاه به دست آید. میزان جذب یون پتاسیم توسط بافت مورد مطالعه گیاه بر حسب میلی‌مول در کیلوگرم وزن خشک در ساعت از رابطه ۳ تعیین شد (Namjoo, 2003).

$$\text{رابطه ۳: } (a+b) \times \frac{1}{1000} \times \frac{v}{w} \times \frac{100}{D.M}$$

a: غلظت پتاسیم در نمونه رقیق شده بر حسب میلی گرم در لیتر، b: غلظت پتاسیم در شاهد بر حسب میلی گرم در لیتر، v: حجم عصاره حاصل از عمل هضم بر حسب میلی‌لیتر، w: وزن نمونه گیاه بر حسب گرم.

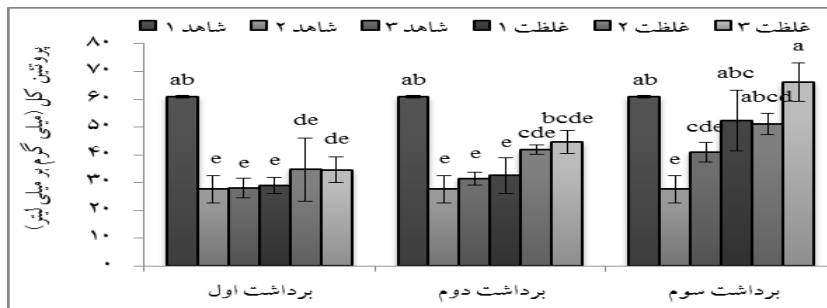
تحلیل آماری: برای بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. انحراف از میانگین داده‌ها به وسیله خطای استاندارد نشان داده شد. برای رسم نمودارها از



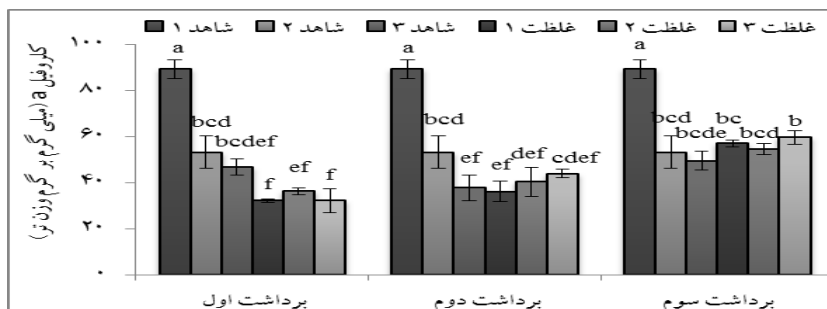
شکل ۱- میانگین تغییرات مقادیر پرولین در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش‌ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعت)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانوکلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوکلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانوکلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.

نمونه‌های تیمار دیده (غلظت ۳) و تیمار ندیده (شاهد ۳) ایجاد کند (شکل ۴)؛ در نتیجه، افزایش زمان تیماردهی و افزایش غلظت نانو کلات پتاسیم توانست مقدار کلروفیل کل را نسبت به شاهد ۳ افزایش دهد (شکل ۵). همچنین، بیشترین مقدار کاروتنوئید مربوط به تمام غلظت‌های برداشت‌های دوم، سوم و غلظت ۳ در برداشت اول بود و کمترین مقدار آن مربوط به غلظت‌های ۱ و ۲ نانو کلات پتاسیم و شاهد ۳ در برداشت اول است (شکل ۶).

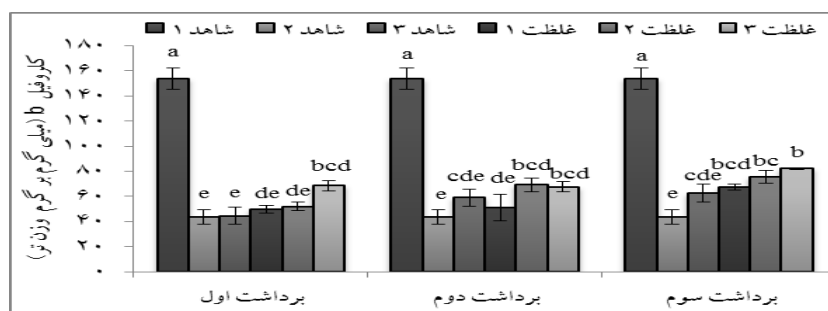
مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی: بر اساس نتایج به دست آمده، در برداشت اول و دوم کاهش مقادیر کلروفیل a در همه غلظت‌ها و مشابه با شاهد ۳ دیده شد. اما در برداشت سوم، این کاهش در مقادیر کلروفیل a تعدیل و به سطح شاهد ۱ نزدیک شد (شکل ۳). در مقابل، افزودن نانو کلات پتاسیم با غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر به محیط رشد گیاهچه‌ها توانست در همان برداشت اول تفاوت معنی داری بین مقادیر کلروفیل b در



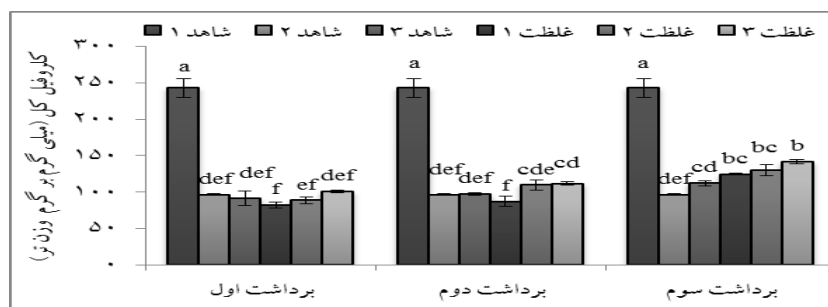
شکل ۲- میانگین تغییرات مقادیر پروتئین در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.



