

مقایسه اثرات نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون بر نهال های گلابی وحشی (*Pyrus boissieriana*) در مواجهه با تنش خشکی

مهراد اد زرافشار*^۱، مسلم اکبری نیا^۲، سید محسن حسینی، علی ستاریان^۳، مریم نیاکان^۴
پیمان اشکاوند^۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۶

تاریخ تصویب: ۹۶/۳/۳

چکیده

امروزه استفاده از نانوذرات به عنوان راهکاری مناسب به جهت افزایش مقاومت گیاهان به تنش های محیطی مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، نهال های گلابی وحشی در شرایط گلخانه توسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون با غلظت های مختلف آبیاری شدند و سپس با قطع آبیاری به مدت ۱۴ روز تحت تنش خشکی قرار گرفتند. در انتهای آزمایش شاخص هایی از قبیل محتوای نسبی رطوبت، وضعیت پتانسیل آبی نهال، زی توده ریشه، نرخ نشت الکترولیت، میزان پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان اتصال نانوذرات به سطح اپیدرم ریشه توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که علی رغم میزان جذب متفاوت هر دو نانوذره توسط این گیاه چوبی، اثرات بهبود دهنده در تمامی شاخص ها برای هر دو نانوذره با اندکی اختلاف با یکدیگر مشاهده شد. نانوذرات دی

*۱- استادیار، پژوهش، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، فارس، ایران.
(نویسنده مسئول: M.zarafshar@areeo.ac.ir)

۲- دانشیار، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، استان مازندران.

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، استان گلستان.

۴- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، استان گلستان.

۵- دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، استان مازندران

اکسید سیلیکون در بهبود زی توده ریشه و محتوای نسبی رطوبت برگ در شرایط تنش خشکی موفق تر عمل کرد. در مقابل نانوذرات دی-اکسید تیتانیوم در حفظ پتانسیل آبی نهال ها و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز دارای عملکرد بهتری بود. در نهایت اثرات مثبت هر دو نوع تغذیه در تعدیل تنش خشکی مورد تأیید واقع شد ولی بی شک برای درک سازوکار آنها مطالعات عمیق-تر با تکیه بر مطالعات مولکولی نیاز است.

واژه های کلیدی: آنزیم کاتالاز، زی توده، عناصر غذایی، قطع آبیاری، نانوذرات،

مقدمه

بی شک درک و فهم سازوکار گیاهان در مقابل تنش خشکی اهمیت فراوانی دارد با این حال دست یابی به روش هایی که بتواند مقاومت گیاهان به تنش خشکی را افزایش دهد حیاتی و مهم تر است (Sacala, 2009). اعتقاد بر این است که استفاده از کود های مناسب می تواند تا حدودی اثرات مخرب خشکی بر گیاهان را کاهش دهد. از سوی دیگر در صورتی که کود های گیاهی و عناصر غذایی به صورت نانو مورد مصرف قرار بگیرند جذب آنها برای گیاه آسان تر می شود (Braunack, 1995). به ذراتی که حداقل یکی از ابعاد آن قطری معادل ۱۰۰ نانومتر و یا کمتر باشد نانوذره گفته می شود (Biswas and Wu, 2005). نانوذرات به علت ابعاد بسیار ریز برتری های فیزیکی-شیمیایی قابل توجهی نسبت به ذرات درشت دارند. به عنوان مثال سطح ویژه بیشتر به آنها قابلیت حلالیت و عملکرد سطحی بهتر می دهد (Monica and Cremonini, 2009). تولید نانوذرات و کاربرد آنها در جنبه های مختلف علوم گیاهی در حال افزایش است و علی رغم تولید روزافزون آنها، بررسی های محدودی در خصوص اثر مواد نانوذرات مختلف بر رشد گیاه وجود دارد. در کشاورزی استفاده از نانوذرات در علوم و تکنولوژی تولید، تبدیل مازاد کشاورزی و غذا به انرژی از طریق برخی آنزیم های نانوبیولوژیک، دفع آفات و بیماری ها و تیمار گیاهان مختلف مطرح می باشد (Carmen et al., 2003). مطالعه نانوذرات و اثر آنها بر رشد گیاهان بسیار پیچیده است چرا که گزارش های متفاوتی مبنی بر اثرات نانوذرات بر گیاهان مختلف وجود دارد (Gao et al., 2013)، ولی در این بین نقش بهبود دهند ه برخی از آنها از قبیل نانوذرات سیلیکون و تیتانیوم در اکثر تحقیقات مورد تأیید قرار گرفته است.

سیلیکون (Si) یکی از عناصر فراوان موجود در خاک است و به دلیل اینکه در دسته عناصر ضروری برای رشد گیاهان قرار نگرفته، لذا توجه زیادی به نقش بیولوژیکی آن در گیاه نشده است. سیلیکون به عنوان یک عنصر ضروری برای گیاهان عالی و آوندی محسوب نمی شود چرا که در شرایط بهینه و نرمال، گیاهان چرخه زندگی خود را بدون این عنصر کامل می کنند (Epstein, 2009). به نظر می رسد تا زمانی که گیاه تحت استرس قرار نگیرد سیلیکون برای گیاه مفید نباشد (Epstein and Bloom, 2005). در پژوهشی حقیقی و همکاران (2012) با استفاده از نانوذرات دی اکسید سیلیکون با غلظت ۱ میلی مولار توانستند اثرات منفی تنش شوری حاصل از کلرید سدیم در بذر گوجه فرنگی را کاهش دهند. نتایج مطالعات ماتیسوس-نارانجو و همکاران (2013) حاکی از آن است که استفاده از سیلیکون حتی می تواند باعث افزایش مقاومت گیاه هالوفیت *densiflora* *Spartina* شود. تحقیقات حقیقی و پساراکلی (2013) نشان داد که نانوذرات دی اکسید سیلیکون صفات فیزیولوژیک و رشد گیاه گوجه فرنگی تحت تأثیر تنش شوری را بهبود می بخشد.

