

Physiological and biochemical responses of basil (*Ocimum basilicum*) seedlings to different concentrations of zinc

Omid Azizian-Shermeh, Alireza Einali *, Jafar Valizadeh

Department of Biology, Faculty of sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Abstract

Zinc (Zn^{2+}) is one of the essential micronutrient elements for plant growth. In the present study, effect of different concentrations of zinc on some physiological and biochemical properties of basil (*Ocimum basilicum*) was investigated. Basil seedlings were exposed to six zinc ($ZnSO_4$) levels (0, 50, 100, 200, 400, and 800 mg/L) in 3 days' intervals for a period of 30 days. The root and shoot growth, leaf number and area, photosynthetic pigments content, total soluble sugars and proteins, phenolic compounds, antioxidant power and mineral elements contents including zinc and potassium were significantly increased in effect of zinc levels up to 200 mg/L. Inversely, ferrous and calcium contents was drastically decreased concomitant with increasing zinc concentration but magnesium content remained unchanged. Our results indicated a dual role of zinc with optimum concentration of 200 mg/L, and a decrease in the root and shoot growth, pigment and phenolic contents under and over optimum concentration, whereas sugars and protein accumulation were occurred concomitantly with increasing zinc in the medium. However, the decrease of these parameters at the highest zinc concentration did not reach the level of control plants, which means that this species has a high resistance against zinc metal stress and because of the relative accumulation of zinc in polluted areas may has an important role for human nutrition. In general, the results point to important role of zinc in maintaining and protecting of basil seedlings against radical oxygen species.

Keywords: Basil, Chlorophyll, Phenolic compounds, Soluble sugars, Zinc

* Corresponding Author: aainali@science.usb.ac.ir

پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) بر اثر غلظت‌های مختلف عنصر روی

امید عزیزیان شرمه، علیرضا عینعلی*، جعفر ولیزاده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

چکیده

عنصر روی (Zn^{2+}) یکی از عناصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان است. در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های مختلف روی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) بررسی شد. گیاهچه‌های ریحان در فواصل زمانی ۳ روزه و برای مدت ۳۰ روز در معرض غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی قرار گرفتند. میزان رشد ریشه و بخش‌های هوایی، تعداد برگ در هر بوته، سطح برگ، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها و پروتئین‌های محلول کل، ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه و محتوای عناصر معدنی روی و پتاسیم بر اثر تیمار تا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی به‌طور معنی‌دار افزایش یافتند. محتوای آهن و کلسیم گیاه متناسب با افزایش غلظت روی به‌شدت کاهش یافت؛ ولی میزان منیزیم تغییر نکرد. نتایج بیان‌کننده نقش دوگانه روی با غلظت بهینه ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بودند و در غلظت‌های بیشتر یا کمتر میزان رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان ترکیبات فنلی کاهش یافتند؛ درحالی‌که تجمع قندها و پروتئین‌های محلول کل همگام با افزایش غلظت روی رخ داد. به‌هرحال کاهش این مقادیر در بیشترین غلظت روی به مقدار شاهد نرسید و بیشتر از آن بود که نشان می‌دهد گیاه ریحان مقاومت بسیار زیاد نسبت به تنش فلز روی دارد و با تجمع نسبی روی در خود با رشد در نواحی آلوده به این عنصر نقش مؤثری در تغذیه روی در انسان دارد. نتایج حاصل نشان‌دهنده نقش مهم روی در محافظت از گیاه ریحان در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فنلی، روی، ریحان، قندهای محلول، کلروفیل

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: aeinali@science.usb.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۴۳۱۱۳۶۳۳۸