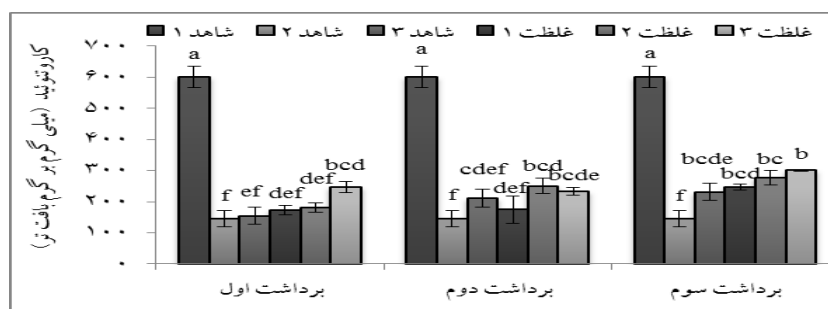
شکل ۳- میانگین تغییرات مقادیر کلروفیل b در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.



شکل ۴- میانگین تغییرات مقادیر کلروفیل b در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.



شکل ۵- میانگین تغییرات مقادیر کلروفیل کل در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.



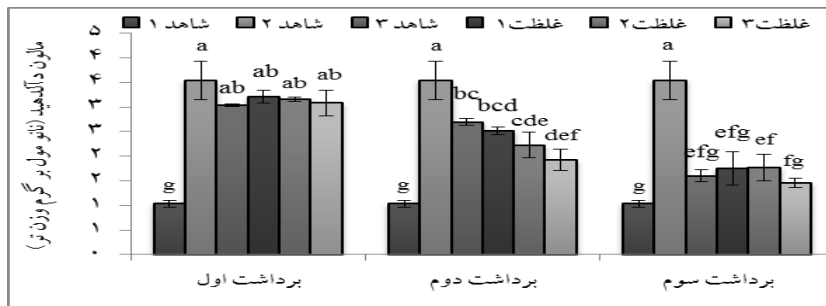
شکل ۶- میانگین تغییرات مقادیر کاروتنوئید در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.

مالون دی آلدئید نسبت به همه تیمارهای دیگر شد. در برداشت سوم، کاهش بیشتری در محتوای مالون دی آلدئید نسبت به سایر برداشت‌ها حاصل شد (شکل ۷).

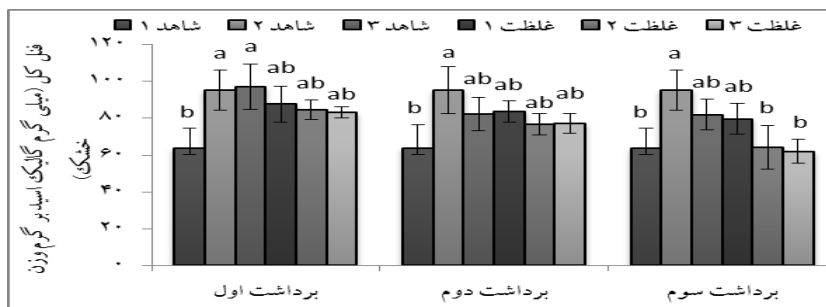
فنل کل: مقادیر شکل ۸ نشان می‌دهد که با افزایش دوره تیماردهی و افزایش غلظت نانو کلات پتاسیم، مقدار فنل کل در برداشت سوم در غلظت‌های ۲ و ۳ نسبت به شاهد ۲ و در مقایسه با سایر غلظت‌ها و دوره‌های تیماردهی کاهش معنی‌داری داشته است.

پراکسیداسیون لیپیدی: تغییر مقدار مالون دی آلدئید

در هر برداشت مطابق شکل ۷ متفاوت از مقادیر برداشت‌های دیگر بود. با اعمال تنش خشکی، محتوای مالون دی آلدئید در شاهد ۲ نسبت به شاهد ۱ افزایش چشمگیری یافت. در برداشت اول، تفاوت معنی‌داری در محتوای مالون دی آلدئید در هیچ یک از تیمارها نسبت به یکدیگر و نسبت به شاهد ۲ مشاهده نشد. اما در برداشت دوم، بالاترین غلظت پتاسیم موجب کاهش معنی‌دار



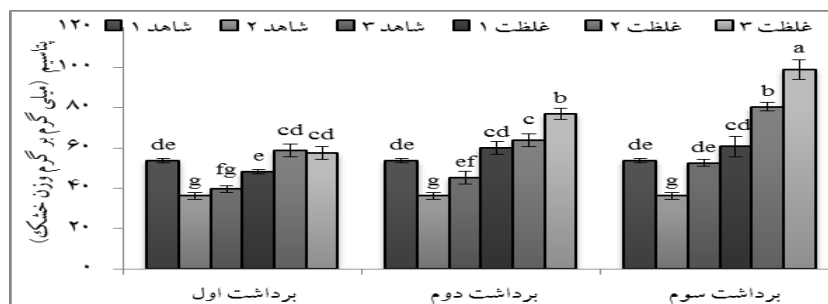
شکل ۷- میانگین تغییرات مقادیر مالون دی آلدئید در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.