تیتانیوم (Ti) از لحاظ فراوانی نهمین عنصر موجود در پوسته زمین است که البته از جهت فلز انتقالی در جایگاه دوم قرار دارد و شواهد نشان می دهد که عنصر تیتانیوم می تواند تا حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد باعث افزایش محصول دهی در گیاهان شود (Feizi et al., 2013). تیتانیوم سبب بهبود صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان می شود (Berahmand et al., 2005; Mingyu et al., 2007). همچنین تیتانیوم به عنوان یک عنصر سودمند باعث افزایش و تحریک رشد می شود (Pais, 1983)، به طوری که کاربرد آن در محلول غذایی و یا به صورت محلول پاشی روی برگ های گیاه باعث افزایش زیست توده و رشد گونه های مختلف گیاهی شده است (Carvajal and Alcaraz, 1998). استفاده از نانوذرات تیتانیوم اخیراً به علت ویژگی های برجسته به شدت مورد توجه متخصصین فیزیولوژی گیاهی قرار گرفته است (Gao et al., 2013) ولی بیشتر مطالعات در رابطه با استفاده از آن در شرایط ایتیم و بهینه رشد صورت گرفته و اطلاعات در زمینه استفاده در شرایط تنش بسیار اندک است (Mohammadi et al., 2013). جابرزاده و همکاران (۱۳۸۹) اثرات مثبت محلول پاشی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم را بر روی خصوصیات زراعی گندم تحت تنش خشکی گزارش کردند. همچنین گزارش شده است که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم قادر است توانایی برخی از گیاهان در مقابله با تنش سرما را افزایش دهد (Mohammadi et al., 2013). از سوی دیگر تحقیقات کیوآی و همکاران (2013) حاکی از آن است که نانوذرات دی اکسید تیتانیوم می تواند فعالیت فتوسنتزی را در گیاه گوجه فرنگی تحت استرس گرمایی با شدت ملایم بهبود بخشد.

مرور بانک های اطلاعاتی حاکی از آن است که بیشتر پژوهش ها در رابطه با نانوذرات بر گیاهان

زراعی انجام شده است لذا فقدان اطلاعات در رابطه با گیاهان چوبی ما را بر آن داشت تا تأثیر تغذیه گیاه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون در نهال های گلابی وحشی تحت استرس خشکی را در این تحقیق مورد بررسی قرار دهیم. درخت گلابی وحشی یا تلکا (*Pyrus biosseriana* Buhse.) یکی از گونه های ارزشمند در اکوسیستم های جنگلی شمال ایران بوده که مقاومت قابل قبول آن نسبت به تنش خشکی نیز تأیید شده است (Zarafshar et al., 2015). بهبود پارامترهای رشد گیاه گلابی وحشی تحت خشکی از طریق تغذیه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (NPs TiO_2) و دی اکسید سیلیکون (NPs SiO_2) یکی از اهداف این پژوهش می باشد که تاکنون مورد توجه محققین قرار نگرفته است.

مواد و روش ها

مشخصات نانوذرات

نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مورد استفاده در این تحقیق ساخت کمپانی د اگوسا (Degussa) (25-P) بود. نانوذرات به شکل کریستالی با قطر متوسط $24/5$ نانومتر و سطح ویژه $55 \text{ m}^2/\text{g}$ بود. نانوذره تیتانیوم دارای ترکیبی از آناتاز و روتیل می باشد که سهم آناتاز بیشتر است ($89/2$ درصد). نانوذرات دی اکسید سیلیکون ساخت کمپانی Tecnon از کشور اسپانیا بود. رنگ نانوذرات سیلیکون سفید و به لحاظ مورفولوژی کروی است. متوسط اندازه نانوذرات $10-15$ نانومتر و مساحت سطح ویژه آن $180-279 \text{ m}^2/\text{g}$ است. درصد خلوص این نانوذره $99/999\%$ می باشد.

مواد گیاهی و اعمال تیمارها

این پژوهش بر روی نهال های دو ساله گونه گلابی وحشی و در شرایط گلخانه انجام شد (دانشکده منابع طبیعی- تربیت مدرس واقع در شهر نور- استان مازندران). متوسط دمای 40 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 35 درصد و شدت نور 1500 لوکس (در ساعت 13) در تیر-مرداد ماه از مهم ترین شرایط گلخانه تحقیقاتی بود. در ادامه 45 نهال یکسان و همگن از لحاظ قطر و ارتفاع برای اعمال تیمارها انتخاب شدند. تا قبل از شروع آزمایش تمامی گلدان ها بر اساس محاسبه ظرفیت زراعی هر سه روز یکبار به میزان 700 میلی لیتر آبیاری گردیدند. خاک گلدان ها شامل مخلوطی از خاک قهوه ای جنگل، خاک مزرعه و ماسه بود. برای اعمال تنش خشکی بر روی نهال های گلابی از روش قطع آبیاری تا زمان مشاهده علائم اولیه پژمردگی برگ استفاده شد. برای اعمال نانوذرات از روش تغذیه گیاه از طریق آبیاری استفاده شد (Gao et al., 2005)، لذا تیمارهای تغذیه ی نانوذرات با غلظت های 10 ، 100 ، 500 و 1000 میلی گرم در لیتر در 700 میلی لیتر مطابق با دستورالعمل تهیه و به عنوان آخرین آبیاری در اختیار گیاه قرار گرفت و پس از آن به منظور القاء

تنش خشکی، آبیاری برای تمامی نهال ها تا زمان ظهور پیچش برگ قطع گردید. نهال های شاهد در آخرین آبیاری با ۷۰۰ میلی لیتر آب خالص آبیاری شدند و قطع آبیاری برای آن ها نیز اعمال شد.

