

Evaluation of Morphophysiological and Biochemical Characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni Treated with Proline Nanoparticles and Liquid Fish Waste Fertilizer in Salinity Stress

Z. Mahdavi¹, B. Esmailpour^{1*}, R. Azarmi¹

1- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(*- Corresponding author's Email: Esmailpour@uma.ac.ir)

Received: 24 July 2025
Revised: 08 October 2025
Accepted: 04 November 2025
Available Online: 04 November 2025

How to cite this article:

Mahdavi, Z., Esmailpour, B., & Azarmi, R. (2026). Evaluation of morphophysiological and biochemical characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with proline nanoparticles and liquid fish waste fertilizer in salinity stress. *Journal of Horticultural Science*, 40(3), 433-451. (In Persian).
<https://doi.org/10.22067/jhs.2025.94616.1446>

Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni is plant perennial medicinal of the Asteraceae (Compositae) family. Stevia plants contain many compounds with medicinal properties, importantly steviol glycosides (e.g., stevioside and dulcoside), in the leaves and shoots that are used as natural and useful sweeteners in the food industry. These sweeteners are 30 to 400 times sweeter than glucose and sucrose and calorie-free. Salinity stress causes major constraints factor affects crop production in world. The adverse effects of salinity stress on plant growth can be related to factors e.g. induced osmotic stress and ionic imbalance. Ionic imbalance is due to high presence of sodium and chloride. There are several strategies for reduce salt effects in plants that including have been used biofertilizers, organic fertilizers and nanoparticles. Nanoparticles (NPs) as one of the most important effective methods, to reduce salinity stress condition. Proline (Pro) is one of compatible solutes and cellular protector accumulated in response to abiotic stress. Organic fertilizers reduce reduces the harmful effects of chemical fertilizer and improve the chemical, biological structure of soils, leading to increased crop yield. Fish processing waste is rich in essential proteins, macro and micronutrients that causes reduced salinity stress.

Materials and Method

Stevia seedlings were purchased from a medicinal plant greenhouse (Zargiah) in Shiraz city and planted in 12 L pots. This study was conducted in a factorial experiment and based on a completely randomized design with four replications in the spring-summer of 2022. Planting bed includes containing a mixture of cocopeat and perlite. The plants were first irrigated with half-strength Hoagland's solution and then irrigated with full-strength nutrient solution. The first factor was salinity stress at four levels (0, 30, 60, 90 mM NaCl) and the second factor salinity reducer at five levels (control, 15 and 30 mg.L⁻¹ glycine betaine without liquid fish waste fertilizer, 15 and 30 mg.L⁻¹ glycine betaine with 15% (v/v) liquid fish waste fertilizer). Then growth parameters, relative water content, a* and b* color indices and total phenol, hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), proline, and total carbohydrates were measured. Data were analyzed using SAS 9.1 software by analyzing the means using Duncan's multiple range test, with a significant difference level at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Salinity stress significantly decreased plant growth traits. Salinity, increased proline and total phenols, MDA, H₂O₂, EL compared with the control. Fish waste fertilizer with proline nanoparticles increased



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/jhs.2025.94616.1446>

morphological parameters, RWC, proline, phenols, sugar, and reduced EL, MDA, and H_2O_2 . Salinity stress caused a 39% reduction in plant height, 50.24% in root fresh weight, 70.93% in root dry weight, 46.15% in relative water content, 55.93% in a^* color, 51.16% in b^* color, 39.44% in proline, 71.68% total carbohydrate, 42.7% by phenol and 73.33% by hydrogen peroxide by compared to the control. The application of 20 mg.L^{-1} proline nanoparticles simultaneous with liquid fish waste fertilizer resulted in reduction a 31.7% by membrane electrolyte leakage, 56.66% by root sodium, and an increase of 78.23% proline, 72.98% by total carbohydrate, 71.42% root potassium, and 62.45% by root calcium under 90 mM salinity stress compared to the control treatment.

Conclusion

Results showed that salinity due to accumulation in Na^+ and disruption to the absorption of essential nutrients especially N and K, negatively affected plant growth and yield and overall. Proline and fish waste bio-fertilizer with increase in potassium causes open of the stomata, increase of photosynthesis and plant growth. Application of proline especially when used at a concentration of $20\text{ (mg.L}^{-1}\text{)}$ and fish waste bio-fertilizer could be considered as a sustainable, for the mitigating of salinity stress effects in stevia plants and potentially other crops.

Keyword: Growth characteristics, Organic fertilizer, Sodium chloride, Total carbohydrates

ارزیابی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) تیمارشده با نانوذرات پرولین و کود ضایعات ماهی در پاسخ به تنش شوری

زهرا مهدوی^{۱*} - بهروز اسماعیل‌پور^۱ - رسول آذر می^۱ 

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۳

چکیده

شوری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات جهان به شمار می‌آید. خاک شور باعث کاهش رشد و عملکرد در گیاهان می‌شود. کاربرد نانوذرات و کودهای آلی از جمله روش‌های نوین برای کاهش اثرات تنش شوری هستند. به این منظور، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. تیمارهای مختلف در این آزمایش محلول‌پاشی تعدیل‌کننده‌های شوری در پنج سطح (شاهد، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی ۱۵ درصد) بود. تنش شوری به‌صورت نمک سدیم - کلرید در غلظت‌های مختلف (صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ میلی‌مولار) اعمال گردید. نتایج نشان داد که شوری شاخص‌های رشد و محتوای نسبی آب را کاهش داده و رنگیزه a^* و b^* را تحت تأثیر قرار داده و فعالیت فنل کل، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، مالون دی‌آلدئید (MDA)، پرولین و کربوهیدرات‌های کل را در مقایسه با نمونه‌های شاهد افزایش داد. تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار باعث افزایش ۷۱/۶۸ درصدی کربوهیدرات کل، ۷۳/۳۳ درصدی پراکسید هیدروژن، ۶۷/۴۴ درصدی مالون دی‌آلدئید و ۴۴/۳۹ درصدی محتوای پرولین نسبت به شاهد شد. کاربرد هم‌زمان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات پرولین با کود ضایعات ماهی منجر به کاهش ۳۱/۷ درصدی نشت الکترولیت غشاء، ۵۶/۶۶ درصدی سدیم ریشه و افزایش ۷۸/۲۳ درصدی پرولین، ۷۲/۹۸ درصدی کربوهیدرات کل، ۷۱/۴۲ درصدی پتاسیم ریشه و ۶۲/۴۵ درصدی کلسیم ریشه تحت تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد شد. به‌طور کلی، کاربرد نانوذره پرولین همراه با کود مایع ضایعات ماهی، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار جدید برای کاهش اثرات تنش شوری در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) و سایر محصولات زراعی و باغی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: خصوصیات رشد، سدیم کلرید، کربوهیدرات کل، کود آلی

مقدمه

شیرین‌کننده‌های گلیکوزیدی استیوبول مانند استیوبوزید و ریبودیوزید A هستند، کشت می‌شود. استفاده از این ترکیبات به‌عنوان یک جایگزین طبیعی و سالم برای شکر و شیرین‌کننده‌های مصنوعی، در سال ۲۰۱۱ توسط مقررات کمیسیون اتحادیه اروپا تأیید شده است. استویا در صنایع نوشیدنی و غذایی اهمیت دارد. همچنین این گیاه به‌دلیل اثرات کاهنده قند خون، کاهنده چربی خون، ضد فشار خون، ضد التهاب و ضد تکثیر در سلول‌های سرطانی از نظر درمانی اهمیت دارد و دارای اثرات ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی است (Rojas et al., 2018). تنش‌های محیطی از عوامل محدودکننده اصلی هستند که بر تولید محصولات کشاورزی، کیفیت غذا و امنیت غذایی و تغذیه‌ای جهان تأثیر می‌گذارند. شور شدن آب و خاک، مضرترین مسئله گسترده زیست‌محیطی است که بهره‌وری محصولات کشاورزی را محدود می‌کند. شوری به غلظت نمک‌های

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)، متعلق به خانواده Asteraceae (Compositae)، یک گیاه دارویی و معطر علفی و درختچه بومی برزیل و پاراگوئه است (Kurunc et al., 2020). استان‌های گیلان و مازندران از بهترین شرایط محیطی کشت استویا در ایران به شمار می‌روند، همچنین این گیاه در برخی از شهرهای استان‌های فارس و اصفهان نیز کشت می‌شود (Seraj et al., 2016). این گیاه به‌دلیل برگ‌های شیرینش که حاوی

۱- گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، شهر اردبیل، ایران

(*)- نویسنده مسئول: Email:Esmailpour@uma.ac.ir
<https://doi.org/10.22067/jhs.2025.94616.1446>

معدنی محلول موجود در خاک‌ها (محلول خاک) و آب‌ها گفته می‌شود. بیش از نیمی از زمین‌های کشاورزی جهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک قرار دارند و گرمایش جهانی، شدت و فراوانی خشکسالی و شرایط شور را افزایش می‌دهد. سدیم کلرید، رایج‌ترین نمکی است که در خاک‌ها و آب‌های شور یافت می‌شود، همراه با نمک‌های کلرید، سولفات و کربنات کلسیم، منیزیم و سدیم موجب ایجاد شوری می‌شوند (Riaz et al., 2021). تنش شوری، تنش اسمزی، سمیت یونی و تنش اکسیداتیو را در محصولات کشاورزی ایجاد می‌کند و متعاقب آن ترکیب این تنش‌ها، رشد و نمو گیاهان را از طریق تغییرات در ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی به‌شدت مختل می‌کند. پاسخ‌های گیاه به شوری را می‌توان به گروه‌های زیر تقسیم کرد: پاسخ مستقل از یون که در ساعات اولیه پس از مواجهه رخ می‌دهد و با بسته شدن روزنه‌ها و مهار گسترش سلول‌ها، عمدتاً در ساقه و رشد کلی گیاه مشخص می‌شود و پاسخ وابسته به یون که طی روزها یا حتی هفته‌ها رخ می‌دهد و با کُند شدن فرآیندهای متابولیکی، پیری زودرس و در نهایت مرگ سلولی مشخص می‌شود. بنابراین، یافتن رویکردی جدید برای افزایش مقاومت گیاه در برابر شوری بسیار مهم است (Bahari Saravi et al., 2022). اخیراً مطالعات متعددی در مورد اثرات مضر شوری بر استویا انجام شده است. در این مطالعات مشخص شد که گیاهان استویا تحت تأثیر سطوح مختلف شوری قرار گرفته و این گیاه نسبت به تنش شوری نسبتاً حساس است (Forouzi et al., 2020). نانومواد، که ذراتی با اندازه یک میلیارد متر هستند، دارای مساحت سطح قابل توجهی هستند و واکنش‌پذیری بالایی را در چندین فرآیند بیولوژیکی نشان می‌دهند. علاوه بر این، این مواد از نظر زیست‌محیطی مفید هستند (Ayman et al., 2020). پرولین یک اسید آمینه پروتئین‌زا است که به‌عنوان یک محلول مفید در گیاهان در شرایط بدون تنش و تنش انباشته می‌شود. تجمع پرولین به‌طور طبیعی در سیتوپلاسم رخ می‌دهد، جایی که به‌عنوان یک محافظ اسمزی برای دفاع در برابر تنش اسمزی عمل می‌کند. سطح بالای پرولین در سیتوزول، پتانسیل آب سلولی را به زیر پتانسیل آب خارجی کاهش می‌دهد و جریان آب به داخل سلول‌ها را برای حفظ وضعیت آب سلولی و تورژسانس سلول‌های گیاهی افزایش می‌دهد (de Freitas et al., 2019). پرولین علاوه بر عمل به‌عنوان یک اسمولیت برای تنظیم اسمزی، در تثبیت ساختارهای زیر سلولی (به‌عنوان مثال، پروتئین‌ها و غشاها) نقش دارد و پتانسیل ردوکس سلولی را در برابر تنش‌ها تنظیم می‌کند. همچنین گزارش شده است که پرولین در کاهش اثرات مضر اکسیژن فعال نقش دارد، سازگاری نسبت $NADP^+/NADPH$ را حفظ کرده و pH سیتوپلاسمی را کاهش