مقدمه

به تازگی نگرانی‌ها درباره افزایش غلظت فلزهای سنگین در خاک و آب رو به افزایش است (Zarcinas *et al.*, 2004). آلودگی فلزهای سنگین ممکن است از فعالیت‌های طبیعی و انسانی مانند معادن، فرایندهای صنعتی و همچنین استفاده از کودهای حاوی فلزهای سنگین در کشاورزی ناشی شود (Dudka *et al.*, 1996). روی (Zn^{2+}) یکی از عناصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان است. این عنصر نقش بسیار مهمی در متابولیسم گیاهان با متأثر کردن فعالیت آنزیم‌های مختلف از جمله هیدروژناز و کربنیک انهدراز، پایداری عملکرد ریبوزومی و سنتز سیتوکروم‌ها بر عهده دارد (Broadley *et al.*, 2007). آنزیم‌های گیاهی که با روی فعال می‌شوند، بیشتر در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، نیتروژن، لیپید و نوکلئیک اسید، حفظ یکپارچگی غشاهای سلولی، سنتز پروتئین‌های دخیل در فرایندهای متابولیک، فتوسنتز، تنظیم سنتز اکسین و تشکیل دانه گرده نقش دارند (Marschner, 1995). این عنصر تنها فلز موجود در هر شش گروه آنزیمی است (Broadley *et al.*, 2007). روی در غلظت‌های مناسب، رشد و نمو میوه‌ها و بهره‌وری گیاهان را افزایش می‌دهد (Vaillant *et al.*, 2005). کمبود روی توسعه بسیاری از ناهنجاری‌ها را در رشد گیاهان مانند کلروزه شدن و کوچک ماندن برگ‌ها، کوتاه‌قدی و ایجاد حالت روزت در گیاهان سبب می‌شود. کمبود این عنصر همچنین بر کیفیت محصولات جمع‌آوری شده تأثیر می‌گذارد (Marschner, 1995). با وجود ضروری بودن عنصر روی برای گیاهان مقادیر بیش از حد آن بسیار مضر

است. این عنصر در مقادیر بیشتر از نیاز تغذیه‌ای به سادگی، جذب گیاهان و سپس آسیمیله می‌شود. گیاهانی که در معرض غلظت‌های زیاد روی قرار می‌گیرند، علائم مسموم شدن مشابه با سایر فلزهای سنگین را از خود نشان می‌دهند. این آثار شامل کلروزه شدن برگ‌ها، ممانعت از جوانه‌زنی، کاهش رشد، کاهش تعداد و سطح برگ، کاهش عملکرد و کاهش تولید گل هستند. علاوه بر این، کاهش فتوسنتز، نقص در عملکرد آنزیم‌ها، اختلال در جذب عناصر غذایی، پژمردگی و تغییر در روابط آبی گیاه نیز مشاهده می‌شود (Prasad, 2004; Deng *et al.*, 2006; Dhir *et al.*, 2008; Borowiak *et al.*, 2015). روی اضافی در عملکرد تعرقی، فتوسنتز و بیوسنتز کلروفیل اختلال ایجاد می‌کند (Richardson *et al.*, 1993; Borowiak *et al.*, 2015). رادیکال‌های آزاد اکسیژن مرتبط باشد و بر فعالیت فتوسنتزی و همچنین رشد گیاهان اثر بگذارد (Cuypers *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2013). سبزیجات و سایر گیاهان زراعی به مقادیر مختلف روی حساسیت نشان می‌دهند. به‌رحال مسموم شدن با روی ممکن است بر جذب عناصر دیگر نیز اثر بگذارد (Samreen *et al.*, 2017).

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است. این گیاه علاوه بر استفاده غذایی، به دلیل داشتن ترکیبات معطر و روغن‌های ضروری در صنایع دارویی نیز کاربرد دارد. ترکیبات استخراج شده از این گیاه علاوه بر استفاده خام، پس از تعدیلات شیمیایی نیز استفاده می‌شوند (Ramawat and Merillon,