شکل ۸- میانگین تغییرات مقادیر فنل کل در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هو گلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هو گلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانو کلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.

توسط محلول هوگلند تیماردهی شد، مقدار پتاسیم نسبت به شاهد ۲ تفاوت معنی داری نداشت. با افزایش دوره تیماردهی توسط نانوکلات پتاسیم در برداشت‌های دوم و سوم، در تغییر مقدار پتاسیم برگ نسبت به شاهد ۲ افزایش معنی داری مشاهده شد (شکل ۹).

پتاسیم درون برگ: در شکل ۹ مشاهده می‌شود که تنش خشکی باعث کاهش معنی دار مقدار پتاسیم برگ نسبت به نمونه پیش از اعمال تنش شده است. در برداشت اول، در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ نانوکلات پتاسیم افزایش معنی دار مقدار پتاسیم نسبت به نمونه تنش دیده مشاهده شد؛ در حالی که در شاهد ۳ که



شکل ۹- میانگین تغییرات مقادیر پتاسیم برگ در پاسخ به تنش خشکی در برداشت‌های اول، دوم و سوم مربوط به نمونه‌های شاهد ۱ (تنش ندیده)، شاهد ۲ (تنش خشکی ۴۸ ساعته)، شاهد ۳ (رشد در محیط هوگلند پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۱ (رشد در محیط هوگلند حاوی غلظت ۱۵ میلی گرم بر لیتر نانوکلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی)، غلظت ۲ (رشد در محیط هوگلند حاوی غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر نانوکلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی) و غلظت ۳ (رشد در محیط هوگلند حاوی غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر نانوکلات پتاسیم پس از اعمال تنش خشکی). داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی دار بر اساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال $P < 0.05$ است.

بحث

تنش است. در برداشت‌های دوم و سوم، زمان کافی برای کاستن از شدت تنش در اختیار گیاهچه است و سیستم دفاعی گیاهچه‌های شاهد ۳ توان کافی برای سازگاری با شرایط نامساعد محیطی را به دست آورد و سطح پرولین را نسبت به شاهد ۲ کاهش داد. تیمار با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ نانوکلات پتاسیم نیز تفاوت محسوسی ایجاد نکرد، به غیر از تیمار ۳ در برداشت دوم که بهتر عمل نمود. به نظر می‌رسد پرولین از طریق کاهش مقدار پتانسیل اسمزی به جذب بهتر آب کمک می‌کند و ریشه گیاه توانایی بالاتری برای جذب آب از خاک اطراف ریشه به دست می‌آورد (Sharma and Kuhad, 2006). همچنین، از جمله نقش‌های افزایش

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که در نمونه‌های تحت تنش خشکی، مقدار پرولین نسبت به نمونه‌های شاهد ۱ به شدت افزایش می‌یابد که این افزایش به منظور مقابله با تنش خشکی اتفاق می‌افتد. در برداشت اول، مقدار پرولین در این گیاهان با حذف تنش کاهش محسوسی پیدا نکرد و نزدیک به سطوح شاهد ۲ باقی ماند. افزایش نانوکلات پتاسیم در غلظت‌های ۱ و ۲ نیز کمک چندانی نکرد و همچنان مقادیر پرولین بدون کاهش معنی دار باقی ماند. اما استفاده از غلظت ۳ نانوکلات پتاسیم مقدار پرولین را به سطح شاهد ۱ برگرداند و این تغییر مؤید کاهش تأثیر

پروتئین مثل آمینو اسیدها و در نهایت، کاهش سنتز پروتئین است (Tambussi *et al.*, 2000). طبق شکل ۲، طی تنش خشکی نسبت به حالت پیش از تنش، در برگ‌های توتون کاهش معنی‌دار سطوح پروتئینی مشاهده می‌شود. از آنجا که بازه زمانی برداشت اول برای واکنش مناسب سیستم دفاعی گیاهچه‌های توتون کافی نبود، افزایش دوباره میزان پروتئین در هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد. با افزایش دوره تیماردهی و در برداشت‌های دوم و سوم، گیاهچه‌ها توانستند در همه غلظت‌های نانوکلات پتاسیم، سرعت سازگاری با شرایط حاصل از اعمال تنش را بهبود بخشیده، سطح سنتز پروتئین را به سطح اولیه آن نزدیک نمایند که علت افزایش آن احتمالاً نقش پتاسیم در تسریع انتقال مواد حاصل از فتوسنتز و در نتیجه سنتز پروتئین است (Azizi and Rashed Mohasel, 1998). افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در برداشت سوم تحت تأثیر طولانی شدن دوره تیماردهی با نانوکلات پتاسیم تأییدی بر این نتیجه‌گیری است. Wang و همکاران (۲۰۱۴) کاهش مقادیر پروتئین در گیاه توتون تحت تنش خشکی را با استفاده از پلی اتیلن گلايکول ۶۰۰۰ نشان دادند. Liu و همکاران (۲۰۱۴) نیز در کشت گلدانی گیاه توتون، با اعمال تنش خشکی از طریق کاهش ۳۰ درصدی رطوبت خاک، کاهش مقادیر پروتئین را گزارش دادند.