می‌دهد (Hosseinifard et al., 2022). در هنگام تنش، پرولین از فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری برای تولید انرژی برای گیاهان جهت بهبودی از تنش پشتیبانی می‌کند. در گیاهان عالی، پرولین از طریق مسیرهای گلوتامات یا اورنیتین سنتز می‌شود. گزارش شده است که محتوای پرولین در بسیاری از گیاهان در طول تنش شوری افزایش می‌یابد. تجمع پرولین تحت تنش شوری عمدتاً به‌دلیل سنتز تحریک‌شده در بافت، مهار اکسیداسیون پرولین در میتوکندری و توانایی گیاه در حفظ نفوذپذیری غشای میتوکندری رخ می‌دهد (Dai et al., 2018). از دیگر روش‌های کاهش شوری، استفاده از کودهای آلی می‌باشد. در سال ۲۰۱۸، تولید جهانی ماهی به ۱۷۹ میلیون تن رسید که ۱۵۶ میلیون تن از آن برای مصرف انسان استفاده می‌شود. هر ساله حدود ۲۵ درصد از کل ماهی‌های صیدشده در جهان برای مصرف، به‌عنوان ضایعات دور ریخته می‌شوند. این ضایعات که شامل استخوان‌ها، پوسته، پوسته، روده، باله، سر، دم و پوست است، عمدتاً به‌عنوان ماده اولیه برای تولید روغن ماهی و پودر ماهی استفاده می‌شود (Maschmeyer et al., 2020). اهمیت فضولات ماهی به‌دلیل محتوای بالای پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه‌های، گلوتامین، گلیسین-بتائین و غیره، پپتیدها، کلاژن، و مواد معدنی مانند نیتروژن، فسفر، پتاسیم و سایر درشت مغذی‌ها و آنزیم‌هایی مانند پروتئازها و غیره است (Mahdavi et al., 2024). از آنجایی که اثرات مثبت کاربرد هم‌زمان نانوذره و کود مایع ضایعات ماهی در رشد گیاه و کاهش اثرات تنش‌های محیطی در گیاهان بررسی نشده است. از این‌رو این آزمایش اثرات هم‌زمان نانوذره (پرولین) و کود مایع ضایعات ماهی را بر خصوصیات ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا در شرایط تنش شوری بررسی کرده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت فاکتوریل و در چهار تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی طی سال ۱۴۰۱ به‌صورت کشت هیدروپونیک انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل تنش شوری در چهار سطح (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) و عامل دوم محلول‌پاشی تعدیل‌کننده‌های شوری در پنج سطح (شاهد، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی ۱۵ درصد) بود. برای تهیه محلول نانوذره پرولین از روش هیدروترمال استفاده گردید که برای این کار حدود دو گرم اسید سیتریک با ۰/۵ گرم پرولین توسط ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در بشر شیشه‌ای (۲۵ میلی‌لیتر) مخلوط گشت. سپس محلول در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت داخل اتوکلاو با پوشش

$$RWC \% = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100 \quad (1)$$

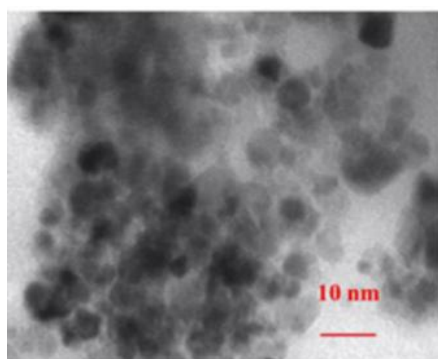
برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن، ابتدا وزن تر گیاه (۰/۱ گرم) در دو میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (۰/۱ درصد) همگن گردید. سپس حدود ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۷) و دو میلی‌لیتر پتاسیم یدید (یک میلی‌مولار) و ۵۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی در فالكون ریخته شد. مقدار جذب محلول در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل Hitachi (U-2910) قرائت گردید. در نهایت، از منحنی استاندارد پراکسید هیدروژن برای تعیین مقدار واقعی پراکسید هیدروژن استفاده شد (Sergiev et al., 1997). برای تعیین مقدار مالون دی‌آلدئید در اندام‌هوایی گیاه استویا به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، بافت تازه برگ (۰/۱ گرم) در دو میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (۰/۱ درصد) همگن گردید. مخلوط واکنش شامل ۵۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه استویا به همراه یک میلی‌لیتر تیوباریوتیک اسید ۰/۵ درصد حاوی تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد بود. میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Hitachi (U-2910) قرائت شد (Heath & Packer, 1968). برای اندازه‌گیری نشت الکترولیت غشاء از روش ردمان و همکاران (Redman et al., 1986) استفاده شد. براساس الکتریکی (Hanna, HI98192, Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, RI, USA) تعیین گردید. پس از جمع‌آوری ۱۵ دیسک (قطر ۰/۵ سانتی‌متر) به‌طور تصادفی از برگ‌ها و انکوباسیون با ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه در دمای محیط (۲۴ ساعت)، هدایت الکتریکی اولیه (EC1) ثبت شد. رسانایی نهایی (EC2) پس از قرار دادن نمونه‌ها در اتوکلاو (۲۰ دقیقه) و سرد شدن اندازه‌گیری گردید. در نهایت، EL به‌وسیله معادله ۲ محاسبه شد.

$$EL (\%) = (EC1/EC2) \times 100 \quad (2)$$

تفلون گرم شد. بعد از رسیدن دمای محلول به دمای اتاق، مقدار اسیدیت محلول به‌وسیله سدیم هیدروکسید روی عدد هفت تنظیم گردید (Gohari et al., 2021). تصاویر TEM از نانو ذرات پرولین در شکل ۱ آورده شده است.

ضایعات ماهی شامل سر، دم و باله گونه ماهی آزاد (*Hypophthalmichthys molitrix*) ابتدا در سایه خشک شد و بعد از آسیاب شدن، پودر حاصل به نسبت ۵:۱ با آب مقطر مخلوط گردید و حدود ۳۵ میلی‌لیتر باکتری هیدرولیزکننده پروتئین (*Bacillus licheniformis*) و حدود ۱۵۰ گرم گلوکز برای هر لیتر اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Whiting et al., 2005). برای جداسازی فاز مایع از جامد از فیلترهای غشایی (Filtration-Micro MF) استفاده شد. میزان عناصر موجود کود مایع ضایعات ماهی (جدول ۱) و میزان اسیدهای آمینه کل و اسید آمینه آزاد در جدول ۲ ارائه شده است.

صفات ارتفاع بوته، تعداد برگ، وزن تر و خشک ریشه و طول ریشه به‌عنوان صفات ریخت‌شناختی ثبت گردید. برای به‌دست آوردن ماده خشک ریشه، ریشه تر گیاه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز در دستگاه آون قرار داده شد. برای اندازه‌گیری تغییر رنگ برگ‌های گیاه (شاخص رنگیزه a^* ، b^*) از دستگاه رنگ‌سنج (Minolta و مدل CR-400) استفاده گردید. شاخص هدایت روزنه‌ای در ساعت ۹ تا ۱۱ صبح با استفاده از دستگاه پرومتر و میانگین آن از حدود شش برگ بالغ از هر گلدان به دست آمد. برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (Ritchie et al., 1990)، ۱۰ عدد دیسک برگ (قطر ۱۰ میلی‌متر) از هر گیاه به‌صورت تصادفی انتخاب شد و وزن تر (FW) آن ثبت گردید. برای اندازه‌گیری وزن تورژسانس (TW) برگ‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار داده شدند. نمونه‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند تا وزن خشک آن‌ها (DW) به دست آید. مقدار محتوای نسبی آب از طریق معادله ۱ محاسبه شد.