شاخص های مورد مطالعه

بعد از ۱۴ روز از زمان قطع آبیاری، همزمان با مشاهده پدیده پیچش برگ، آزمایش به پایان رسید. در انتهای دوره آزمایش و در سحرگاه (قبل طلوع آفتاب) پتانسیل آبی در آوند چوبی در تمامی نهال ها از هر تیمار با استفاده از دستگاه پمپ فشار قابل حمل (1400 Skye, SKPM, UK) اندازه گیری و ثبت شد. تعدادی برگ نهال ها برای ادامه تحقیقات با استفاده از ازت مایع به صورت جامد فریز و در دمای ۸۵- درجه سانتی گراد نگه داری شد. تعداد محدودی برگ از هر نهال جدا و در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. در ادامه نمونه های خشک شده برگ به آزمایشگاه سازمان انرژی اتمی منتقل و با استفاده از دستگاه XRF مقدار عناصر سیلیکون و تیتانیوم در برگ تمامی تیمارها تعیین شد. حضور نانوذرات در سطح اپیدرم ریشه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (KYKY-EM۳۲۰۰) مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از خشک کردن اندام ریشه در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت زنی توده خشک ریشه توزین شد. در ادامه محتوای نسبی رطوبت برگ طبق روش معمول اندازه گیری و ثبت شد (Martínez et al., 2007). میزان نشت الکترولیت نیز به عنوان شاخص آسیب غشایی طبق روش معمول اندازه گیری شد (Campos et al., 2009). با استفاده از نمونه های برگ منجمد شده و طبق روش های متداول، میزان پرولین (Bates et al., 1973) و فعالیت آنزیم کاتالاز (Ebermann and Stich, 1982) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. برای اندازه گیری پرولین، ۰/۱ گرم از نمونه های فریز شده در دمای ۸۵- درجه سانتی گراد با ۵ میلی لیتر محلول اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد عصاره گیری شد و پس از سانتریفوژ کردن (۶۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد)، ۲ میلی لیتر از عصاره صاف شده برداشته و با ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۳۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط گشته و ۲ میلی لیتر اسید استیک نیز اضافه گردید و در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی گراد، ۱ ساعت) قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه ها در یخ، ۴ میلی لیتر تولوئن به نمونه ها پس از مخلوط نمودن به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس ۱۵ دقیقه ورتکس گردیدند. میزان جذب مایع رویی که در تولوئن حل شده بود و به رنگ صورتی بود در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA redeal قرائت گردید.

نمونه برگ با ماده عصاره گیری مخلوط و حدود ۱۲ ساعت در دمای ۴+ قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت و قسمت شفاف برای مطالعه و مقایسه فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری جدا گردیده و با یکدیگر مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل با پنج تکرار اجرا گردید. تمامی اطلاعات به دست آمده در محیط نرم افزار Excel سازمان دهی و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Graphpad prism ترسیم شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. داده های ثبت شده پس از آزمون نرمالیتی و همگنی با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه تجزیه و تحلیل شد. مقایسه مقادیر میانگین ها نیز توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵% انجام شد.

نتایج

جذب عنصر سیلیکون و تیتانیوم توسط گیاه

بررسی میکروگراف های تهیه شده از اپیدرم ریشه نهال های شاهد به طور واضح عدم حضور نانوذرات را نشان داد، در حالی که حضور و چسبندگی نانوذرات به سطح اپیدرم ریشه ی نهال هایی که با نانوذرات تغذیه شده بودند با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) تأیید شد (شکل ۱). از لحاظ مقایسه، نانوذرات دی اکسید سیلیکون با تراکم بیشتری به سطح اپیدرم ریشه چسبیده و نسبت به نانوذرات دی اکسید تیتانیوم موفق تر بودند. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تغذیه نهال ها با نانوذرات دی اکسید سیلیکون در غلظت های مختلف سبب تغییرات معنی دار در میزان عنصر سیلیکون در برگ نهال ها شد ($P < 0.001$) (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد افزایش غلظت تغذیه سبب افزایش چشم گیر جذب عنصر سیلیکون در مقایسه با شاهد شده به طوری که بیشترین میزان این عنصر در نهال های تغذیه شده با غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ثبت شد (شکل ۲). در این دو تیمار و به طور میانگین میزان سیلیکون تا ۶۰% بیشتر از نهال های شاهد بود. در رابطه با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مشخص شد که اگرچه اختلاف معنی دار آماری بین غلظت های بکار گرفته شده وجود داشت ($P < 0.001$) (جدول ۱)، ولی بیشترین میزان جذب تیتانیوم، بیش از دو برابر نهال های شاهد، در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر صورت گرفت و با افزایش غلظت، جذب بیشتری انجام نشد (شکل ۲). در مورد هر دو نوع تغذیه ی نانوذرات، کمترین میزان عناصر تیتانیوم و سیلیس در نهال های شاهد ثبت شد.

تأثیر تغذیه نانوذرات بر زی توده ریشه نهال ها تحت تنش خشکی

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که زی توده ریشه تحت تأثیر نوع نانوذرات قرار نگرفت در حالی که اثر غلظت های اعمال شده و اثر متقابل آن ها بر روی زی توده ریشه در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). اگرچه زی توده ریشه در تمامی تیمارها در مقایسه با نهال های شاهد مقدار بیشتری را نشان داد، ولی بیشترین زی توده ریشه در تیمارهای ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی

گرم در لیتر نانو دی اکسید سیلیکون و ۱۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مشاهده شد (شکل ۳).

تأثیر تغذیه نانوذرات بر روابط آبی نهال ها تحت تنش خشکی

آنالیز آماری نشان داد که اثر نوع نانوذرات ($P < 0.001$) و غلظت های آن ها ($P < 0.001$) و همچنین اثر متقابل آن ها ($P < 0.001$) بر میزان پتانسیل آبی نهال ها تحت تنش خشکی معنی دار بود (جدول ۲). کمترین میزان پتانسیل آبی در نهال هایی که از تغذیه نانوذرات بهره مند نبودند مشاهده شد ($2/8 -$ مگاپاسکال)، درحالی که با افزایش غلظت نانوذرات افزایش چشم گیری در این شاخص مشاهده شد که در این میان تأثیر نانوذرات تیتانیوم محسوس تر بود. پتانسیل آبی در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر از دی اکسید تیتانیوم و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از دی اکسید سیلیکون تا حدود ۷۸٪ نسبت به شاهد افزایش داشت. تغذیه نهال ها با نانوذرات در غلظت های مختلف تأثیر معنی داری بر محتوای نسبی رطوبت برگ داشت ($P < 0.001$) به طوری که تمامی تیمارها سبب بهبود میزان محتوای نسبی رطوبت برگ در نهال های تحت تنش خشکی شد (شکل ۴). تمامی تیمارهای نانو دی اکسید سیلیکون به همراه تیمارهای ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر از دی اکسید تیتانیوم تا حدود ۵۵-۵۰٪ سبب افزایش محتوای نسبی رطوبت شدند. در پایان آزمایش، محتوای نسبی رطوبت در نهال های شاهد حدود ۴۰ درصد اندازه گیری شد.