طی تنش خشکی، کاهش معنی‌داری در تمام رنگیزه‌های مربوط به نمونه‌های تحت تنش نسبت به شرایط پیش از تنش مشاهده شد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵)؛ این روند کاهش را می‌توان به القای تجزیه شدن رنگیزه‌ها یا مهار سنتز آنها در شرایط تنش نسبت داد

پروکلین در گیاه تحت شرایط تنش حذف رادیکال‌های آزاد و تنظیم فشار اسمزی است (Ma *et al.*, 2006). بنابراین، کاهش مقدار پروکلین با افزایش دوره تیماردهی و افزایش غلظت نانوکلات پتاسیم احتمالاً به این علت است که پتاسیم از یک طرف با افزایش سنتز آنزیم‌ها از تولید رادیکال آزاد جلوگیری می‌کند (Ma *et al.*, 2004) و از سوی دیگر، از طریق کمک به جذب بیشتر آب در گیاه به تنظیم فشار اسمزی منجر می‌شود (Kanai *et al.*, 2007) که در نتیجه این تغییرات نیازی به ادامه فعالیت پروکلین نبوده، مقدار آن کاهش می‌یابد. Yamchi و همکاران (۲۰۰۴) میزان پروکلین را در توتون طی ۵ روز تنش کم‌آبی اندازه‌گیری کردند و نتایج نشان داد که در مقایسه با گیاه شاهد با افزایش زمان تنش، میزان پروکلین در گیاه افزایش یافته است. Miller و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از توتون تراریخت، محتوای پروکلین این گیاه را با افزایش بیان بیش از حد ژن پروکلین و همچنین کاهش تخریب پروکلین با سرکوب ژن مورد نظر، افزایش دادند تا میزان مقاومت این گیاه به سطوح مختلف خشکی را در شرایط افزایش پروکلین با استفاده از این دو روش بررسی کنند. نتایج به دست آمده، کاهش تخریب‌های ناشی از تنش خشکی را در توتون تراریخت نسبت به تیپ وحشی این گیاه نشان داد. Nalousi و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که با افزایش مدت زمان تنش خشکی مقدار پروکلین در دو گونه چمن افزایش معنی‌داری داشته است. این نتایج همسو با نتایج حاصل در تحقیق حاضر است.

در شرایط تنش در گیاهان، سطوح پروتئین کاهش می‌یابد که علت آن افت شدید فرآیند فتوسنتز و متعاقب آن کاهش سنتز پیش‌ماده‌های تولیدکننده

(۱۹۸۷) نشان دادند که کاهش بیشتر مقدار کلروفیل a نسبت به کلروفیل b تحت تنش خشکی می‌تواند به دلیل حساسیت و تخریب بیشتر کلروفیل a باشد. مقایسه مقادیر کلروفیل کل و کاروتنوئید در غلظت‌های مختلف نانوکلات پتاسیم در برداشت سوم افزایش معنی‌دار این رنگیزه‌ها را در غلظت‌های مختلف نانوکلات پتاسیم نسبت به شرایط تنش نشان داد. افزایش این رنگیزه‌های فتوسنتزی احتمالاً به دلیل نقش پتاسیم در سنتز پیش‌ماده رنگدانه‌های کلروفیل است و افزایش محتوای نسبی کلروفیل در برگ‌ها تبدیل انرژی تابشی را به انرژی شیمیایی اولیه در شکل ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها بهبود می‌بخشد (Kumar Daneshmand and Kumar, 2008) (۲۰۱۳) کاهش کاروتنوئید و کلروفیل را طی تنش خشکی در گوجه‌فرنگی گزارش داد. همچنین، نتایج بررسی Gholizadeh و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان داد که طی تنش خشکی میزان کلروفیل در گیاه توتون کاهش یافته، با تیمار پتاسیم پس از تنش، میزان کلروفیل افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های Shikanai و همکاران (۱۹۹۸)، Liu و همکاران (۲۰۱۴) و Wang و همکاران (۲۰۱۴) روی گیاه توتون تحت تنش خشکی مطابقت داشت.

با طولانی‌تر شدن مدت تنش و افزایش میزان تولید ROSها در گیاه و کاهش قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی، فرآیندهای مخری مانند پراکسیداسیون لیپیدها و تجزیه پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها رخ می‌دهد. مطابق شکل ۶، نتایج تغییرات غلظت مالون‌دی‌آلدئید در برداشت اول با برداشت دوم و سوم متفاوت است. بر خلاف برداشت اول که در آن تغییرات غلظت مالون‌دی‌آلدئید