شکل ۱- تصاویر TEM از نانو ذرات پرولین

Figure 1- TEM images of proline nanoparticles

جدول ۱- ترکیب عناصر غذایی کود مایع ضایعات ماهی

Table 1- The composition of major nutrients of fish waste bio-fertilizer

نمونه Sample	کلسیم اکسید CaO (%)	دی فسفر پنتاکسید P ₂ O ₅ (%)	پتاسیم اکسید K ₂ O (%)	سدیم Na (%)	کربن آلی Organic C (%)
	1.801	9.164	7.58	6.02	12

جدول ۲- ترکیب اسیدهای آمینه در کود مایع ضایعات ماهی

Table 2- Amino acid composition of fish waste liquid fertilizer

اسید آمینه Amino acid	اسید آمینه آزاد Free amino acid (mg AA.g ⁻¹ sample)	اسید آمینه کل Total amino acid (mg AA.g ⁻¹ sample)
اسید آسپارتیک Aspartic acid	0.7	1.36
اسید گلوتامیک Glutamic acid	1.49	3.57
سرین Serine	0.17	0.87
گلیسین Glycine	1.08	3.42
هیستیدین Histidine	0.15	0.48
آسپارژین Arginine	0.33	1.02
ترونین Threonine	0.14	0.84
آلانین Alanine	1.39	2.77
پرولین Proline	0.61	1.86
تیروزین Tyrosine	0.48	0.48
والین Valine	0.72	1.63
متیونین Methionine	0.26	0.51
سیستئین Cysteine	0.00	0.00
ایزولوسین Isoleucine	0.47	0.94
لوسین Leucine	0.98	1.7
فنیل آلانین Phenylalanine	0.41	0.83
لیزین Lysine	0.28	0.92

اسپکتروفتومتر مدل Hitachi (U-2910) در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. سپس مقدار پرولین با استفاده از نمودار استاندارد تعیین گردید (Bates et al., 1973). برای اندازه‌گیری محتوای فنول کل تقریباً ۰/۱ گرم از وزن تازه اندام‌هوایی گیاهی در دو میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد همگن گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی، ۵۰۰

برای اندازه‌گیری محتوای پرولین، مقدار ۰/۱ گرم بافت برگ تازه در دو میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید سه درصد همگن شدند. مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر عصاره گیاهی، یک میلی‌لیتر اسید نین هیدرین، یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال بود. حدود سه میلی‌لیتر تولوئن برای جداسازی دو فاز استفاده شد. جذب با استفاده از

اندازه‌گیری گردید. غلظت کلسیم به وسیله ابزار جذب اتمی اندازه‌گیری شد (Chapman & Pratt, 1961). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس حاصل از تأثیر تیمارهای تنش شوری و محلول‌پاشی کود مایع ضایعات ماهی به همراه نانوذره پرولین نشان داد که تأثیر تنش شوری بر صفات ارتفاع بوته، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، طول ریشه، محتوای نسبی آب برگ، نسبت الکترولیت غشاء، هدایت روزنه‌ای، رنگیزه a, b در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار ($p \leq 0/01$) بود. تأثیر محلول‌پاشی کود مایع ضایعات ماهی به همراه نانوذره پرولین بر صفات ارتفاع بوته، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، طول ریشه، محتوای نسبی آب برگ، نسبت الکترولیت غشاء، هدایت روزنه‌ای، رنگیزه a و b، در سطح احتمال یک درصد ($0/01$) معنی‌دار بود. اثر متقابل تنش شوری و محلول‌پاشی کود مایع ضایعات و نانوذره پرولین ماهی برای هیچ‌کدام از صفات اندازه‌گیری شده به جز وزن خشک ریشه، نسبت الکترولیت غشاء، رنگیزه a و b در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0/01$) تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

میکرولیتر اتانول (۹۶ درصد) اضافه گردید و با آب مقطر به حجم ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به این مخلوط، معرف فولین ۱۰ درصد و سدیم کربنات پنج درصد اضافه گردید و بعد از یک ساعت تاریکی در دمای اتاق، جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت شد. نتایج به صورت میلی گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم وزن تازه بیان گردید (Xu et al., 2010). مقدار کربوهیدرات‌های محلول با استفاده از معرف آنترون به روش توصیف‌شده توسط اوموکولو و همکاران (Omokolo et al., 1992) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ با پنج میلی‌لیتر اتانول (۸۰ درصد) همگن گردید و در آب جوش (۱۰ دقیقه) قرار گرفت و پس از جداسازی فاز مایع از جامد، فاز جامد با پنج میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط گشت و در آب جوش (۱۰ دقیقه) قرار گرفت. سپس عصاره‌ها جمع‌آوری شده و تا رسیدن حجم عصاره به یک پنجم مقدار اولیه در دمای ۷۰ درجه قرار داده شدند. پس از سانتریفیوژ، سه میلی‌لیتر معرف آنترون به عصاره تهیه‌شده اضافه گردید و جذب در ۶۲۰ نانومتر ثبت شد. در نهایت، غلظت گلوکز با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید. برای اندازه‌گیری عناصر غذایی، ابتدا نمونه‌های ریشه گیاهی بعد از شست‌وشو با آب دیونیزه در دمای ۶۰ درجه داخل آون خشک شده و سپس توسط آسیاب پودر شده و در آون با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار ساعت خاکستر شدند. به دنبال آن، توسط اسید هیدروکلریک دو نرمال هضم گردید و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت سدیم و پتاسیم با استفاده از فلیم فوتمتر

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کاربرد تعدیل‌کننده‌های تنش بر خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی استویا تحت تنش شوری
Table 3- ANOVA for the effect of stress modulator application on morphophysiology and physiological characteristics of stevia under salinity stress conditions

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares			
		طول ریشه Root length (cm)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	ارتفاع بوته Shoot length (cm)
تنش شوری Salinity stress	3	606.3 **	153.54 **	2868.15 **	3265.9 **
تعدیل‌کننده تنش Stress modulator	4	20.48 **	12.68 **	68.4 **	211.9 **
تعدیل‌کننده تنش × تنش شوری Salinity stress × stress modulator	12	0.14 ns	0.71 **	2.97 ns	0.2 ns
خطا Error	6	0.51	0.26	7.72	27.23
ضریب تغییرات CV (%)		5.67	8.58	7.16	8.87

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: non-significant, and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

ادامه جدول ۳- تجزیه واریانس اثر کاربرد تعدیل کننده های تنش بر خصوصیات ریخت شناختی و فیزیولوژیکی گیاه استویا تحت تنش شوری
Continued Table 3- ANOVA for the effect of stress modulator application on morphophysiology and physiological characteristics of stevia under salinity stress conditions

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		محتوای نسبی آب Relative water content (%)	نشت الکترولیت غشاء Membrane electrolyte leakage(%)	هدایت روزنه ای Stomatal conductance	رنگیزه a Pigment a	رنگیزه b Pigment b
تنش شوری Salinity stress	3	0.47 **	8039.2 **	84.3 **	109.84 **	281.05 **
تعدیل کننده تنش Stress modulator	4	0.07 **	433.47 **	16.37 **	8.28 **	10.29 **
تعدیل کننده تنش × تنش شوری Salinity stress × stress modulator	12	0.0005 ns	118.23 **	0.4 ns	0.58 **	0.68 **
خطا Error	6	0.0015	32.48	0.34	0.22	0.2
ضریب تغییرات CV (%)		6.43	14.32	7.4	5.03	3.017

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی دار، و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: non-significant, and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

ویژگی های ریخت شناختی

براساس جدول مقایسه میانگین اثرات اصلی، با افزایش شوری از صفر به ۹۰ میلی مولار، ارتفاع بوته ۳۹ درصد (بیشترین ۷۴/۱ سانتی متر و کمترین مقدار ۴۴/۹ سانتی متر) کاهش یافت. غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش ۱۳/۹۴ درصد و محلول پاشی نانوذره پرولین به تنهایی موجب افزایش ۷/۱۵ درصد ارتفاع بوته نسبت عدم کاربرد تعدیل کننده تنش شوری گردید (جدول ۴). طبق نتایج جدول مقایسه میانگین اثرات اصلی، وزن تر ریشه در گیاهان تیمار شده با ۹۰ میلی مولار شوری حدود ۵۰/۲۴ درصد نسبت به گیاهان بدون تنش شوری کاهش یافت. بالاترین میزان وزن تر ریشه در تیمار بدون شوری (۵۲/۵ گرم) و پایین ترین مقدار نیز در تیمار ۹۰ میلی مولار شوری (۲۶/۱۲ گرم) به دست آمد. محلول پاشی تعدیل کننده تنش شوری به ترتیب ۱۳/۵۵ درصد در محلول پاشی با نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی و ۵/۶ درصد نانوذره پرولین به تنهایی باعث افزایش میزان وزن تر ریشه شد (جدول ۴). بیشترین طول ریشه (۱۸/۴۶ سانتی متر) در گیاهان پرورش یافته در شرایط بدون تنش شوری حاصل شد و کمترین (۵/۷۳ سانتی متر) طول ریشه نیز در گیاهان با تنش شوری ۹۰ میلی مولار به دست آمد. بهترین نتیجه در مورد طول ریشه (۱۴/۰۸ سانتی متر) در تیمار ۲۰ میلی گرم نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی و کمترین مقدار آن (۱۱/۲۳ سانتی متر) در تیمار بدون کاربرد تعدیل کننده به دست آمد (جدول ۴). محتوای نسبی آب برگ گیاهان رشد یافته در تیمار ۹۰ میلی مولار

شوری در مقایسه با گیاهان شاهد ۴۶/۱۵ درصد کاهش یافت. در حالت کلی، کاربرد ۲۰ میلی گرم نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی و غلظت ۲۰ میلی گرم نانوذره پرولین به تنهایی باعث افزایش ۲۳/۵۲ و ۱۳/۳۳ درصد نسبت به عدم کاربرد تعدیل کننده شوری شد (جدول ۴). آنالیز داده های این آزمایش برای هدایت روزنه ای نشان داد که هدایت روزنه ای گیاهان رشد یافته در تیمار ۹۰ میلی مولار شوری در مقایسه با گیاهان شاهد ۴۵/۶۸ درصد (بالاترین ۱۰/۲ و کمترین ۵/۵۴ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) کاهش یافت. بهترین نتیجه در مورد هدایت روزنه ای (۹/۴ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در تیمار ۲۰ میلی گرم نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی و کمترین آن (۶/۸ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه) در تیمار بدون کاربرد تعدیل کننده به دست آمد (جدول ۴). براساس نتایج همین جدول، تنش ۹۰ میلی مولار شوری باعث کاهش ۷۰/۹۳ درصد وزن خشک ریشه نسبت به تیمار بدون شوری شد. کاربرد نانوذره پرولین ۲۰ میلی گرم بر لیتر به همراه کود مایع ضایعات ماهی باعث بهبود وزن خشک ریشه (به ترتیب ۲۷/۶۹ و ۴۲/۰۱ درصد) به ترتیب در تنش شوری ۶۰ و ۹۰ میلی مولار گردید و کاربرد نانوذره پرولین به تنهایی منجر به افزایش وزن خشک ریشه (به ترتیب ۸/۴۸ و ۲۰ درصد) به ترتیب در تنش شوری ۶۰ و ۹۰ میلی مولار شد (جدول ۵). تنش شوری باعث کاهش و رنگیزه های کلروفیل و در نتیجه آن کاهش فتوسنتز می شود. همچنین تنش شوری موجب کاهش محتوای نسبی آب برگ، جذب یون های معدنی ضروری مثل نیتروژن و پتاسیم و کلسیم و به طور همزمان تجمع سدیم شده و تمامی این