تأثیر تغذیه نانوذرات بر نرخ نشت الکتروولیت در سلول گیاهی

اعمال نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون سبب بهبود معنی دار بر یکپارچگی غشای سلولی گیاه تحت استرس خشکی شد ($P < 0.001$) (جدول ۲)، چرا که کاهش معنی داری در نرخ نشت الکتروولیت نسبت به شاهد ثبت شد که در این بین تأثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بیشتر بود (شکل ۵). میزان نشت الکتروولیت در نهال های شاهد حدود ۷۰٪ اندازه گیری شد، درحالی که با اعمال نانوذرات تا حدود ۵۰٪ کاهش نسبت به شاهد مشاهده گردید.

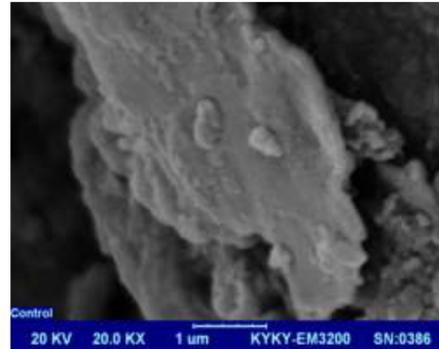
تأثیر تغذیه نانوذرات بر محتوای پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ نهال ها تحت تنش خشکی طبق نتایج آنالیزهای آماری محتوای پرولین برگ در نهال های گلابی وحشی تحت تأثیر تغذیه نانوذرات و غلظت های اعمال شده و همچنین برهم کنش آن ها قرار گرفت ($P < 0.001$) (جدول ۲). آنالیز چند دامنه ای دانکن حاکی از آن است که با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید سیلیکون محتوای پرولین نسبت به نهال های شاهد به طور معنی داری کاهش یافته درحالی که بیشترین میزان پرولین (۱۲۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک برگ) در تیمار تغذیه نانوذرات تیتانیوم با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد. در مقایسه با نهال های شاهد، تغذیه نهال های گلابی وحشی با نانوذرات تیتانیوم با غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تأثیر معنی داری بر محتوای این

اسید آمینه گیاهی نداشت. تأثیر تیمارهای اعمال شده و اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی دار بود ($P < 0.001$)، به طوری که تغذیه نهال ها تحت استرس خشکی با غلظت های بالا از نانوذرات تیتانیوم سبب افزایش (تا حدود ۲۰٪ در مقایسه با نهال های شاهد) و استفاده از نانوذرات دی اکسید سیلیکون با غلظت های بالا سبب کاهش فعالیت این آنزیم گیاهی تا حدود ۳۸-۳۰٪ در مقایسه با شاهد شد (شکل ۶). در غلظت های کم و متوسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم کاهش معنی دار و در مورد نانوذرات دی اکسید سیلیکون عدم اختلاف معنی دار مشاهده شد. **تأثیر تغذیه نانوذرات بر محتوی پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ نهال ها تحت تنش خشکی**

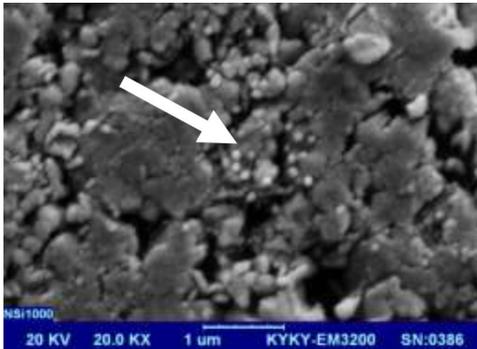
طبق نتایج آنالیزهای آماری محتوی پرولین برگ در نهال های گلابی وحشی تحت تأثیر تغذیه نانوذرات و غلظت های اعمال شده و همچنین برهم کنش آنها قرار گرفت ($P < 0.001$) (جدول ۲). آنالیز چند دامنه ای دانکن حاکی از آن است که با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید سیلیکون محتوی پرولین نسبت به نهال های شاهد به طور معنی داری کاهش یافته درحالی که بیشترین میزان پرولین (۱۲۸ میکروگرم بر گرم وزن خشک برگ) در تیمار تغذیه نانوذرات تیتانیوم با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شد. در مقایسه با نهال های شاهد، تغذیه نهال های گلابی وحشی با نانوذرات تیتانیوم با غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تأثیر معنی داری بر محتوی این اسید آمینه گیاهی نداشت. تأثیر تیمارهای اعمال شده و اثر متقابل آنها بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی دار بود ($P < 0.001$)، به طوری که تغذیه نهال ها تحت استرس خشکی با غلظت های بالا از نانوذرات تیتانیوم سبب افزایش (تا حدود ۲۰٪ در مقایسه با نهال های شاهد) و استفاده از نانوذرات دی اکسید سیلیکون با غلظت های بالا سبب کاهش فعالیت این آنزیم گیاهی تا حدود ۳۸-۳۰٪ در مقایسه با شاهد شد (شکل ۶). در غلظت های کم و متوسط نانوذرات دی اکسید تیتانیوم کاهش معنی دار و در مورد نانوذرات دی اکسید سیلیکون عدم اختلاف معنی دار مشاهده شد.



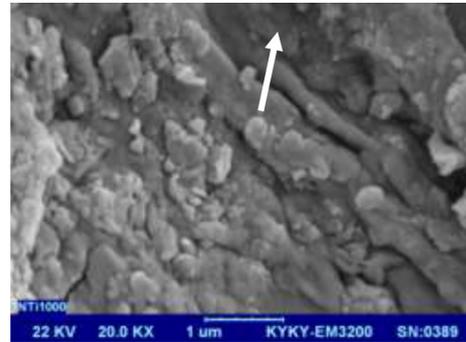
تهیه مقطع از ریشه گلایی وحشی



عدم حضور نانوذرات روی اپیدرم ریشه در نهال‌های کنترل که با نانوذرات تغذیه نشد.



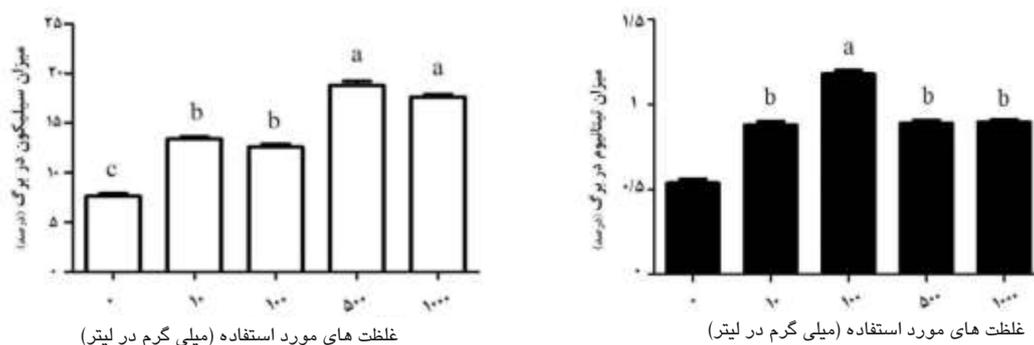
حضور نانوذرات روی اپیدرم ریشه در نهال‌هایی که با دی‌اکسید سیلیکون تغذیه شد.