(Singh and Raja Reddy, 2011). کاهش رنگیزه‌ها با افزایش فرآیندهای فتواکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی همراه می‌شود. داده‌های حاصل از تغییرات پراکسیداسیون لیپیدی این موضوع را تأیید کرد، به طوری که روند افزایش مالون‌دی‌آلدئید پس از تنش خشکی نسبت به شرایط پیش از تنش مشاهده شد. طی تنش خشکی، مقادیر کلروفیل به دلیل کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی و بسته شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد. با آغاز تیماردهی توسط نانوکلات پتاسیم در برداشت اول، مقدار کلروفیل a در مقایسه با شرایط تنش کاهش معنی‌داری نشان داد. از آنجا که تنش خشکی به طور مستقیم یا غیرمستقیم فتوسیستم II را تحت تأثیر قرار می‌دهد و فتوسیستم II در مقایسه با سایر رنگیزه‌ها بیشتر حاوی کلروفیل a است، طبیعی است که طی تنش خشکی، کلروفیل a کاهش بیشتری داشته باشد (Lawlor and Cornic, 2002)؛ در نتیجه، عدم افزایش کلروفیل a، با شروع تیماردهی در برداشت اول، می‌تواند به علت کاهش بیشتر آن نسبت به سایر رنگیزه‌ها باشد. علت دیگر کاهش کلروفیل a تحت تنش خشکی می‌تواند ناشی از تخریب نوری کمپلکس پروتئینی رنگدانه‌های a و b (محافظت‌کننده دستگاه فتوسنتزی)، صدمه اکسیداتیو لیپیدهای کلروپلاست، رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها یا افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز باشد (Tambussi et al., 2000). در برداشت اول و با آغاز تیماردهی، مقدار کلروفیل a در تمام غلظت‌های نانوکلات پتاسیم نسبت به نمونه تنش‌دیده کاهش معنی‌داری نشان داد که علت آن می‌تواند نبود زمان کافی برای تأثیر پتاسیم بر جلوگیری از روند کاهش کلروفیل a باشد. Boyer و همکاران

در کلروپلاست گوجه‌فرنگی و انتقال آن به توتون باعث افزایش تحمل به خشکی در این گیاه شد، محتوای مالون‌دی‌آلدهید ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب غشای سلولی است، افزایش چشمگیری داشته است. آنها با تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بیان ژن‌های پاسخ به تنش، میزان تحمل گیاه توتون به خشکی را افزایش دادند و پس از اعمال تنش خشکی مشاهده شد که محتوای مالون‌دی‌آلدهید در تیپ وحشی نسبت به تیپ تراریخت افزایش داشته است.

در بسیاری از مطالعات انجام شده، مقادیر فنل طی تنش خشکی افزایش می‌یابد و طی نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر (شکل ۷)، طی اعمال تنش خشکی، افزایش مقادیر فنل نسبت به پیش از تنش خشکی مشاهده شد. با شروع تیماردهی از همان برداشت اول (روز سوم) کاهش معنی‌دار در مقادیر فنل کل در تمام غلظت‌های نانوکلات پتاسیم نسبت به شاهد ۲ مشاهده شد، به طوری که در برداشت سوم (روز نهم) کاهش قابل توجه مقادیر فنل رخ داد. یکی از معضلات تنش خشکی در گیاهان تجمع رادیکال‌های آزاد است. فنل با داشتن خاصیت پاک‌کنندگی، رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد و به همین دلیل است که در برخی گیاهان طی شرایط تنش، افزایش مقادیر فنل مشاهده می‌شود؛ البته مقدار ترکیبات فنلی در گیاهان تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله: ژنوتیپ گیاه، اقلیم، نوع خاک، مرحله نمو گیاه، نوع حلال و درجه قطبی بودن آن و شرایط تیمار متغیر است (Ksouri *et al.*, 2007). کاهش مقادیر فنل طی افزایش زمان تیماردهی و افزایش غلظت نانوکلات پتاسیم احتمالاً به دلیل نقش پتاسیم در افزایش فعالیت آنزیم هاست که به دنبال آن از تولید

طی تیمارهای مختلف با نانوکلات پتاسیم معنی‌دار نیست، در برداشت‌های دوم و سوم روند کاهشی در غلظت مالون‌دی‌آلدهید مشاهده می‌شود. بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدهید پس از تیماردهی نسبت به شاهد ۲ تنش مربوط به چهار غلظت نانوکلات پتاسیم در برداشت اول بود که احتمالاً به علت کوتاه بودن زمان تیماردهی، گیاه فرصت کافی برای رفع تأثیرات مخرب تنش را نداشته است. کمترین غلظت مالون‌دی‌آلدهید مربوط به چهار غلظت نانوکلات پتاسیم در برداشت سوم است. به طور کلی، در برداشت‌های دوم و سوم، کاهش معنی‌داری در غلظت مالون‌دی‌آلدهید نسبت به شاهد ۲ تنش مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده تأثیر مثبت تیمار نانوکلات پتاسیم است که با گذشت زمان از زمان آغاز تیماردهی، روند کاهشی بیشتر می‌شود. از آنجا که طی تنش، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد، با تجمع H_2O_2 و افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، محتوای مالون‌دی‌آلدهید در گیاه زیاد می‌شود (Li-Ping *et al.*, 2006)؛ با افزایش زمان تیماردهی توسط نانوکلات پتاسیم، محتوای مالون‌دی‌آلدهید کاهش می‌یابد که با توجه به نقش یون پتاسیم در افزایش فعالیت آنزیم‌ها (Azizi and Rashed, 1998) این کاهش را می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داد. بر اساس یافته‌های Liu و همکاران (۲۰۱۴)، مشاهده شد که طی تنش خشکی محتوای مالون‌دی‌آلدهید در توتون افزایش می‌یابد. همچنین Wang و همکاران (۲۰۱۴) دریافتند که طی تنش خشکی اعمال شده با پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در غلظت ۲۰ درصد در تیپ وحشی توتون نسبت به تیپ تراریخت که با بیان پروتئین Dnaj