حفظ ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌شود. همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها موجب یکپارچگی اجزای غشاهای بیولوژیکی نظیر لیپیدها، پروتئین، غشای پلازما می‌شود. همین پایداری موجب افزایش رشد ریشه، افزایش جذب مواد غذایی و در نتیجه افزایش رشد اندام‌هوایی گیاه در شرایط تنش شوری می‌گردد (Awlia et al., 2021). کاربرد پرولین خارجی به‌صورت محلول‌پاشی اندام‌هوایی در شرایط تنش شوری، علاوه‌بر وزن خشک برگ‌ها و ریشه‌ها، محتوای پروتئین را در گیاهان ذرت افزایش داد (de Freitas et al., 2019). شرایط تنش در گیاهان ذرت (*Zea mays* L) محتوای نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در قسمت اندام‌هوایی و ریشه را کاهش داده است (Ali et al., 2008). در این مطالعه، کاربرد نانوذره پرولین موجب افزایش پرولین درون‌زا شده و بنابراین جذب تمام درشت‌مغذی‌ها را در شرایط تنش آبی افزایش داد. از طرفی، ضایعات ماهی تخمیرشده موجب رها شدن اسید فولویک و اسید هیومیک می‌شود که با تجزیه این مواد اکسین آزاد می‌گردد، ایجاد اکسین به همراه افزایش فسفر و پتاسیم و سایر عناصر غذایی ضروری باعث طویل شدن ریشه در گیاهان و در نتیجه افزایش دوباره جذب عناصر غذایی و معدنی و افزایش رشد گیاه می‌شود (Balraj et al., 2014). تحقیقات نشان داده است که کود مایع ضایعات ماهی باعث طویل شدن ریشه و بهبود رشد در گیاه پیاز (*Allium cepa*) (Metwally et al., 2021) و (*Prunus persica*) L. (Baldi & Tosek Li, 2013) شده است.

مسائل منجر به کاهش رشد می‌شود. از طرفی، شوری با کاهش سرعت فتوسنتز با به تأخیر انداختن روند گل‌دهی، کاهش باروری بعد از تلقیح و کاهش عملکرد، بر رشد رویشی و زایشی گیاهان تأثیر منفی دارد (Ahanger et al., 2019). تنش شوری موجب القای تنش اسمزی و تنش یونی در گیاهان می‌گردد. تنش اسمزی در نتیجه افزایش یون‌های سدیم در محلول خاک ایجاد می‌شود که منجر به کاهش جذب آب در منطقه ریزوسفر ریشه و در نهایت کاهش محتوای نسبی آب برگ می‌شود. این فرآیندهای مختلف، گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Awlia et al., 2021) تنش شوری با تأثیر بر دسترس بودن، جذب و حمل‌ونقل یون‌های مختلف در ایجاد اختلال در تقسیم سلولی نقش دارد و باعث کاهش رشد در شمار بسیاری از گیاهان از جمله فلفل (*Capsicum annuum*)، بادمجان (*Solanum melongena*)، گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) شده است (Balasubramaniam et al., 2023). پرولین، مولکولی با وزن کم است، و در تنش زیستی و غیرزیستی در سیتوپلاسم سلولی تجمع می‌یابد، تجمع این مولکول موجب حفظ اسیدیته سیتوزول شده و رشد سلولی را تنظیم می‌کند. پرولین با افزایش فشار اسمزی موجب باز شدن سلول‌های روزنه‌ای و افزایش ورود دی‌اکسیدکربن و بالا رفتن میزان فتوسنتز، و در نهایت سطح برگ و هدایت روزنه‌ای می‌گردد. پرولین با تولید آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی مختلف باعث حذف رادیکال‌های اکسیژن فعال و

جدول ۴- اثرات اصلی کود مایع ضایعات ماهی به همراه محلول‌پاشی نانوذره پرولین بر خصوصیات ریخت‌شناختی استویا تحت تنش شوری

Table 4- Effect of various concentrations of proline nanoparticles and fish waste fertilizer on morphophysiology characteristics of Stevia under salinity stress conditions

Characteristics of <i>Stevia</i> under salinity stress conditions						
تیمارها Treatment	ارتفاع بوته Shoot length (cm)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	طول ریشه Root dry weight(g)	محتوای نسبی آب Relative water content (%)	هدایت روزنه‌ای Stomatal conductance ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	
تنش شوری Salinity stress (mM)	0	74.1 ^a	52.5 ^a	18.46 ^a	0.78 ^a	10.2 ^a
	30	63.65 ^b	44.64 ^b	15.3 ^b	0.67 ^b	9 ^b
	60	52.55 ^c	31.9 ^c	11.15 ^c	0.54 ^c	7.14 ^c
	90	44.9 ^d	26.12 ^d	5.73 ^d	0.42 ^d	5.54 ^d
عدم استفاده Non-use	0	54.45 ^d	36.22 ^c	11.23 ^d	0.52 ^e	6.8 ^e
پرولین Proline	10	56.18 ^{cd}	38.16 ^{cb}	11.86 ^c	0.56 ^d	7.34 ^d
	20	58.62 ^{bc}	38.37 ^b	12.84 ^b	0.6 ^c	7.91 ^c
پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	61.5 ^{ab}	39.31 ^b	13.28 ^b	0.64 ^b	8.35 ^b
	20	63.25 ^a	41.9 ^a	14.08 ^a	0.68 ^a	9.4 ^a

* حروف مشترک در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

* Same letters indicate no significant differences ($p < 0.05$) based on Duncan's Multiple Range test.

جدول ۵- اثرات متقابل کود مایع ضایعات ماهی به همراه محلول پاشی نانوذره پرولین بر صفات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی استویا تحت تنش شوری

Table 5- The interaction effect of proline nanoparticles and fish waste fertilizer on morphophysiology and physiological characteristics of *Stevia* under salinity stress conditions

تنش شوری Salinity stress (mM)	تیمار Treatment	پرولین Proline (mg.L ⁻¹)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)	نشت الکترولیت غشاء Membrane electrolyte leakage (%)	رنگیزه a Pigment a	رنگیزه b Pigment b
0	عدم استفاده Non-use	0	8.12 ^d	29.07 ^{fgh}	-11.71 ^k	11/85 ^j
	پرولین	10	8.87 ^c	27.57 ^{fgh}	-12.21 ^k	11.45 ^j
	پرولین	20	9.27 ^{bc}	25.81 ^{gh}	-12.25 ^k	10.7 ^k
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪)	10	9.77 ^b	26.3 ^{gh}	-12.4 ^k	9/78 ^l
	Proline + fish fertilizer (15%)	20	11.9 ^a	24.29 ^h	-13.09 ^l	9.21 ^l
30	عدم استفاده Non-use	0	5.35 ^{gf}	42.89 ^{de}	-9.27 ^{gh}	14.5 ^{gh}
	پرولین	10	5.8 ^f	40.89 ^e	-9.77 ^{hi}	14.39 ^{gh}
	پرولین	20	6.58 ^e	38.09 ^{ef}	-9.84 ^{hi}	14.07 ^h
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪)	10	6.96 ^e	37.34 ^{ef}	-10.09 ⁱ	13/84 ^h
	Proline + fish fertilizer (15%)	20	7.8 ^d	35.8 ^{efg}	-10.86 ^j	13/19 ⁱ
60	عدم استفاده Non-use	0	4.1 ^{hi}	60.75 ^{bc}	-7.86 ^{de}	17/48 ^d
	پرولین	10	4.6 ^{ghi}	57.003 ^c	-8.36 ^{ef}	17/17 ^{de}
	پرولین	20	4.48 ^{hi}	55.78 ^c	-8.65 ^{fg}	16.67 ^e
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪)	10	4.88 ^{gh}	54.03 ^c	-8.55 ^{ef}	15.8 ^f
	Proline + fish fertilizer (15%)	20	5.67 ^f	51.9 ^{cd}	-9.53 ^{hi}	14.97 ^g
90	عدم استفاده Non-use	0	2.36 ^k	88.22 ^a	-5.16 ^a	20/63 ^a
	پرولین	10	2.86 ^{kj}	84.97 ^a	-5.91 ^b	19/58 ^b
	پرولین	20	2.95 ^{kj}	68.58 ^b	-7.07 ^c	18.83 ^c
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪)	10	3.23 ^j	61.08 ^{bc}	-7.42 ^{cd}	19.36 ^{bc}
	Proline + fish fertilizer (15%)	20	4.07 ⁱ	60.25 ^{bc}	-8.31 ^{ef}	18.86 ^c

* حروف مشترک در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

* Same letters indicate no significant differences ($p < 0.05$) based on Duncan's Multiple Range test.

رنگیزه a* و b*

به همراه کاربرد کود مایع ضایعات ماهی بود. بیشترین مقدار (۲۰/۶۳) نیز در تیمار ۹۰ میلی‌مولار و بدون تعدیل‌کننده شوری به دست آمد (جدول ۵). رنگیزه a* + رنگ قرمز و a* - سبز، b* + رنگ زرد و b* - آبی هستند. تنش شوری با افزایش اکسیژن فعال باعث کاهش کلروفیل (رنگ سبز) و افزایش رنگدانه‌های آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، بتاسیانین، بتازانتین و بتالین می‌شود که باعث رنگ قرمز و زرد می‌شود (Nazmul Hossain et al., 2022). این نتایج شبیه یافته‌های محققان است (Nazmul Hossain et al., 2022; Sarker & Oba, 2019). استفاده از نانوذرات پرولین منجر به کاهش اکسیژن فعال شده و با اثر اسمزی خود باعث افزایش جذب مواد مغذی نظیر منیزیم (عنصر مرکزی کلروفیل)، نیتروژن و پتاسیم می‌شود. این ماده همچنین با کاهش آنزیم کلروفیل‌از از کاهش کلروفیل (رنگ سبز) جلوگیری می‌کند (Merwad et al., 2018). کود مایع ضایعات ماهی به دلیل محتوای اسیدهای آمینه به‌ویژه پرولین و جذب مواد مغذی

تنش ۹۰ میلی‌مولار شوری باعث افزایش ۵۵/۹۳ درصد رنگیزه a نسبت به تیمار بدون شوری شد. بیشترین مقدار رنگیزه a (۵/۱۶-) در تیمار ۹۰ میلی‌مولار و بدون کاربرد تعدیل‌کننده شوری به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها در این سطح شوری داشت. به‌طوری که با افزایش غلظت نانوذره پرولین در شرایط با و بدون کاربرد کود مایع ضایعات ماهی، میزان این رنگیزه کاهش یافت. کم‌ترین میزان رنگیزه a (۱۳/۰۹-) در تیمار بدون تنش شوری و کاربرد غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین به همراه کاربرد کود مایع ضایعات ماهی به دست آمد که با سایر تیمار در این سطح شوری تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۵). براساس جدول مقایسه میانگین، تنش ۹۰ میلی‌مولار شوری باعث افزایش ۵۱/۱۶ درصد رنگیزه b نسبت به تیمار بدون شوری شد. کم‌ترین مقدار رنگیزه b (۹/۲۱) در تیمار بدون شوری و کاربرد غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین

شامل قندهای الکلی، ترکیبات آمونیاک چهارتایی، پرولین و ترکیبات سولفونیوم هستند. تنش شوری موجب بالا رفتن تولید قند و پرولین در گیاه گندم (*Triticum aestivum*) و اسفناج (*Spinacia oleracea*) شده است (Alikhani & Mahmudi Zarandi, 2019; Hu et al., 2016).