حضور نانوذرات روی اپیدرم ریشه در نهال‌هایی که با دی‌اکسید تیتانیوم تغذیه شد.

شکل ۱: حضور و چسبندگی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و سیلیکون بر سطح اپیدرم ریشه

جدول ۱: نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه در ارتباط با اثر غلظت نانومواد بر مقدار عنصر سیلیس و تیتانیوم نهال‌ها				
اثر نانوذرات دی‌اکسید سیلیکون بر مقدار عنصر سیلیس در برگ گیاه				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۲۰۴/۲**	۵۹/۲۹	۲۳۷/۲	۴	اثر تیمار
	۰/۲۹۰۴	۲/۹۰۴	۱۰	خطا
اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر مقدار عنصر تیتانیوم در برگ گیاه				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۱۴۰/۳**	۰/۱۱۵۶۲	۰/۶۲۴۶	۴	اثر تیمار
	۰/۰۰۱۱۱۳	۰/۰۱۱۱۳	۱۰	خطا
توضیح: علامت ** نشان از اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد است.				

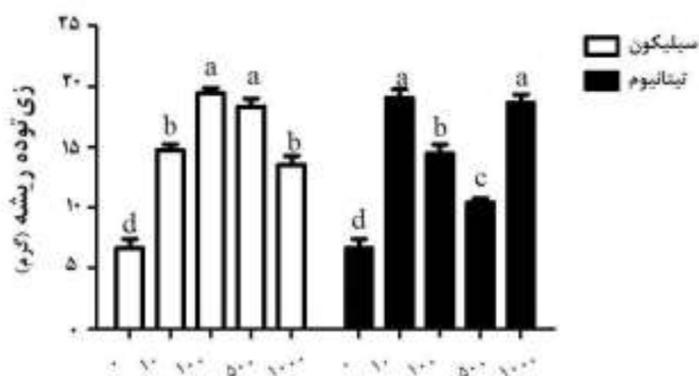


شکل ۲: تأثیر تغذیه نهال با استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون با غلظت های مختلف و اثر آن بر میزان دو عنصر تیتانیوم و سیلیکون در برگ.

جدول ۲: نتایج آنالیز واریانس دوطرفه در ارتباط با نوع نانومواد و غلظت های اعمال شده

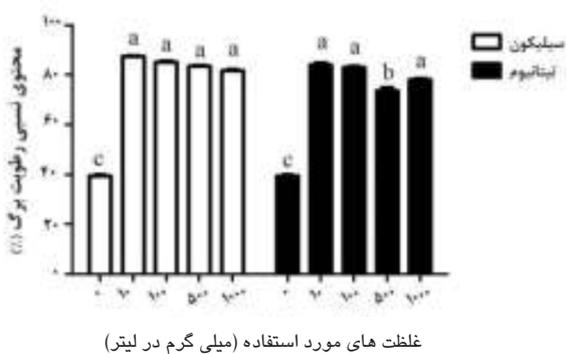
زی توده ریشه				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۲/۹۴۳ ^{ns}	۳/۶۶۱	۳/۶۶۱	۱	نوع تغذیه
۹۰/۷۰ ^{**}	۱۱۲/۸	۴۵۱/۲	۴	غلظت
۳۸/۹۸ ^{**}	۴۸/۴۸	۱۹۳/۹	۴	نوع تغذیه × غلظت
محتوی نسبی رطوبت برگ				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۸۸/۱۴ ^{**}	۱۰۸/۶	۱۰۸/۶	۱	نوع تغذیه
۱۸۱۶ ^{**}	۲۲۳۷	۸۹۴۹	۴	غلظت
۱۵/۷۸ ^{**}	۱۹/۴۴	۷۷/۷۶	۴	نوع تغذیه × غلظت
پتانسیل آبی گیاه				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۴۲/۸۹ ^{**}	۰/۱۶۷۳	۰/۱۶۷۳	۱	نوع تغذیه
۹۱۳/۸ ^{**}	۳/۵۶۴	۱۴/۲۵	۴	غلظت
۶۰/۸۹ ^{**}	۰/۲۳۷۵	۰/۹۴۹۹	۴	نوع تغذیه × غلظت
نشت الکترولیت				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۲۲/۲۰ ^{**}	۴۷/۵۰	۴۷/۵۰	۱	نوع تغذیه
۶۲۸/۶ ^{**}	۱۳۴۵	۵۳۸۱	۴	غلظت
۵/۳۹۹ ^{**}	۱۱/۵۶	۴۶/۲۲	۴	نوع تغذیه × غلظت
آنزیم کاتالاز				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۱۱۵/۳ ^{**}	۰/۹۶۷۶	۰/۹۶۷۶	۱	نوع تغذیه
۲۹/۴۵ ^{**}	۰/۱۷۵۸	۰/۷۱۳۸	۴	غلظت
۲۰۰/۳ ^{**}	۱/۲۱۴	۴/۸۵۴	۴	نوع تغذیه × غلظت
محتوی پرولین				
مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
۲۴۷/۳ ^{**}	۵۵۷	۵۵۷	۱	نوع تغذیه
۱۰۶/۶ ^{**}	۲۴۰/۱	۹۶۰/۲	۴	غلظت
۱۶۲/۵ ^{**}	۳۶۶	۱۴۶۴	۴	نوع تغذیه × غلظت

توضیح: علامت ** و ns به ترتیب نشان از اختلاف معنی دار آماری در سطح یک درصد و عدم اختلاف معنی دار آماری است.