که در شاهد ۳ که توسط محلول هو گلند تیماردهی شد، تفاوت معنی داری در مقدار پتاسیم نسبت به شاهد ۲ مشاهده نشد. با افزایش دوره تیماردهی در برداشت‌های دوم و سوم در غلظت‌های ۲ و ۳ نانوکلات پتاسیم، مقدار پتاسیم نسبت به سطح آن در نمونه‌های شاهد ۳ نیز فراتر رفت. در حالی که در شاهد ۳ مربوط به برداشت‌های دوم و سوم مقدار پتاسیم هم‌تراز با نمونه‌های شاهد ۱ باقی ماند. به نظر می‌رسد به علت کوچک بودن اندازه نانوکلات پتاسیم، جذب این عنصر توسط گیاه نسبت به مقدار پتاسیم موجود در محلول هو گلند سریع‌تر و به مقادیر بیشتر صورت می‌گیرد. در نتیجه، استفاده از نانوکلات پتاسیم با تجمع سریع و بیشتر این عنصر در گیاه می‌تواند آثار مخرب تنش خشکی را در زمان کوتاه‌تری از بین ببرد. Chang و Chou (۱۹۷۵) گزارش کردند که تنش خشکی در توتون به کاهش میزان پتاسیم در برگ‌ها منجر می‌شود که این گزارش با یافته‌های Sadeghi و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. آنها میزان پتاسیم را در گیاه توتون در شرایط تنش و بدون تنش خشکی ارزیابی کرده، مطابق نتایج حاضر، کاهش میزان پتاسیم را پس از اعمال تنش گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

مطالعات نشان داده است که دریافت تنش در سطح مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک به عواملی نظیر: ژنوتیپ، سطح تنش و مرحله رشد و نمو گیاه بستگی دارد. افزایش دوره تیماردهی توسط نانوکلات پتاسیم به ویژه در غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر، دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل غلظت فنل تام و پرولین را که از عکس‌العمل‌های

رادیکال‌های آزاد جلوگیری شده و به کاهش سطح تولید فنل در گیاه منجر می‌شود. با توجه به نقش ترکیبات فنلی در شرایط تنش، افزایش مقادیر آنها دور از انتظار نیست. پژوهش‌های پیشین در این زمینه، نتایج مشابهی را در توتون نشان داده است. Andersen و همکاران (۱۹۶۹) افزایش مقادیر فنل در توتون طی اعمال خشکی بین دو روش کاشت در مزرعه و کاشت گلخانه‌ای را نشان دادند. طی اعمال تنش در شرایط گلخانه‌ای مقادیر بیشتر فنل در برگ‌های توتون گلخانه‌ای نسبت به کاشت در مزرعه گزارش شد.

پتاسیم نقش فیزیولوژیک مهمی در شرایط نامساعد محیطی در سلول ایفا می‌کند و زیاد بودن آن موجب افزایش تحمل گیاه می‌شود (Cakmak, 2005). افزایش نیاز به پتاسیم در گیاهان تحت تأثیر تنش خشکی وابسته به این حقیقت است که پتاسیم در حفظ تثبیت CO_2 فتوسنتزی مؤثر است. تنش خشکی با بستن روزنه‌ها ضمن کاهش تثبیت CO_2 سبب تولید شکل‌های فعال اکسیژن شده، که با کاهش پتاسیم تشکیل آنها تشدید می‌شود (Vyas *et al.*, 2001). این عنصر، در سنتز پروتئین‌ها، فتوسنتز و انتقال مواد حاصل از آن نقش اساسی دارد و در صورت کمبود آن، فعالیت آنزیم‌هایی مانند: سینتتازها، اکسیدو ردکتازها، دهیدروژنازها، ترانسفرازها و کینازها مختل می‌شود (Kanai *et al.*, 2007).

همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، در نمونه‌های تحت تنش خشکی، مقدار پتاسیم نسبت به نمونه‌های پیش از تنش کاهش معنی داری داشته است. اما با آغاز تیماردهی توسط نانوکلات پتاسیم در برداشت اول افزایش مقدار پتاسیم مشاهده شد. در حالی

به طور کلی، به ویژه در غلظت ۳۵ میلی گرم بر لیتر آثار مخرب ناشی از تنش خشکی در گیاه توتون توسط نانوکلات پتاسیم کاهش یافت.

سپاسگزاری

نگارندگان از مرکز دخانیات استان گیلان بابت تأمین بذور توتون و از دانشگاه گیلان به خاطر حمایت مالی قدردانی می‌نمایند.