نقش مهم و حیاتی نانوذره پرولین، در قالب یک محافظ گیاهی، به‌خوبی در برابر عوامل تنش‌زای محیطی به‌طور کلی و تنش شوری به‌طور اختصاصی، مشخص شده است. این ماده با تنظیم فعالیت اسمزی مواد، حفظ پایداری غشاء، حذف و مهار اکسیژن فعال و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در تنش اسمزی مرتبط است. یکی از دلایل تحمل بالای گیاهان به تنش‌های مختلف می‌تواند به‌دلیل انباشته شدن پرولین و کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اسمزی و یون سدیم کلرید باشد (Zahedi et al., 2023). کاربرد نانوذره پرولین موجب بهبود محتوای پرولین گیاه خار مریم (*Silybum marianum*) شده است (Safikhan et al., 2018). همچنین کاربرد خارجی نانوذره پرولین منجر به افزایش محتوای پرولین در گیاهانی که تحت تنش شوری قرار گرفته‌اند، شده است (Zhao et al., 2020). کود مایع ضایعات ماهی دارای مقدار بالای اسیدآمینه پرولین است که باعث تعدیل تنش شوری در گیاه می‌شود. همچنین نیتروژن و فسفر موجود در کود مایع ضایعات ماهی موجب افزایش تولید پرولین می‌شوند (Fageria, 2009). وجود مواد آلی و اسیدآمینه در کود مایع ضایعات ماهی باعث بهبود رشد گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) شده است (El-Tarabily et al., 2003).

فسفر، منیزیم و نیتروژن، بیوسنتز کلروفیل (رنگ سبز) را در گیاهان افزایش می‌دهد (Ishak & Sarbon, 2017). این نتایج با یافته‌های شهبوسانی و همکاران (Shahsavani et al., 2017) هم‌خوانی دارد. براساس جدول تجزیه واریانس اثرات اصلی، فنول کل، کربوهیدرات کل، مالون دی‌آلدئید، هیدروژن پراکسید و پرولین در هر کدام از تیمارهای تنش شوری و تعدیل‌کننده تنش شوری (نانوذره پرولین به همراه کود ضایعات ماهی) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند. همچنین براساس این جدول، اثرات متقابل بین پراکسید هیدروژن، کربوهیدرات کل، پرولین، فنول کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند و اثرات متقابل شاخص مالون دی‌آلدئید سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بودند (جدول ۶).

پرولین

مطابق نتایج به‌دست‌آمده، افزایش غلظت شوری باعث افزایش مقدار پرولین گردید. به‌طوری که افزایش شوری از صفر به ۹۰ میلی‌مولار باعث افزایش ۴۴/۳۹ درصد پرولین شد. در تیمار ۹۰ میلی‌مولار تنش شوری، بالاترین میزان پرولین (۶۳/۵۴ میکروگرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی به دست آمد که افزایش ۷۸/۲۳ درصدی نسبت به شاهد داشت. کاربرد ۲۰ میلی‌گرم نانوذره پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش پرولین (۳۴/۷۶ درصد) نسبت به تیمار بدون تعدیل‌کننده شوری در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار شد (جدول ۷). شوری با کاهش آب سلولی باعث کاهش پتانسیل اسمزی سلولی می‌شود و گیاه برای مقابله با کاهش پتانسیل اسمزی، املاح سازگاری که دارای جرم مولکولی پایین هستند را سنتز می‌کنند. املاح سازگار

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر کاربرد تعدیل‌کننده‌های تنش بر خصوصیات بیوشیمیایی استویا تحت تنش شوری
Table 6- ANOVA for the effect stress modulator application on the physiological characteristics of Stevia under salinity stress conditions

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂	فنول Phenol	مالون دی‌آلدئید MDA	پرولین Proline	کربوهیدرات کل Total carbohydrates
تنش شوری Salinity stress	3	0.0044 **	12236.43 **	1.09 **	143.07 **	114532.12 **
تعدیل‌کننده تنش Stress modulator	4	0.00026 **	5268.87 **	0.05 **	178.56 **	11715.7 **
تعدیل‌کننده تنش × شوری Salinity stress × stress modulator	12	0.00024 **	674.24 **	0.0027 *	310.58 **	10411.99 **
خطا Error	6	0.000052	64.43	0.001	5.05	210.24
ضریب تغییرات CV (%)		6.85	8.22	7.03	10.68	9.1

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and **: non-significant, and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۷- اثرات متقابل کود مایع ضایعات ماهی به همراه محلول پاشی نانوذره پرولین بر میزان عناصر استویا تحت تنش شوری

Table 7- The interaction effect of proline nanoparticles and fish waste fertilizer on biochemical characteristics of Stevia under salinity stress conditions

تنش شوری Salinity stress (mM)	تیمار Treatment	پرولین Proline (mg.L ⁻¹)	پرولین Proline (μg.g ⁻¹)	پراکسید هیدروژن H ₂ O ₂ (μmol.g ⁻¹)	فنول Phenol (mg.g ⁻¹)	مالون دی آلدئید MDA (μmol.g ⁻¹)	کربوهیدرات کل Total carbohydrates (μg.g ⁻¹)
0	عدم استفاده Non-use	0	7.69 ^m	0.016 ^j	40.57 ^k	0.28 ^{jk}	36.98 ^l
	پرولین Proline	10	9.94 ^{ml}	0.015 ^j	43.57 ^k	0.25 ^{kl}	44.48 ^l
		20	12.7 ^{jkl}	0.015 ^j	49.85 ^{jk}	0.22 ^l	101.74 ^{jl}
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	13.95 ^{ijk}	0.014 ^j	55.6 ^{ij}	0.21 ^l	117.24 ^{hi}
		20	16.42 ^{ghi}	0.015 ^j	61.44 ^{hi}	0.2 ^l	162.8 ^f
30	عدم استفاده Non-use	0	13.92 ⁱ	0.034 ^{fg}	62.15 ^{hi}	0.48 ^g	74.37 ^k
	پرولین Proline	10	17.35 ^{ghi}	0.032 ^g	66.9 ^{gh}	0.41 ^h	81.12 ^{kj}
		20	20.308 ^{fgh}	0.028 ^h	73.65 ^{fg}	0.35 ⁱ	122.67 ^{hi}
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	20.29 ^{fgh}	0.025 ^{hi}	78.9 ^{ef}	0.32 ^{ji}	122.67 ^{hi}
		20	21.08 ^{efg}	0.016 ^j	91.25 ^d	0.31 ^{ji}	162.41 ^f
60	عدم استفاده Non-use	0	10.67 ^{kml}	0.044 ^d	69.96 ^{fgh}	0.62 ^e	72.63 ^k
	پرولین Proline	10	13.92 ^{jk}	0.039 ^e	74.96 ^{fg}	0.61 ^e	81.63 ^{kj}
		20	15.1 ^{hi}	0.036 ^{ef}	86.59 ^{de}	0.59 ^{ef}	161.29 ^f
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	17.35 ^{fghi}	0.034 ^{gf}	90.34 ^d	0.55 ^f	193.79 ^e
		20	20.3 ^{def}	0.033 ^g	112.11 ^c	0.45 ^{gh}	357.29 ^b
90	عدم استفاده Non-use	0	13.83 ^{ijk}	0.06 ^a	70.81 ^{fgh}	0.86 ^a	130.6 ^{gh}
	پرولین Proline	10	18.83 ^{defg}	0.055 ^b	75.81 ^{gf}	0.8 ^b	150.6 ^{gf}
		20	21.2 ^{de}	0.049 ^c	112.88 ^c	0.77 ^{bc}	250.6 ^d
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	24.49 ^{de}	0.046 ^d	130.38 ^b	0.73 ^{cd}	285.6 ^c
		20	63.54 ^a	0.044 ^d	157.79 ^a	0.7 ^d	483.45 ^a

* حروف مشترک در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

* Same letters indicate no significant differences ($p < 0.05$) based on Duncan's Multiple Range test.

کربوهیدرات کل

مطابق نتایج به دست آمده، افزایش شوری از صفر به ۹۰ میلی مولار باعث افزایش ۷۱/۶۸ درصدی کربوهیدرات کل شد. در تیمار ۹۰ میلی مولار تنش شوری، بالاترین میزان کربوهیدرات کل (۴۸۳/۴۵ میکروگرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی به دست آمد که افزایش ۷۲/۹۸ درصدی نسبت به تیمار بدون تعدیل کننده شوری داشت. کاربرد ۲۰ میلی گرم نانوذره پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش کربوهیدرات کل (۴۷/۸۸ درصد) نسبت به تیمار بدون تعدیل کننده شوری در تنش شوری ۹۰ میلی مولار شد (جدول ۷).