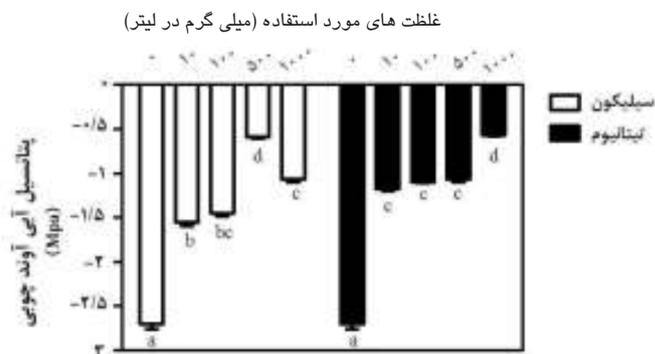


غلظت های مورد استفاده (میلی گرم در لیتر)

شکل ۳: تأثیر تغذیه نهال با استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون با غلظت های مختلف و اثر آن بر میزان زی توده نهال ها تحت استرس خشکی.

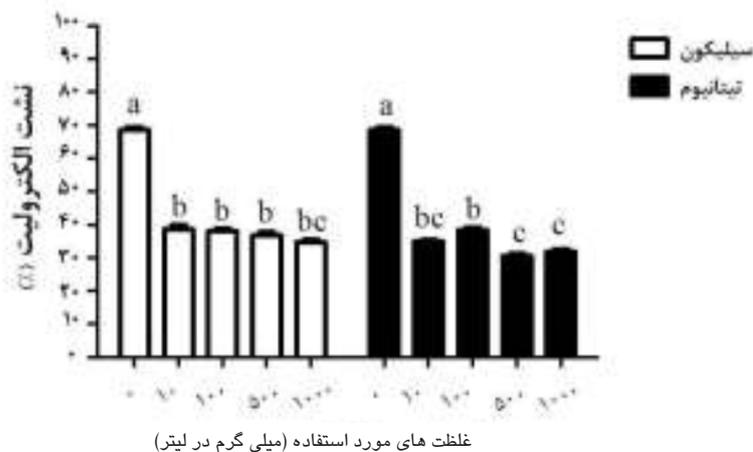


غلظت های مورد استفاده (میلی گرم در لیتر)



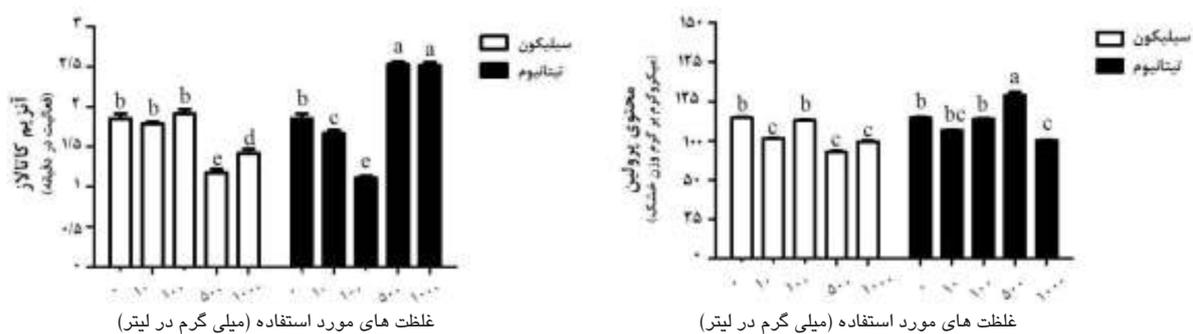
غلظت های مورد استفاده (میلی گرم در لیتر)

شکل ۴: تأثیر تغذیه نهال با استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون با غلظت های مختلف و اثر آن بر وضعیت آبی نهال ها تحت تنش خشکی.



غلظت های مورد استفاده (میلی گرم در لیتر)

شکل ۵: تأثیر تغذیه نهال با استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون با غلظت های مختلف و اثر آن بر یکنواختی دیواره سلول گیاهی تحت استرس خشکی.



شکل ۶: تأثیر تغذیه نهال با استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون با غلظت های مختلف و اثر آن بر میزان پرولین و فعالیت آنزیم پراکسیداز در نهال ها تحت تنش خشکی.

بحث و نتیجه گیری

یکی از راه کارهای کاهش اثرات زیان بار تنش های غیر زیستی استفاده از روش های تغذیه معدنی از جمله سیلیکون و تیتانیوم می باشد که بی شک در صورتی که در مقیاس نانو بکار گرفته شوند نه تنها از خصوصیات منحصر به فرد نانوذرات سود برده می شود، بلکه در صورت استفاده با غلظت های مناسب مقرون به صرفه بوده و اثر سمیت در پی نخواهد داشت (Qi et al., 2013). در این تحقیق به منظور پرهیز از القاء اثر سمیت به نهال ها و همچنین توجیه اقتصادی، از نانوذرات فقط یک مرتبه در آخرین آبیاری استفاده شد. طبق نتایج این تحقیق با استفاده از میکروسکوپ الکترونی حضور و چسبندگی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون بر روی اپیدرم ریشه نهال ها مورد تأیید قرار گرفت. تحقیقات نشان داده است سطح ویژه بالا در نانوذرات عملکرد سطحی و قدرت چسبندگی آن ها را بیشتر می کند (Monica and Cremonini, 2009)، لذا در این پژوهش حضور نانوذرات بر روی اپیدرم ریشه نهال ها قابل توجیه است. پیش از این، چسبندگی نانوذرات بر سطح ریشه نهال های بید توسط سیگر و همکاران (2009) نیز گزارش شده است. زمانی که گیاهان با نانوذرات تغذیه شوند، نانوذرات توسط ریشه های جانبی و موئین جذب شده و در ادامه از طریق ساقه به برگ منتقل می شود (Ma et al., 2010). نتایج آنالیز طیف نگاری فلورسانس اشعه ایکس (XRF) در این تحقیق نشان داد که گیاه گلابی وحشی قادر است نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون را از طریق ریشه جذب و در برگ ذخیره کند، اما توانایی جذب برای هر عنصر متفاوت بود. به طور کلی گیاهان قادر هستند که بین ۱ تا ۱۰ درصد زی توده خشک خود را به سیلیکون اختصاص دهند (Richmond and Sussman, 2003) که هم راستا با این، میزان سیلیکون در برگ نهال های شاهد (تحت تنش خشکی بدون تغذیه با نانوسیلیکون) حدود ۸-۶ درصد بود، در حالی که با افزایش غلظت نانوذرات سیلیکون در تیمارها، مقدار سیلیکون در برگ

افزایش داشت (حداکثر تا حدود ۱۹ درصد وزن خشک برگ). در مقابل، به نظر می‌رسد جذب نانوتیتانیوم برای این گیاه محدود است چرا که با افزایش غلظت نانوذرات تیتانیوم در تیمارهای مورد آزمایش، جذب بیشتر این عنصر صورت نگرفته که البته این موضوع را می‌توان به حرکت کند تیتانیوم در اندام های گیاهی نسبت داد (Lu et al., 2002). در نهایت می‌توان اذعان داشت که نهال های گلابی وحشی تحت تنش خشکی قادر است نانوذرات سیلیکون را بیشتر از نانوذرات تیتانیوم جذب کند.