گیاه در برابر تنش است، بسیار کاهش می‌دهد. همچنین، در اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی غشا که شاخص مهمی در تشخیص شدت وقوع تنش است، روند بهبود خسارات ناشی از اثرات مخرب افزایش مالون دی آلدئید با افزایش دوره تیماردهی توسط غلظت‌های نانوکلات پتاسیم مشاهده شد. این در حالی است که در دوره اول، برداشت نمونه‌ها تأثیر تیمار نانوکلات پتاسیم در برخی شاخص‌های اندازه گیری شده چندان محسوس نبود. اما

منابع

- Andersen, R. A., Lowe, R. and Vaughn, T. A. (1969) Plant phenols and polyphenoloxidase in *Nicotiana tabacum* during greenhouse growth, field growth and air-curing. *Phytochemistry* 1(8): 2139-2147.
- Azizi, M. and Rashed Mohasel, M. H. (1998) Effect of various irrigation regimes and potassium fertilizer on yield and yield components of soybean. *Journal of Agricultural Science and Technology* 12(2): 76-82.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bettaieb, I., Knioua, S. Hamrouni, I. Limam, F. and Marzouk, B. (2012) Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops and Products* 36: 238-245.
- Boyer, J. S., Ort, D. R. and Ortiz-Lepez, A. (1987) Photophosphorylation at low water potential. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology* 6: 69-73.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cakmak, I. (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 521-530.
- Chang, C. S. and Chou, D. S. (1975) Studies on the mechanism of drought resistance in tobacco plant. *Bulletin of Taiwan Tobacco Research Institute* 9(2): 255-269.
- Chinnamuthu, C. R. and Murugesu Boopathi, P. (2009) Nanotechnology and agroecosystem. *The Madras Agricultural Journal* 96: 17-31.
- Daneshmand, F. (2013) The effect of ascorbate pre-treatment on tomato plant under drought stress: oxidative stress, osmolytes, phenolics and protein. *Iranian Journal of Plant Biology* 18: 53-66 (in Persian).
- Delauney, A. J. and Verma, D. P. S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* 4(2): 215-223.
- Efeoğlu, B., Ekmekçi, Y. and Çiçek, N. (2009) Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African Journal of Botany* 75: 34-42.

- Feller, U. (2004) Proteolysis in plant cell death processes. Academic Press, San Diego.
- Gao, T., Jelle, B. P., Sandborg, L. and Gustavsen, A. (2013) Monodisperse hollow silica nanospheres for nano insulation materials, Synthesis, characterization and life cycle assessment. *ACS Applied Materials and Interfaces* 5(3): 761-767.
- Ghahremani, A., Akbari, K., Yousefpour, M. and Ardalani, H. (2014) Effects of nano-potassium and nano-calcium chelated fertilizers on qualitative and quantitative characteristics of *Ocimum basilicum*. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars* 3(1-2): 2277-7873.
- Gholizadeh, A., Dordipour, A. and Mahdavi, A. (2013) Determine the critical level of potassium in the soil of tobacco farms in the provinces of Mazandaran and Golestan. *Journal of Soil Management and Sustainable Production* 3(1): 215-229 (in Persian).
- Heath, R. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Jaleel, C. A., Gopi, R. and Panneerselvam, R. (2008) Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies* 331: 272-277.
- Kanai, S., Ohkura, J., Adu-Gyamfi, P., Mohapatra, H., Saneoka, A. and Fujita, K. (2007) Depression of sink activity precedes the inhibition of biomass production in tomato plants subjected to potassium deficiency stress. *Journal of Experimental Botany* 58: 2917-2928.
- Kumar, A. R. and Kumar, M. (2008) Studies on the efficacy of sulphate of potash on physiological, yield and quality parameters of Banana cv. Robusta. *Eur. Asian Journal of Biological Sciences* 2: 102-109.
- Lawlor, D. W. and Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275-294.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids, pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Li-Ping, B, Fang-Gong, F., Ti-Da, G., Zhao-Hui, S., Yin-Yan, L. and Guang-Sheng, Z. (2006) Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. *Pedosphere* 16(3): 326-332.
- Liu, J., Li, J., Su, X. and Xia, Z. (2014) Grafting improves drought tolerance by regulating antioxidant enzyme activities and stress-responsive gene expression in tobacco. *Environmental and Experimental Botany* 107: 173-179.
- 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.
- Ma, Q. Niknam, R. and Turner, D. W. (2006) Response of osmotic adjustment and seed yield of *Brassica napus* and *Brassica jounce* to soil water deficit at different growth stages. *Australian Journal of Agricultural Research* 57: 221-226.
- Ma, Q. Turner, D. W., Levy, D. and Cowling, W. (2004) Solute accumulation and osmotic adjustment in leaves of *Brassica* oilseeds in response to soil water deficit. *Australian Journal of Agricultural Research* 55: 939-945.
- Masoudian, Z., Norastehnia, A. and Falakroo, K. (2014) Study of drought tolerance in selective clones of tea (*Camellia sinensis* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 20: 155-170 (in Persian).
- Mazaherinia, S., Astarai, A. R., Fotovat, A., Monshi, A. (2010) Nano iron oxide particles efficiency