شرایط دمایی ۲۷ درجه سانتی‌گراد (روز) و ۲۲ درجه سانتی‌گراد (شب) و شدت نور ۲۵۰ تا ۳۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهچه‌ها تا روز ۳۰ پس از کاشت، با محلول غذایی هوگلند معمولی به‌طور مرتب آبیاری شدند. تیمار روی بر گیاهان در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با شش تکرار برای هر تیمار با اضافه کردن غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی سولفات ($ZnSO_4$) به محلول غذایی هوگلند هر سه‌روز یکبار، به‌ازای هر گلدان ۳۰ میلی‌لیتر و به‌مدت ۳۰ روز اعمال شد. گیاهانی که محلول هوگلند را با غلظت صفر روی دریافت کرده بودند، شاهد در نظر گرفته شدند. پس از این مدت، گیاهان برای بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به غلظت‌های مختلف روی، جمع‌آوری و آزمایش شدند. نیمی از نمونه‌های گیاهی برای انجام بررسی‌های فیزیولوژیک شامل تعیین وزن تر و خشک، ارتفاع ریشه‌ها و بخش هوایی، سطح برگ، تعداد برگ و نسبت طول به پهنای برگ و برگ‌های نیم دیگر نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای بیوشیمیایی استفاده شدند.

استخراج و اندازه‌گیری رنگی‌های فتوستزی:

برای استخراج کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل، مقدار ۱ گرم از بافت چهارمین برگ جوان گیاه ریحان در هاون سرد با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و سپس از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده برای اندازه‌گیری میزان رنگی‌ها به کار رفت. بقایای حاصل از استخراج رنگی‌ها پس از خشک شدن برای اندازه‌گیری کریویدرات‌ها استفاده شدند. میزان کلروفیل با روش

(2008). این گیاه در پزشکی سنتی کاربرد فراوان دارد. روغن‌های ضروری *O. basilicum* خاصیت ضد میکروبی بسیار زیادی دارند (Kashyap *et al.*, 2011; Shafique *et al.*, 2011; Hanif *et al.*, 2011). این گیاه سالیان متمادی برای درمان ناهنجاری‌های گوارشی و عصبی کاربرد فراوان داشته است (Bunrathep *et al.*, 2007). برگ‌ها و گل‌های این گیاه خواص دارویی مختلفی دارند از جمله ضد اسپاسم، ضد نفخ، هاضم، اشتها آور و نیروبخش هستند (Marwat *et al.*, 2011). با وجود بررسی‌های متعدد بر ترکیب عنصری و دارویی این گیاه، تاکنون پژوهشی درباره تأثیر عناصر معدنی بر رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیک این گیاه انجام نشده است؛ بنابراین، تصور می‌شود تغییر در میزان غلظت عناصر معدنی ممکن است خواص آنتی‌اکسیدانی و بیوشیمیایی گیاهان را تغییر دهد؛ بنابراین در پژوهش حاضر کوشش می‌شود ارتباط غلظت روی با برخی جنبه‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه ریحان مشخص شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار روی: بذر گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از مرکز تحقیقات کشاورزی استان سیستان و بلوچستان تهیه و در سینی‌های حاوی کوکوپیت به‌صورت خزانه در گلخانه کشت شد. پس از سه هفته از کاشت، گیاهچه‌های دارای دو یا سه برگ، همسان شدند و به گلدان‌های پلاستیکی یک‌لیتری دارای مقادیر برابر کوکوپیت (یک کیلوگرم) منتقل شدند و در

میلی گرم آنترون در ۱۰۰ میلی لیتر سولفوریک اسید (۱۳ مولار) مخلوط شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. میزان جذب نور هریک از نمونه‌ها پس از سرد شدن، در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان قندهای محلول کل با نمودار استاندارد گلوکز محاسبه شد.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول

کل: استخراج پروتئین‌های محلول کل با بافر استخراج با ترکیب بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) ۱۰۰ میلی مولار، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، پتاسیم کلرید (KCl) ۱۰ میلی مولار، منیزیم سولفات (MgSO₄) ۱ میلی مولار، گلیسرول ۱۰ درصد، پلی وینیل پلای پیرولیدون ۱ درصد، تریتون X-100 ۰/۱ درصد و بتا-۲-مرکاپتواتانول ۵۰ میلی مولار انجام شد (Einali and Valizadeh, 2015). میزان پروتئین با نمودار استاندارد آلومین تعیین شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی کل و تعیین

فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه: برای تعیین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از پودر خشک گیاه استفاده شد. میزان ترکیبات فنلی کل موجود در برگ‌های گیاه ریحان با معرف فولین اندازه‌گیری شد (Singleton *et al.*, 1999). مقدار ۰/۰۵ گرم از پودر خشک برگ‌های گیاه پودر شده با آسیاب برقی (مدل AR10، شرکت Moulinex، فرانسه) و به دور از نور مستقیم خورشید، با یک میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد استخراج شد و پس از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین ۱۰ درصد مخلوط شد؛ سپس ۵ دقیقه در

اسپکتروفوتومتری و با رابطه‌های ۱ تا ۳ اندازه‌گیری شد (Arnon, 1949).

رابطه ۱

$$\text{Chl a (mg ml}^{-1}\text{)} = 0.0127 A_{663} - 0.00269 A_{645}$$

رابطه ۲

$$\text{Chl b (mg ml}^{-1}\text{)} = 0.0229 A_{645} - 0.00468 A_{663}$$

رابطه ۳

$$\text{Total Chl (mg ml}^{-1}\text{)} = A_{652}/34.5$$

میزان کاروتنوئید کل نیز با روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با رابطه ۴ اندازه‌گیری شد.

رابطه ۴

$$\text{Total Car (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} = (1000A_{470} - 1.82\text{Chl a} - 85.02\text{Chl b})/198$$

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول کل:

استخراج قندهای محلول کل با روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین منظور، به ۴۰ میلی گرم از بقایای بافتی عاری از رنگیزه‌های فتوسنتزی ۵ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (مدل WBN 29، شرکت Memmert، آلمان) با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. فاز رویی جدا شد. عمل استخراج با اتانول ۸۰ درصد چهار مرتبه دیگر تکرار شد. عصاره‌های حاصل، با تبخیر اتانول تغلیظ شدند و به حجم مشخصی کاهش یافتند. این عصاره‌ها پس از سانتریفیوژ (مدل Universal 320، شرکت Hettich، آلمان) در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، برای اندازه‌گیری قندهای محلول کل استفاده شدند. قندهای محلول کل با روش آنترون ارزیابی شدند (McCready *et al.*, 1950). برای اندازه‌گیری قند کل ۰/۲ میلی لیتر از عصاره تغلیظ‌شده با ۳ میلی لیتر معرف آنترون (۱۵۰

مقدار IC_{50} که بیان‌کننده غلظتی از عصاره است که در آن نیمی از رادیکال‌های دی فنیل پیکریل هیدرازیل خنثی می‌شوند؛ یعنی نصف درصد ممانعت به‌دست آمده از رابطه ۵، از این نمودار به دست آمد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در نظر گرفته شد. برای کنترل مثبت از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند آسکوربیک اسید استفاده شد.

تعیین میزان عناصر معدنی: برای آزادشدن و اندازه‌گیری عناصر معدنی از روش هضم توسط اسید و میکروویو (مدل MG40، شرکت Samsung، کره جنوبی) استفاده شد (Ravandeh *et al.*, 2011). بدین منظور، مقدار ۰/۵ گرم از بافت برگ خشک‌شده در معرض هوا با ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید مخلوط شد و ۱۰ دقیقه در میکروویو قرار گرفت. میزان ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید غلیظ (۱۲ نرمال) به مخلوط یادشده اضافه و به مدت ۵ دقیقه دیگر در میکروویو گذاشته شد. پس از هضم، مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد و حجم نهایی آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت هریک از عناصر روی، آهن، پتاسیم، کلسیم و منیزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (مدل PU9100X، شرکت Philips، هلند) تعیین شد.

تحلیل آماری: نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار (Standard deviation) برای هر تیمار بیان شدند. وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین نمونه‌های شاهد و تیمار شده با غلظت‌های مختلف روی با تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ ($P < 0.05$) تعیین شد.