تنش شوری باعث افزایش یون کلرید در بافت های گیاهی می گردد. یون کلرید با تخریب نشاسته در گیاهان منجر به افزایش سطح کربوهیدرات در بافت های گیاهی می شود. افزایش محتویات

کربوهیدرات به دلیل میزان بالای هیدرولیز قند از طریق آنزیم های هیدرولیتیک است. کربوهیدرات ها با برقراری پیوند با فسفولیپیدها، غشای پلاسمایی گیاهان را تثبیت می کنند (Maathuis et al., 2014). وجود نقش کربوهیدرات ها در تنظیم اسمزی گیاهان تأیید شده است (Ikram et al., 2019). کاربرد خارجی پرولین موجب افزایش کربوهیدرات کل در گیاهان *Brassica napus*، تنباکوی تراریخته (*Nicotiana plumbaginifolia*) و *A. thaliana* در تنش خشکی شده است (Moustakas et al., 2011). کود مایع ضایعات ماهی غنی از پتاسیم است و این پتاسیم باعث ایجاد نسبت بالای پتاسیم به سدیم شده و در نتیجه آن روزنه ها باز می گردد، باز شدن روزنه ها باعث افزایش نفوذپذیری دی اکسید کربن و فعالیت بیشتر کلروفیل و در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز و افزایش میزان تولید کربوهیدرات در گیاه می شود (Shams et al., 2020). کود مایع

ضایعات ماهی باعث ساخت بیشتر کربوهیدرات کل در گیاه اسفناج شده است (Ekinci et al., 2019).

نشت الکترولیت غشاء، پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید

براساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۷)، تیمار ۹۰ میلی‌مولار شوری باعث افزایش ۷۳/۳۳ درصد این شاخص شد. در تیمار ۹۰ میلی‌مولار تنش شوری بالاترین میزان پراکسید هیدروژن (۰/۰۶ میکرومول بر گرم) در تیمار بدون تعدیل‌کننده شوری به دست آمد. پایین‌ترین میزان پراکسید هیدروژن (۰/۰۴۴ میکرومول بر گرم) نیز در ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی مشاهده شد (جدول ۷). با توجه به جدول مقایسه میانگین، تنش شوری با افزایش میزان مالون دی‌آلدئید باعث افزایش نشت غشای سلولی می‌گردد. افزایش تنش شوری از صفر به ۹۰ میلی‌مولار باعث افزایش ۶۷/۴۴ درصد مالون دی‌آلدئید نسبت به تیمار بدون شوری شد. بیشترین مقدار مالون دی‌آلدئید (۰/۸۶ میکرومول بر گرم) در تیمار بدون کاربرد تعدیل‌کننده شوری و تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار به دست آمد که نسبت به سایر تیمارها در این سطح شوری تفاوت معنی‌داری داشت. کم‌ترین میزان مالون دی‌آلدئید در این سطح شوری (۰/۷ میکرومول بر گرم) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین همراه با کود مایع ضایعات ماهی حاصل شد (جدول ۷). براساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۵)، بیشترین مقدار نشت الکترولیت غشاء (۸۸/۲۲ درصد) در تیمار بدون کاربرد تعدیل‌کننده شوری و تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار به دست آمد که تفاوت معنی‌داری نسبت به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین بدون کاربرد کود مایع ضایعات ماهی نداشت. کاربرد ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی و کاربرد ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین بدون کاربرد کود مایع ضایعات ماهی باعث کاهش نشت الکترولیت غشاء (به ترتیب ۳۱/۷ و ۲۲/۲۶ درصد) در تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار شد. گیاهان برای حفظ فعالیت فیزیولوژیکی طبیعی به یکپارچگی و پایداری غشاء نیاز دارند. افزایش بیش از حد سدیم با به هم ریختن تعادل اولیه رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شود. و همین امر موجب کاهش سیالیت غشاء و افزایش نفوذپذیری آن می‌گردد. با افزایش نفوذپذیری غشاء، غلظت یون سمی در داخل سلول گیاهی افزایش و مقدار پتاسیم و کلسیم کاهش می‌یابد. در نتیجه، این عدم تعادل منجر به سمیت یونی و تولید اکسیژن فعال می‌شود. تولید اکسیژن فعال در شرایط تنش افزایش می‌یابد، این در حالی است که گیاهان برای عملکرد عادی خود به سطح آستانه اکسیژن فعال نیاز دارد. اکسیژن

فعال با اسیدهای چرب غیراشباع وارد واکنش شده، و با تشکیل هیدروپراکسیدهای لیپیدی منجر به کاهش نفوذپذیری غشاء می‌شود. این واکنش منجر به افزایش محتوای پراکسید هیدروژن، نشت الکترولیت و مالون دی‌آلدئید می‌شود و احتمالاً علت اصلی خسارت شدید به غشای سلول گیاهی، تولید رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن است که در نتیجه باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در غشای سلولی می‌شود (Alzahrani et al., 2019). پرولین از جمله محلول‌های سازگار، محافظ اسمزی است و به‌عنوان دفع‌کننده رادیکال هیدروکسیل عمل می‌کند. به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در شرایط تنش شوری ممکن است با کاربرد نانوذره پرولین مرتبط باشد. از این رو، کاربرد نانوذره پرولین با بهبود و افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز، تولید پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد و در نتیجه آن، آسیب تنش اکسیداتیو در سلول کاهش می‌یابد. علاوه بر این، کاربرد نانوذره پرولین موجب کاهش اثرات منفی تنش شوری بر رشد گیاه شده و تبادل گاز را در روزه‌ها بهبود داده، بیان ژن تولیدکننده پروتئین‌ها را در برابر تنش افزایش داده، پراکسیداسیون لیپید را کاهش داده و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را بالا می‌برد (Wani et al., 2019). در خصوص کود مایع ضایعات ماهی، پتاسیم موجود در کود باعث حفظ پتانسیل و فشار غشای پلاسمایی سلول گیاهی شده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را حفظ می‌کند و فشار اسمزی در داخل سلول و حرکت روزه را تنظیم می‌کند. همچنین این کود با داشتن عنصر غذایی بالا موجب افزایش تولید کلروفیل، بهبود فتوسنتز، سنتز پروتئین و متابولیسم آنتی‌اکسیدان می‌شود (Koksal et al., 2016). گیاهان برای زنده ماندن تحت تنش اسمزی و شوری احتیاج به نسبت بالای کلسیم، سدیم و حذف سدیم دارند. کلسیم موجود در کود باعث افزایش پایداری غشای سلولی گیاه کرفس (*Apium graveolens*) در شرایط تنش شوری شده است. کلسیم با تثبیت نفوذپذیری غشاء، غلظت نیتروژن و پتاسیم در برگ‌ها باعث بهبود رشد گیاه گوجه‌فرنگی شد (Saini et al., 2015).

فنول کل

با توجه به جدول مقایسه میانگین، افزایش تنش شوری به ۹۰ میلی‌مولار باعث افزایش ۴۲/۷ درصد فنول کل نسبت به تیمار بدون شوری شد. بیشترین مقدار فنول کل (۱۵۷/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین به همراه کود مایع ضایعات ماهی و تنش شوری ۹۰ میلی‌مولار به دست آمد که نسبت به

سایر تیمارها در این سطح شوری تفاوت معنی داری داشت. کمترین میزان فنول کل (۴۰/۵۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) نیز در تیمار بدون تیمار شوری و بدون کاربرد تعدیل کننده شوری به دست آمد (جدول ۷). ترکیبات فنولی شامل مونوفنولها، پلی فنولها و الیگوفنولها در پاسخ به رادیکالهای آزاد حاصل از تنش ایجاد می شوند و با فعالیت آنتی اکسیدانی خود موجب از بین رفتن رادیکالهای آزاد لیپیدی و موجب تجزیه هیدروژن پراکسید می شود (Minh et al., 2016). تنش شوری باعث افزایش ترکیبات فنولی در گیاه فلفل شده است (Ksouri et al., 2007). نمونه های دیگر گیاهان نیز افزایش فنولها و فلاونوئیدها یا ترکیبات مشابه آنها را در شرایط تنش شوری نشان داده اند (Arif et al., 2020). گزارش شده است که پرولین سازوکارهای دفاعی مانند آنزیمهای آنتی اکسیدان را در پاسخ به تنش شوری فعال می کند. پرولین همچنین نقش اساسی در تولید ترکیبات فنولی ناشی از تنش دارد. این ترکیبات فنولی فعالیت آنتی اکسیدانی از

خود نشان می دهند. در تحقیقات بسیاری از محققان ثابت شده است که تولید پرولین، بیوسنتز فنولها را از طریق مسیرهای شیکمات و فنیل پروپانویید تحریک می کند (Shetty, 1997). محلول پاشی برگی نانوذره پرولین با تقویت سیستمهای ازبین برنده اکسیژن فعال، تحمل گیاه نخود (*Cicer arietinum*) را در مقابل آسیبهای اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی افزایش داد. این تحقیقات نشان می دهد که نانوذره پرولین با کاهش محتوای هیدروژن پراکسید و با افزایش فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، و آسکوربات پراکسیداز، نقش محافظتی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از خشکسالی دارد (Osman, 2015). کود مایع ضایعات ماهی حاوی ترکیباتی است که اساس این ترکیبات برپایه فنول و فلاونوئیدها می باشد. همچنین مواد موجود در این کود نظیر پرولین باعث تحریک مسیر تولید ترکیبات فنولی و باعث افزایش این ترکیبات در گیاه می گردند (Muscolo et al., 2022).

جدول ۸- تجزیه واریانس اثر کاربرد تعدیل کننده های تنش بر میزان عناصر استویا تحت تنش شوری

Table 8- ANOVA for the effect of stress modulator application on the essential nutrients of Stevia under salinity stress conditions

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		سدیم ریشه Root Na (%)	پتاسیم ریشه Root K (%)	کلسیم ریشه Root Ca (%)
تنش شوری Salinity stress (mM)	3	16.36 **	0.96 **	9.69 **
تعدیل کننده تنش Stress modulator	4	16.97 **	4.81 **	11.54 **
تعدیل کننده تنش × شوری Salinity stress × Stress modulator	12	2.63 **	0.38 **	0.34 **
خطا Error	6	0.026	0.015	0.006
ضریب تغییرات CV (%)		3.91	6.19	3.36

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی دار، و معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد می باشد

ns, * and **: non-significant, and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۸) حاصل از تأثیر محلول پاشی تعدیل کننده های تنش شوری (نانوذره پرولین به همراه و بدون کاربرد کود مایع ضایعات ماهی) تحت تنش شوری نشان داد که اثرات اصلی تیمارهای شوری و تعدیل کننده های شوری و همچنین اثر متقابل آنها بر سدیم ریشه، پتاسیم ریشه، کلسیم ریشه در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) معنی دار شدند.