عنوان شده است که گیاه در مواجهه با تنش خشکی انرژی خود را در افزایش زی توده ریشه متمرکز می‌کند (Arndt et al., 2001) که در این مطالعه تغذیه ی نانوذرات توانایی گیاه گلابی وحشی را در این امر را بهبود بخشید و در این بین نانوذرات سیلیکون موفق تر بود.

تغذیه نانوذرات تأثیر مثبت و قابل توجهی بر محتوای نسبی رطوبت برگ نهال ها تحت استرس خشکی داشت به طوری که تا بیش از دو برابر افزایش در مقایسه با نهال های شاهد ثبت شد. تأثیر مثبت سیلیکون بر محتوای نسبی رطوبت گزارش شده است (Gunes et al., 2008). تحقیقات پیشین نیز نشان داد که محتوای نسبی رطوبت در گیاه ذرت تحت تنش خشکی با اعمال Na_2SiO_3 تا حدود ۲۶/۵ درصد افزایش داشته است (Kaya et al., 2006). طبق نظر پژوهشگران تیتانیوم پتانسیل زیادی در جهت بهبود فعالیت های فیزیولوژیک گیاهان دارد (Mingyu et al., 2007; Berahmand et al., 2012) که در این تحقیق اثر مثبت آن علاوه بر محتوی نسبی رطوبت بر روی پتانسیل آبی گیاه نیز در نهال های تحت استرس خشکی تأیید شد. تحقیقات نشان می‌دهد که یک گرم از نانوذرات سیلیسیم با قطر ۷ نانومتر دارای سطح جذبی معادل 2400m هستند. بنابراین می‌توانند بر وضعیت آبی گیاه و افزایش کارایی مصرف آب تأثیرگذار باشند (Wang and Naser, 1994) که در تحقیق حاضر اثر مثبت آن در تعدیل پتانسیل آبی نهال ها تحت استرس خشکی نیز مشاهده شد.

افزایش توانایی گیاهان برای حفظ تورژسانس از راه پایداری غشاء سیتوپلاسمی سبب مقاومت گیاه در مقابل تنش های محیطی می‌شود (کوچکی، ۱۳۷۰). در این تحقیق بیشترین نرخ نشت الکترولیت در نهال های تحت تنش خشکی که از تغذیه ی نانوذرات بهره مند نبودند، مشاهده شد در حالی که تغذیه ی نهال با هر دو نوع نانوذره سبب حفظ پایداری غشا سیتوپلاسمی شد و به بیان دیگر فعالیت تخریبی گونه های اکسیژن فعال که عامل تخریب غشا سیتوپلاسمی هستند (Jiang and Huang, 2001) را مدیریت کردند. گیاهان برای مدیریت و حذف گونه های اکسیژن فعال دارای یک سری سیستم های دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. به عنوان یکی از سیستم های آنزیمی، کاتالاز یک اکسیدو ردوکتاز می‌باشد که در تجزیه و حذف گونه های اکسیژن فعال نقش دارد

(Zhang and Kirkham, 1994). تحقیقات گذشته نشان داده است که نانوذرات تیتانیوم قادر است با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی از اثرات مخرب تنش اکسیداتیو و مرگ سلول گیاهی جلوگیری کند (Lei et al., 2008). هم‌راستا با این یافته، نتایج تحقیق حاضر نیز به وضوح نشان داد که تغذیه ی نهال های گلابی با غلظت های بالا از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. از طرفی دیگر اگرچه تأثیر مثبت سیلیکون در افزایش مقاومت به خشکی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت گزارش شده است (Gong et al., 2005; Ma et al., 2010) ولی در این پژوهش با افزایش غلظت آن، فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان یکی از آنزیم های آنتی اکسیدانتی کاهش یافت. سلول گیاهی در پاسخ به تنش خشکی و شوری شروع به سنتز و تجمع برخی از آمینواسیدها از قبیل پرولین می نماید (Masinde et al., 2005). اگرچه تأثیر سیلیکون در افزایش میزان پرولین در بافت گیاهان تحت تنش خشکی گزارش شده است (Gunes et al., 2008; Crusciol et al., 2009)، ولی در این تحقیق با افزایش غلظت نانوذرات دی اکسید سیلیکون میزان پرولین برگ کاهش یافت. اگرچه بیشترین میزان پرولین در تیمار ۵۰۰ میلی گرم در لیتر با تغذیه نانوذرات دی اکسید تیتانیوم ثبت شد، ولی روند قابل ملاحظه‌ای در رابطه با غلظت های آن مشاهده نشد.

آنچه از نتایج تحقیق حاضر بر می آید این است که تغذیه نهال های گلابی وحشی با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و سیلیکون قبل از تنش خشکی نه تنها تأثیر سوء بر فعالیت های زیستی گیاه نداشته بلکه سبب بهبود عملکرد نهال ها در پاسخ به خشکی شد. از دیدگاه مقایسه دو نوع تغذیه، به نظر می رسد که نانوذرات دی اکسید سیلیکون در بهبود محتوای نسبی رطوبت و افزایش زی توده ریشه موفق تر بوده و در مقابل نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در بهبود توان آنتی اکسیدانتی نهال ها موفق تر بود. از آن جایی که بیشتر مطالعات در رابطه با نانوذرات در شرایط اپتیمم و بهینه رشد صورت گرفته و اطلاعات در زمینه استفاده در شرایط تنش بسیار اندک است (Mohammadi et al., 2013)، لذا به منظور درک صحیح از سازوکار آن‌ها به مطالعات عمیق به ویژه مطالعات مولکولی نیاز است.

سپاسگزاری: بر حسب وظیفه از حمایت های تشویقی ستاد ویژه توسعه فناوری نانو تشکر و قدردانی می شود.