درجه حرارت اتاق قرار گرفت و ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم بیکربنات (Na_2CO_3) ۵ درصد به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق و تاریکی نگهداری و سپس جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنلی با نمودار استاندارد گالیک اسید محاسبه و براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی برگ گیاه ریحان با خنثی کردن رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل با روش Kukic و همکاران (۲۰۰۸) با تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد. مقادیری از عصاره‌های با غلظت‌های مختلف از ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار دی فنیل پیکریل هیدرازیل مخلوط شدند و حجم نهایی آنها با متانول به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول تعیین شد. مخلوطی بدون عصاره متشکل از ۱ میلی‌لیتر محلول رقیق‌شده دی فنیل پیکریل هیدرازیل در ۲ میلی‌لیتر متانول برای کنترل استفاده شد. میزان خنثی کردن رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (درصد ممانعت) در حضور غلظت‌های مختلف عصاره با رابطه ۵ محاسبه شد.

رابطه ۵

$$S (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100$$

در این رابطه، A_c میزان جذب کنترل (محلول دی فنیل پیکریل هیدرازیل رقیق‌شده و بدون عصاره) و A_s میزان جذب نمونه آزمایش شده است. در نهایت، نمودار درصد ممانعت در برابر غلظت‌های مختلف عصاره بر حسب میلی‌گرم بر لیتر رسم شد و

عنصر هستند؛ ولی این کاهش در بسیاری از شاخص‌ها در مقایسه با شاهد بسیار کمتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بسیار زیاد این گیاه در برابر تنش ناشی از فلز روی است. کاهش رشد گیاه در نتیجه غلظت‌های زیاد روی ممکن است از تأثیر روی اضافی بر فتوسنتز و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی شود. کاهش رشد بخش‌های مختلف گیاه ناشی از سمی بودن روی، در گیاهان مختلف گزارش شده است (White *et al.*, 1974; Baker, 1978; Symeonidis *et al.*, 1985; Bert *et al.*, 2000). غلظت‌های ۲۰۰ میکرومولار و بالاتر روی در لوبیا کاهش وزن تر، سطح برگ و سایر شاخص‌های رشد را سبب شده است (Vassilev *et al.*, 2011). در تأیید نتایج به‌دست آمده، بررسی تأثیر روی بر رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی دو گیاه *Abelmoschus esculentus* و *Cyamopsis tetragonolobus* نشان داد روی تا غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به صورت ماده غذایی عمل و رشد را تحریک می‌کند؛ ولی در غلظت‌های بیشتر به صورت معکوس عمل می‌کند و رشد را کاهش می‌دهد (Mangal *et al.*, 2013).

اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ‌ها: میزان کلروفیل a و کل بلافاصله با اضافه کردن روی به محیط کشت در همه غلظت‌ها در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین میزان خود رسید (شکل‌های ۲-A و C). غلظت کلروفیل b نیز در پاسخ به افزایش غلظت روی زیاد شد؛ ولی بین میزان کلروفیل b در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (شکل ۲-B). به‌هرحال

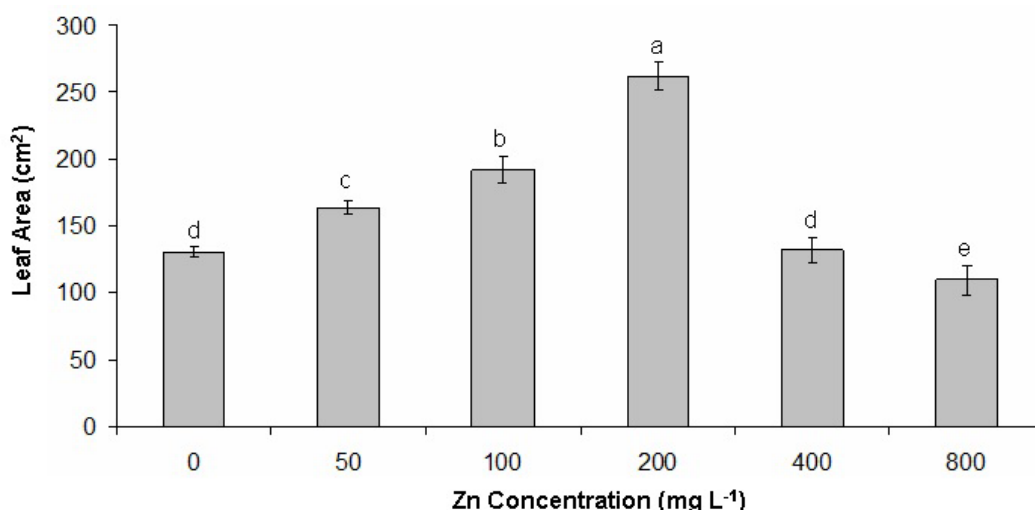
نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف روی بر رشد گیاه و سطح برگ:

افزایش غلظت روی تا میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در گیاه ریحان افزایش رشد این گیاهان را سبب شد؛ به‌طوری‌که همگام با افزایش غلظت روی، میزان وزن تر و خشک بخش‌های هوایی و ریشه، ارتفاع بخش‌های هوایی و ریشه و تعداد برگ در هر بوته در مقایسه با گیاهان شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (جدول ۱). باوجود کاهش شدید شاخص‌های رشد در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی، میزان این کاهش در برخی از شاخص‌ها در گیاهان تیمارشده با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی به‌اندازه شاهد نبود. نسبت طول به پهنای برگ در غلظت‌های مختلف روی از نظر آماری تغییری نکرد که نشان می‌دهد طول و پهنای برگ متناسب با غلظت روی تغییر پیدا نمی‌کنند. سطح برگ گیاه ریحان نیز متناسب با افزایش غلظت روی زیاد شد و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۱). افزایش غلظت روی به ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش سطح برگ گیاه را سبب شد؛ به‌طوری‌که در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، سطح برگ کمتر از شاهد بود. وزن تر و خشک، طول ریشه‌ها و بخش‌های هوایی و همچنین سطح برگ، متغیرهای مفیدی در تعیین میزان رشد گیاهان به شمار می‌روند. غلظت بهینه روی برای رشد گیاه ریحان در شرایط معمولی، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد به‌دلیل بیشترین میزان رشد ریحان در این غلظت. به‌هرحال غلظت‌های بیشتر که رشد را کاهش دادند نشان‌دهنده مسموم شدن گیاه با این

جدول ۱- ویژگی‌های رشد گیاهچه‌های ریحان در پاسخ به غلظت‌های مختلف روی- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند. nd نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار است.

نسبت طول به پهنای برگ	تعداد برگ در هر بوته	ارتفاع (سانتی‌متر)		وزن خشک (گرم)		وزن تر (گرم)		غلظت روی ($mg.L^{-1}$)
		ریشه	بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	
2.32 \pm 0.31 nd	31.33 \pm 1.53 ^{ab}	7.57 \pm 0.72 ^a	30.57 \pm 1.00 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	0.93 \pm 0.04 ^b	1.36 \pm 0.21 ^b	3.80 \pm 0.24 ^b	0
2.03 \pm 0.41 nd	42.67 \pm 2.52 ^c	13.10 \pm 1.91 ^b	35.93 \pm 1.25 ^b	0.43 \pm 0.03 ^c	1.08 \pm 0.04 ^c	2.04 \pm 0.13 ^c	4.85 \pm 0.58 ^c	50
1.76 \pm 0.16 nd	49.33 \pm 3.21 ^d	20.37 \pm 3.01 ^c	43.40 \pm 2.48 ^c	0.62 \pm 0.05 ^d	1.19 \pm 0.03 ^d	2.35 \pm 0.41 ^c	6.49 \pm 0.37 ^d	100
1.84 \pm 0.18 nd	57.33 \pm 2.08 ^e	23.43 \pm 3.10 ^c	52.87 \pm 2.80 ^d	0.84 \pm 0.02 ^e	1.52 \pm 0.09 ^e	5.09 \pm 0.09 ^d	9.33 \pm 0.11 ^e	200
2.05 \pm 0.10 nd	34.67 \pm 1.53 ^b	15.80 \pm 1.48 ^b	41.27 \pm 0.67 ^c	0.34 \pm 0.02 ^b	0.79 \pm 0.06 ^a	0.85 \pm 0.03 ^a	5.45 \pm 0.45 ^c	400
2.60 \pm 0.77 nd	27.67 \pm 2.52 ^a	6.67 \pm 0.47 ^a	28.17 \pm 2.11 ^a	0.21 \pm 0.01 ^a	0.71 \pm 0.04 ^a	0.83 \pm 0.02 ^a	2.81 \pm 0.25 ^a	800