سدیم، پتاسیم و کلسیم

براساس جدول مقایسه میانگین، تنش شوری باعث افزایش ۵۴/۴ درصد سدیم ریشه گردید. در تیمار ۹۰ میلی مولار شوری، تیمار ۲۰

میلی گرم بر لیتر نانوذره پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی و تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره پرولین همراه با کود مایع ضایعات ماهی باعث کاهش (به ترتیب ۴۶/۲۱ و ۵۶/۶۶ درصد) سدیم ریشه نسبت به تیمار عدم کاربرد تعدیل کننده شوری شدند (جدول ۹). براساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۹)، تنش شوری باعث کاهش ۵۶/۷۵ درصدی پتاسیم ریشه گردید. در تیمار ۹۰ میلی مولار شوری، تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش (۶۵/۰۶ درصد) پتاسیم ریشه و تیمار ۲۰ میلی گرم بر لیتر نانوذره پرولین همراه با کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش

تیمار ۹۰ میلی‌مولار شوری، تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین بدون کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش (۳۰/۱۴ درصد) کلسیم ریشه و تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره پرولین همراه با کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش (۶۲/۴۵ درصد) کلسیم ریشه نسبت به تیمار عدم کاربرد تعدیل‌کننده شوری شدند (جدول ۹).

(۷۱/۴۲ درصد) پتاسیم ریشه نسبت به تیمار عدم کاربرد تعدیل‌کننده شوری شدند. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که با افزایش غلظت شوری درگلدان‌ها، میزان جذب کلسیم ریشه گیاه استویا به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری‌که براساس جدول مقایسه میانگین، تنش شوری باعث کاهش ۶۳/۳۲ درصدی کلسیم ریشه گردید. در

جدول ۹- اثرات متقابل کود مایع ضایعات ماهی به همراه محلول‌پاشی نانوذره پرولین بر میزان عناصر استویا تحت تنش شوری
Table 9- The interaction effect of proline nanoparticles and fish waste fertilizer essential nutrients of Stevia under salinity stress conditions

تنش شوری Salinity stress (mM)	تیمار Treatment	پرولین Proline (mg.L ⁻¹)	کلسیم ریشه Root Ca (%)	پتاسیم ریشه Root K (%)	سدیم ریشه Root Na (%)
0	عدم استفاده Non-use	0	2.59 ^f	1.85 ^{ef}	3.42 ^{hi}
	پرولین Proline	10	2.82 ^d	2.008 ^e	3.24 ^{ij}
	پرولین	20	2.64 ^{ef}	2.31 ^d	3.07 ^{jk}
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	2.74 ^{de}	2.49 ^c	2.94 ^k
		20	4.23 ^b	2.64 ^{abc}	2.57 ^l
30	عدم استفاده Non-use	0	1.95 ^h	1.61 ^g	4.58 ^c
	پرولین Proline	10	2.01 ^h	1.84 ^{ef}	4.41 ^{cd}
	پرولین	20	2.59 ^f	1.93 ^{ef}	3.83 ^{ef}
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	2.74 ^{de}	2.005 ^e	3.66 ^{gf}
		20	4.89 ^a	2.69 ^{ab}	2.55 ^l
60	عدم استفاده Non-use	0	1.42 ^j	1.04 ⁱ	5.66 ^b
	پرولین Proline	10	1.57 ⁱ	1.29 ^h	5.51 ^b
	پرولین	20	2.05 ^h	1.79 ^f	4.48 ^{cd}
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	2.19 ^g	2.018 ^e	4.32 ^d
		20	3.75 ^c	2.58 ^{bc}	3.11 ^{kj}
90	عدم استفاده Non-use	0	0.95 ^l	0.8 ^j	7.5 ^a
	پرولین Proline	10	1.07 ^k	0.99 ^{ij}	7.27 ^a
	پرولین	20	1.36 ^j	2.29 ^d	3.91 ^e
	پرولین + کود ماهی (۱۵٪) Proline + fish fertilizer (15%)	10	1.46 ^{ij}	2.56 ^{bc}	3.59 ^{gh}
		20	2.53 ^f	2.8 ^a	3.25 ^{ij}

* حروف مشترک در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

* Same letters indicate no significant differences ($p < 0.05$) based on Duncan's Multiple Range test.

تجمع سدیم در اندام‌هوایی گیاهان از طریق حذف آن از آوند چوبی می‌شود. حلالیت بالای کود مایع ضایعات ماهی و در دسترس بودن کلسیم و پتاسیم موجود در آن باعث جبران کمبود این عنصر ناشی از شوری می‌شود (Adem et al., 2014). محلول‌پاشی نانوذره پرولین باعث افزایش محتوای عناصر غذایی نظیر نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در ریشه گیاه می‌شود (Ali et al., 2008). کاربرد نانوذره پرولین، محتوای فسفر، پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم را افزایش داد و سطوح سدیم را در گیاهان متأثر از نمک کاهش داد (Abdelhamid et al., 2013).

تحت تنش شوری، H^+ -ATPase غشای پلاسمایی سلول یک جریان هیدروژن ایجاد می‌کند که باعث تولید انرژی برای انتقال یون پتاسیم از طریق آنتی‌پورت پتاسیم/هیدروژن شده و در نتیجه جذب مجدد سدیم تضمین می‌شود (Ketehouli et al., 2019). علاوه بر این، تنش شوری با ایجاد فشار اسمزی در محلول ریزوسفر خاک موجب جذب آب و مواد معدنی شده و اثر آنتاگونیستی (پتاسیم و کلسیم) را کاهش می‌یابد (Lindberg et al., 2012). این نتایج با نتایج تحقیقات دیگر محققان (Alnusairi et al., 2022) هم‌خوانی دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که کود مایع ضایعات موجب کاهش

نتیجه گیری

ضایعات ماهی (۱۵ درصد) می‌تواند به‌عنوان بهترین غلظت براساس شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده برای کاهش اثرات شوری معرفی شود. از این‌رو، کاربرد هم‌زمان پرولین و کود مایع ضایعات ماهی را می‌توان به‌عنوان روشی مؤثر برای کاهش اثرات تنش روی گیاهان تحت شرایط تنش‌های محیطی مختلف اعلام کرد.

مطالعه حاضر با هدف بررسی کاربرد نانوذرات پرولین و کود مایع ضایعات ماهی به‌عنوان یک کود آلی روی گیاه استویا در شرایط شوری انجام شد. نانوذره پرولین و کود مایع ضایعات ماهی باعث افزایش شاخص‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گردید. نانوذره پرولین در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و کود مایع

References

1. Abdelhamid, M. T., Rady, M. M., Osman, A. S., & Abdalla, M. A. (2013). Exogenous application of proline alleviates salt-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88, 439–446. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512989>
2. Adem, G. D., Roy, S. J., Zhou, M., Bowman, J. P., & Shabala, S. (2014). Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology*, 14, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-113>
3. Ahanger, M. A., Qin, C., Begum, N., Maodong, Q., Dong, X. X., El-Esawi, M., El-Sheikh, M. A., Alatar, A. A., & Zhang, L. (2019). Nitrogen availability prevents oxidative effects of salinity on wheat growth and photosynthesis by up-regulating the antioxidants and osmolytes metabolism, and secondary metabolite accumulation. *BMC Plant Biology*, 19, 479. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2085-3>
4. Ali, Q., Ashraf, M., Shahbaz, M., & Humera, H. (2008). Ameliorative effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pakistan Journal of Botany*, 40, 211–219.
5. Alikhani, S., & Mahmudi Zarandi, M. (2019). Effect of coinoculation with endomycorrhiza, *Pseudomonas aeruginosa* and *Rhizobium meliloti* on *Medicago sativa* under water stress. *Journal of Plant Research*, 32(1), 155–166. (In Persian). <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.23832592.1398.32.1.7.0>
6. Alnusairi, G., Mazrou, Y., Qari, S., Elkelish, A., Soliman, M., Eweis, M., Abdelaal, K., El-Samad, G. A., Ibrahim, M., & ElNahhas, N. (2022). Exogenous nitric oxide reinforces photosynthetic efficiency, osmolyte, mineral uptake, antioxidant, expression of stressresponsive genes and ameliorates the effects of salinity stress in wheat. *Plants*, 11, 576. <https://doi.org/10.3390/plants10081693>
7. Alzahrani, S. M., Alaraidh, I. A., Migdadi, H., Alghamdi, S., Khan, M. A., Ahmad, P. A. R., (2019). Physiological, biochemical, and antioxidant properties of two genotypes of *Vicia faba* grown under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*, 51(3), 786–798. [https://doi.org/10.30848/PJB2019-3\(3\)](https://doi.org/10.30848/PJB2019-3(3))
8. Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: an omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>
9. Awlia, M., Alshareef, N., Saber, N., Korte, A., Oakey, H., Panzarová, K., & Julkowska, M. M. (2021). Genetic mapping of the early responses to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 107(2), 544–563. <https://doi.org/10.1111/tpj.15310>
10. Ayman, M., Metwally, S., Mancy, M., & Abd alhafez, A. (2020). Influence of nano-silica on wheat plants grown in salt-affected soil. *International Journal of Product Development*, 25, 279–296.
11. Bahari Saravi, H., Gholami, A., Pirdashti, H., Firouzabadi, M. B., Asghari, H., & Yaghoobian, Y. (2022). Improvement of salt tolerance in *Stevia rebaudiana* by co-application of endophytic fungi and exogenous spermidine. *Industrial Crops and Products*, 177, 114443. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114443>
12. Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmaeili, N., & Zhang, H. (2023). Plants response mechanisms to salinity stress. *Plants*, 12, 2253. <https://doi.org/10.3390/plants12122253>
13. Baldi, E., & Tosel Li, M. (2013). Root growth and survivorship in cow manure and compost amended soils. *Plant Soil Environment*, 59(5), 221–226. <https://doi.org/10.17221/857/2012-PSE>
14. Balraj, H. T., Palani, S., & Arumugam, G. (2014). Influence of Gunapaselam, a liquid fermented fish waste on the growth characteristics of *Solanum melongena*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(12), 58–66.
15. Bates, L., Waldren, R., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