منابع

جابرزاده، ا.، معاونی، پ.، توحیدی مقدم، ح.ر.، مرادی، ا. (۱۳۸۹) بررسی اثر محلول پاشی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر روی برخی خصوصیات زراعی در گندم تحت شرایط تنش خشکی. فصلنامه علمی-پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، ۲(۴): ۲۹۵-۳۰۱.

کوچکی، ع. (۱۳۷۰) اکولوژی گیاهان زراعی. انتشارات جهاد کشاورزی، مشهد.

Arndt, S.K., Clifford, S.C., Wanek, W., Jones, H.G. and Popp, M. (2001) Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiology* 21(11): 705-715.

Ashkavand, P., Tabari, M., Zarafshar, M., Tomášková, I. and Struve, D. (2015) Effect of SiO₂ nanoparticles on drought resistance in hawthorn seedlings. *Forest Research Papers* 76(4): 350-359.

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39(1): 205-207.

Berahmand, A.A., Panahi, A.G., Sahabi, H., Feizi, H., Moghaddam, P.R., Shahtahmassebi, N. ... and Gallehgir, O. (2012) Effects silver nanoparticles and magnetic field on growth of fodder maize (*Zea mays* L.). *Biological trace element research* 149(3): 419-424.

Biswas, P. and Wu, C.Y. (2005) Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air & Waste Management Association* 55(6): 708-746.

Braunack, M.V. (1995) Effect of aggregate size and soil water content on emergence of soybean (*Glycine max* L.) and maize (*Zea mays* L.). *Soil & Tillage Research* 33: 149-161.

Campos, P.S., Nia Quartin, V., Chicho Ramalho, J. and Nunes, M.A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of plant physiology* 160(3): 283-292.

Carvajal, M. and Alcaraz, C.F. (1998) Why titanium is a beneficial element for plants. *Journal of Plant Nutrition* 21(4): 655-664.

Crusciol, C.A., Pulz, A.L., Lemos, L.B., Soratto, R.P. and Lima, G.P. (2009) Effects of sili-

- con and drought stress on tuber yield and leaf biochemical characteristics in potato. *Crop science* 49(3): 949-954.
- Ebermann, R. and Stich, K. (1982) Peroxidase and amylase isoenzymes in the sapwood and heartwood of trees. *Phytochemistry* 21(9): 2401-2402.
- Epstein, E. (2009) Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology* 155: 155-160.
- Epstein, E. and Bloom, A.J. (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Feizi, H., Kamali, M., Jafari, L. and Moghaddam, P.R. (2013) Phytotoxicity and stimulatory impacts of nanosized and bulk titanium dioxide on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Chemosphere* 91(4): 506-511.
- Gao, J., Xu, G., Qian, H., Liu, P., Zhao, P. and Hu, Y. (2013) Effects of nano-TiO₂ on photosynthetic characteristics of *Ulmus elongata* seedlings. *Environmental pollution* 176: 63-70.
- Gao, X., Zou, C., Wang, L. and Zhang, F. (2005) Silicon improves water use efficiency in maize plants. *Journal of plant nutrition* 27(8): 1457-1470.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S. and Zhang, C. (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science* 169(2): 313-321.
- Gunes, A., Pilbeam, D.J., Inal, A. and Coban, S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms, and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39(13-14): 1885-1903.
- Haghighi, M. and Pessarakli M. (2013) Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. *Scientia Horticulturae* 161:111-117.
- Haghighi, M., Afifpour, Z. and Mozafarian, M. (2012) The effect of N-Si on tomato seed germination under salinity levels. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 6(16): 87-90.
- Jiang, Y. and Huang, N. (2001) Drought and Heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop sci-*

- ence 41:436-442.
- Kaya, C., Tuna L. and Higgs, D. (2006) Effect of silicon on plant growth and mineral nutrition of maize grown under water-stress conditions. *Journal of Plant Nutrition* 29:1469-1480.
- Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C. ... and Fashui, H. (2008) Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research* 121(1): 69-79.
- Lu, C., Zhang, C., Wen, J., Wu, G. and Tao, M. (2001) Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Science* 21(3): 168-171.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. and Kolmakov, A. (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment* 408(16): 3053-3061.
- Martinez, J.P., Silva, H.F.L.J., Ledent, J.F. and Pinto, M. (2007) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 26(1): 30-38.
- Masinde, P.W., Stützel, H., Agong, S.G. and Fricke, A. (2005) Plant growth, water relations, and transpiration of spiderplant [*Gynandropsis gynandra* (L.) Briq.] under water-limited conditions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(3): 469-477.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L. and Davy, A.J. (2013) Silicon alleviates deleterious effects of high salinity on the halophytic grass *Spartina densiflora*. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 115-121.
- Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Xiaoqing, L., Liang, C., Hao, H. and Fashui, H. (2007) Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO₂. *Biological trace element research* 119(2): 183-192.
- Mohammadi, R., Maali-Amiri, R. and Abbasi, A. (2013) Effect of TiO₂ nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biological trace element research* 152(3):

403-410.

- Monica, R.C. and Cremonini R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62 (2):161-165.
- Moraru, C.I., Panchapakesan, C.P., Huang, Q., Takhistov, P., Sean, L. and Kokini, J.L. (2003) Nanotechnology: a new frontier in food science. *Food Technology* 57(12): 24-29.
- Pais, I. (1983) The biological importance of titanium. *Journal of Plant Nutrition* 6(1): 3-131.
- Qi, M., Liu, Y. and Li, T. (2013) Nano-TiO₂ improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress. *Biological trace element research* 156(1-3): 323-328.
- Richmond, K.E. and Sussman. M. (2003) Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology* 6:268-272.
- Sacala, E. (2009) Role of silicon in plant resistance to water stress. *Journal of Elementology* 14(3): 619-630.
- Seeger, E.M., Baun, A., Kästner, M. and Trapp, S. (2009) Insignificant acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to willow trees. *Journal of Soils and Sediments* 9(1): 46-53.
- Wang, J. and Naser. N. (1994) Improved performance of carbon paste amperometric biosensors through the incorporation of fumed silica. *Electroanalysis* 6:571-575.
- Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askari, H., Hosseini, S.M., Rahaie, M., Struve, D. and Striker, G.G. (2014) Morphological, physiological and biochemical responses to soil water deficit in seedlings of three populations of wild pear (*Pyrus boissieriana*). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 18:353-366.
- Zhang, J. and Kirkham, M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology* 35(5): 785-791.