- on Fe, Mn, Zn and Cu concentrations in wheat plant. World Applied Sciences Journal 7(1): 36-40.
- Miller, H., Stein, A., Honig, Y., Kapulnik, S. and Zilberstein, A. (2005) Responsive modes of *Medicago sativa* proline dehydrogenase genes during salt stress and recovery dictate free proline accumulation. *Planta* 222(1): 70-79.
- Moaveni, P. and Kheiri T. (2011) TiO₂ nano particles affected on maize (*Zea mays* L.). 2nd International Conference on Agricultural and Animal Science, Singapore.
- Naderi, M. R. and Abedi, A. (2012) Application of nanotechnology in agriculture and refinement of environmental pollutants. *Journal of Nanotechnology* 11(1): 18-26 (in Persian).
- Nalousi, M. A., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, M. and Hassan Alibiglouei, M. (2014) The study of physiological and biochemical responses of *Agrostis stolonifera* and *Festuca arundinacea* Schreb under drought stress. *Iranian Journal of Plant Biology* 22: 105-116 (in Persian).
- Namjoo, S. (2003) Comparison of biochemical and physiological responses of sensitive and tolerant cultivars of wheat (*Triticum aestivum*) to salinity. MSc thesis, Shiraz University, Shiraz, Iran (in Persian).
- Neffati, M., Sriti, J., Hamdaoui, G., Kchouk, M. E. and Marzouk, B. (2010) Salinity impact on fruit yield, essential oil composition and antioxidant activities of *Coriandrum sativum* fruit extracts. *Food Chemistry* 124: 221-225.
- Oliviera-Neto, C. F., Silva-Lobato, A., Goncalves-Vidigal, M., Costa, L., Santos Filho, B., Alves, G., Silva-Maia, W., Cruz, F., Neres, H. and Santos Lopes, M. (2009) Carbon compounds and chlorophyll contents in sorghum submitted to water deficit during three growth stages. *Science and Technology* 7(2): 588-593.
- Ranjbar, R., Taghavi, R. and Gholizadeh, A. (2009) Determination of potassium critical level in the soils of tobacco growing fields in Azarbayjan-e-Gharbi province for tobacco (*Nicotiana tabacum* var. Basma) in pot experiment, Annual Research Report. Urmieh Tobacco Research Center, Iran (in Persian).
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C. and Abdelly, C. (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45(3-4): 244-249.
- Sadeghi, M., Samizadeh lahiji, H., Darvish, F. and Bihamta, M. (2010) Assessment of combining tobacco varieties for some quality traits in stress and non-stress, Annual Research Report. Urmieh Tobacco Research Center, Iran (in Persian).
- Salehi, M. and Tamaskoni, F. (2008) Effect nanocid at seed treatment on germination and seedling growth of wheat under salinity. 1st National Congress on Seed Science and Technology, Gorgan, Iran (in Persian).
- Singh, S. K. and Raja Reddy, K. (2011) Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 105: 40-50.
- Sharma, K. D. and Kuhad, M. (2006) Influence of potassium level and soil moisture regime on biochemical metabolites of *Brassica* species. *Brassica Journal* 8: 71-74.
- Shikanai, T., Takeda, T., Yamauchi, H. and Sano, S. (1998) Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Letters* 428: 47-51.
- Tambussi, E., Bartoli, J., Bettran, J., Guiamet, J. and Araus, C. (2000) Oxidative damage to thylakoids proteins in water stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 108: 398-404.

- Uma, D. B., Ho, C. W. and Aida, W. M. W. (2010) Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana* 39(1): 119-128.
- Vyas, S., Garg, S., Kathju, A. and Lahiri, N. (2001) Influence of potassium on water relations, photosynthesis nitrogen metabolism and yield of cluster bean under soil moisture deficit stress. *Indian Journal of Plant Physiology* 6: 30-37.
- Wang, G., Cai, G., Kong, F., Deng, Y., Ma, N. and Meng, Q. (2014) Overexpression of tomato chloroplast-targeted DnaJ protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* 82: 95-104.
- Yamchi, A., Rastegar Jazi, F., Ghobadi, S., Mousavi, A. and Karkhaneie, A. (2004) Pyrroline 5-carboxylate synthetase gene abundantly expressed $\Delta\text{-}\Delta$ (p5cs), to increase resistance to osmotic stress in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 8(4): 115-119 (in Persian).
- Zheng, Y., Aijun, N., Tangyuan, J., Xud, L., Zengjia, A. and Gaoming, J. (2008) Potassium nitrate application alleviates sodium chloride stress in winter wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology* 165: 1455-1465.

Changes of some growth factors in tobacco (*Nicotiana tabacum*) under drought stress using potassium nano-chelate

Akbar Norastehnia * and Samarqand Valeh

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

The use of nano-chelates, in lieu of conventional fertilizers, result in the controlled and gradual release of the nutrients throughout the growth seasons. Drought stress is one of the stresses that lead to reduced tobacco farming yields. Potassium-containing fertilisers play an important role in improving the quality of tobacco and under draught conditions, higher levels of potassium reduce the damaging effects of the draught stress. In this study, we initially subjected tobacco plants to a drought stress induced by 20% polyethylene glycol, 48 hours after which the plants were treated with three concentrations of potassium nano-chelate over 9 days. The amounts of proline, total proteins, photosynthetic pigments, malondialdehyde, phenol and potassium in the leaf were determined and the results were statistically analyzed by SPSS software. The results showed that increase in the duration of treatments and higher concentrations of potassium nano-chelates decrease the drought-induced deleterious effects in tobacco leaves, as revealed by lower amounts of proline, malondialdehyde and phenol, whose concentrations are generally elevated in drought-stressed plants. Further biochemical analyses revealed that increase in the synthesis of proteins, chlorophylls and carotenoids. In conclusion, the results of this study suggest that, in a shorter time nano-chelates of potassium reduce the destructive effects of the draught stress.

Key words: Malondialdehyde, Phenol, Photosynthetic Pigments, Polyethylene glycol, Potassium nano-chelate, Proline, Total protein