16. Chapman, H. D., & Pratt, D. F. (1961). *Methods of Analysis for Soil, Plant and Water*; University of California Agricultural Science: Davis, CA, USA. pp. 60–62.
<https://agris.fao.org/search/en/providers/122535/records/65dde56f7c7033e84be8a9f2>
17. Dai, W. S., Wang, M., Gong, X. Q., & Liu, J. H. (2018). The transcription factor FcWRKY40 of *Fortunella crassifolia* functions positively in salt tolerance through modulation of ion homeostasis and proline biosynthesis by directly regulating SOS2 and P5CS1 homologs. *New Phytologist*, 219, 972–989.
<https://doi.org/10.1111/nph.15240>
18. De Freitas, P. A. F., de Carvalho, H. H., Costa, J. H., Miranda, R. S., Saraiva, K. D. C., Oliveira, F. D. B., Coelho, D. G., Prisco, J. T., & Gomes-Filho, E. (2019). Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: Physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. *Plant Cell Reports*, 38, 403–416.
<https://doi.org/10.1007/s00299-019-02382-5>
19. Ekinici, M., Atamanalp, M., Turan, M., Alak, G., Kul, R., Kitir, N., & Yildirim, E. (2019). Integrated use of nitrogen fertilizer and fish manure: effects on the growth and chemical composition of spinach. *commun. Oil Science and Plant Analysis*, 50(2), 1580–1590. <https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1631324>
20. El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., & Hardy, G. E. (2003). Fish emulsion as a food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var. Sativus) in a sandy soil. *Plant and Soil*, 252, 397–411.
<https://doi.org/10.1023/A:1024729620154>
21. Fageria, N. K. (2009). *The Use of Nutrients in Crop Plants*. CRC. Press, Boca Raton. FL. USA pp. 230–240.
<https://doi.org/10.1201/9781420075113>
22. Forouzi, A., Ghasemnezhad, A., & Ghorbani, R. (2020). Phytochemical response of *Stevia* plant to growth promoting microorganisms under salinity stress. *South African Journal of Botany*, 134, 109–118.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.001>
23. Gohari, G. H., Panahirad, S., Sepehri, N., Akbari, A., Zahedi, S. M., Hessam Jafari, H., Dadpour, M. R., & Fotopoulos, V. (2021). Enhanced tolerance to salinity stress in grapevine plants through application of carbon quantum dots functionalized by proline. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 42877–42890.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13794-w>
24. Heath, R. L. M., & Packer, I. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
25. Hosseinfard, M., Stefaniak, S., Ghorbani, J. M., Soltani, E., Wojtyla, L., & Garnczarska, M. (2022). Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5186. <https://doi.org/10.3390/ijms23095186>
26. Hu, Y., Xia, S., Su, Y., Wang, H., Luo, W., Su, S., & Xiao, L. (2016). Brassinolide increases potato root growth in vitro in a dose-dependent way and alleviates salinity stress. *Research International Biomed.* 8231873.
<https://doi.org/10.1155/2016/8231873>
27. Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Guljan, F., & Khan, N. (2019). Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*.
<https://doi.org/10.2174/2212798410666190612130139>
28. Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. A. (2017). A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food Bioprocess Technol*, 11, 2–16. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>
29. Ketehouli, T., Idrice Carther, K. F., Noman, M., Wang, F. W., Li, X. W., & Hai-Yan Li, H. Y. (2019). Adaptation of plants to salt stress: Characterization of Na⁺ and K⁺ transporters and role of CBL gene family in regulating salt stress response. *Agronomy*, 9, 687. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110687>
30. Koksai, N., Alkan-Torun, A., Kulahlioglu, I., Ertargin, E., & Karalar, E. (2016). Ion uptake of marigold under saline growth conditions. *Springer Plus*, 5, 139.
31. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., & Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.02.001>
32. Kurunc, A., Ece Aslan, G., Cihan Karaca, C., Ahmet Tezcan, A., Turgut, K., Karhan, M., & Kaplan, B. (2020). Effects of salt source and irrigation water salinity on growth, yield and quality parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Scientia Horticulturae*, 270, 109458. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109458>

33. Lindberg, S., Abdul Kader, M. D., & Yemelyanov, V. (2012). Calcium Signalling in Plant Cells under Environmental Stress. In *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*; Springer: New York, NY, USA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_15
34. Maathuis, F. J. M., Ahmad, I., & Patishtan, J. (2014). Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Front. Plant Science*, 5, 467. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00467>
35. Mahdavi, Z., Esmailpour, B., Azarmi, R., Panahirad, S., Ntatsi, G., Gohari, G., & Fotopoulos, V. (2024). Fish waste—A novel bio-fertilizer for stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under salinity-induced stress. *Plants* 13, 1909. <https://doi.org/10.3390/plants13141909>
36. Maschmeyer, T., Luque, R., & Selva, M. (2020). Upgrading of marine (fish and crustaceans) biowaste for high added-value molecules and bio(nano)-materials. *Chemical Society Reviews*, 49, 4527. <https://doi.org/10.1039/c9cs00653b>
37. Merwad, A. R. M., Desoky, E. S. M., & Rady, M. M. (2018). Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. *Scientia Horticulturae*, 228, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.008>
38. Metwally, R., Solimana, S. A., Hamed, A. A., Latef, A., & Abdelhamee, R. (2021). The individual and interactive role of arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma viride* on growth, protein content, amino acids fractionation, and phosphatases enzyme activities of onion plants amended with fish waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112072. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112072>
39. Minh, D. T. K., Ha, P. T. T., Tuyen, P. T., Minh, T. N., Quan, N. V., & Xuan, T. (2016). Effects of salinity stress on growth and phenolics of rice (*Oryza sativa* L.) luong. *International Letters of Natural Sciences*, 57, 1. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.57.1>
40. Moustakas, M., Sperdoui, I., Kouna, T., & Antonopoulou Ioannis, C. I. (2011). Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regulation*, 65, 315–325. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9604-z>
41. Muscolo, A., Mauriello, F., Marra, F., Calabrò, P. S., Russo, M., Ciriminna, R., & Pagliaro, M. (2022). AnchoisFert: A new organic fertilizer from fish processing waste for sustainable agriculture. *Research Article*, 6, 2100141. <https://doi.org/10.1002/gch2.202100141>
42. Nazmul Hossain, M., Sarker, U., Sharif Raihan, M. D., Asma, A., Al-Huqail, A. A., Siddiqui, M. H., & Oba, S. H. (2022). Influence of salinity stress on color parameters, leaf pigmentation, polyphenol and flavonoid contents, and antioxidant activity of *Amaranthus lividus* leafy vegetables. *Molecules*, 27(6), 18–21. <https://doi.org/10.3390/molecules27061821>
43. Omokolo, N. D., Tsala, N. G., Kanmegne, G., & Balange, A. P. (1992). *In vitro* induction of multiple shoots, plant regeneration and tuberization from tips of cocoyam. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 318, 773–778.
44. Osman, H. S. (2015). Enhancing antioxidant–yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. *Annals of Agricultural Sciences | Journal*, 60, 389–402. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.004>
45. Redman, R., Haraldson, J., & Gusta, L. (1986). Leakage of UV- absorbing substances as a measure of salt injury in leaf tissue of woody species. *Plant Physiology*, 67, 87–91. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01267.x>
46. Riaz, S., Hussain, I., Ibrahim, M., Rasheed, R., & Ashraf, M. A. (2021). Choline chloride mediates salinity tolerance in cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) by improving growth, oxidative defense, and secondary metabolism. *Dose-Response: An International Journal*, 1-19. <https://doi.org/10.1177/15593258211055026>
47. Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30, 105-111. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000010025x>
48. Rojas, E., Bermúdez, V., Motlaghzadeh, Y., Mathew, J., Fidilio, E., Faria, J., Rojas, J., de Bravo, M. C., Contreras, J., Mantilla, L. P., Angarita, L., Sepúlveda, P. A., & Kuzmar, I. (2018). *Stevia rebaudiana* Bertoni and its effects in human disease:emphasizing its role in inflammation, ather osclerosis and metabolicsyndrome. *Current Nutrition Reports*, 7, 170. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0228-z>
49. Safikhan, S., Chaichi, M. R., Khoshbakht, K., Amini, A., & Motesharezadeh, B. (2018). Application of nanomaterial graphene oxide on biochemical traits of Milk thistle (*Silybum marianum* L.) under salinity stress. *American Journal of Climatic Studies*, 12(06), 931-936.

50. Saini, S., Sharma, I., & Pati, P. K. (2015). Versatile roles of brassinosteroid in plants in the context of its homoeostasis, signaling and crosstalks. *Frontiers in Plant Science*, 6, 950. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00950>
51. Sarker, U., & Oba, S. (2019). Salinity stress enhances color parameters, bioactive leaf pigments, vitamins, polyphenols, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus* leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2275–2284. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9423>
52. Seraj, F., Pirdashti, H., Yaghoubian, Y., & Ghasemi Omran, V. (2016). The effect of *Piriformospora indica* inoculation on salt and drought stress tolerance in *Stevia rebaudiana* under *in vitro* conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 8(29), 1–20. (in Persian). <https://doi.org/10.22108/ijpb.2016.21032>
53. Sergiev, I., Alexieva, V., & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de Académie des Sciences*, 51, 121–124.
54. Shahsavani, S., Abaspour, A., Parsaeeyan, M., & Yonesi, Z. (2017). Effect of fish waste, chemical fertilizer and bio-fertilizer on yield and yield components of bean (*Vigna sinensis*) and some soil properties. *Iranian Journal Pulses Research*, 8, 45–59. (in Persian). <https://doi.org/10.22067/ijpr.v8i1.47428>
55. Shams, H., Yildirim, E., Arslan, E., & Agar, G. (2020). Salinity induced alteration in DNA methylation pattern, enzyme activity, nutrient uptake and H₂O₂ content in pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 59. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03053-9>
56. Shetty, K. (1997). Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 6, 162–171.
57. Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S., & Tahir, I. (2019). Epibrassinolide and proline alleviate the photosynthetic and yield inhibition under salt stress by acting on antioxidant system in mustard. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 385–394. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.002>
58. Whiting, D., Wilson, C., & Card, A. (2005). Organic Fertilizers. In *Colorado Master Gardener*; Colorado State University: Denver, CO, USA, 2005; pp. 1–5.
59. Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119, 1557–1565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.042>
60. Zahedi, S. M., Abolhassani, M., Hadian-Deljou, M., Feyzi, H., Akbari, A., Rasouli, F., Koçak, M. Z., Muhittin Kulak, F., & Gohari, G. (2023). Proline-functionalized graphene oxide nanoparticles (GO-Pro NPs): A new engineered nanoparticle to ameliorate salinity stress on grape (*Vitis vinifera* L. cv Sultana). *Plant Stress*, 7, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100128>
61. Zhao, D., Fang, Z., Tang, Y., & Tao, J. (2020). Graphene oxide as an effective soil water retention agent can confer drought stress tolerance to paeonia ostii without toxicity. *Environmental Science and Technology*, 54, 8269–8279. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02040>