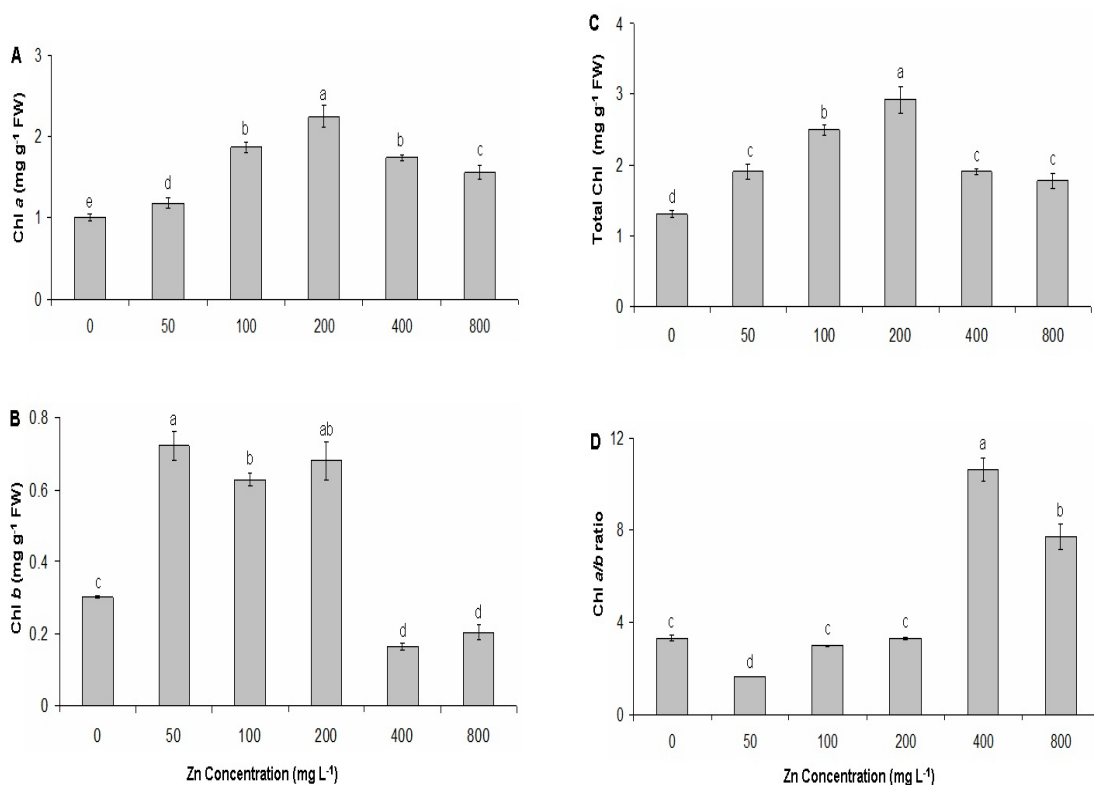
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف عنصر روی بر سطح برگ گیاه ریحان- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

گونه است. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، بازتابی از حساسیت گیاه به شرایط تنشی مانند فلزهای سنگین است (Borowiak et al., 2015). بررسی‌های مختلف نشان‌دهنده کاهش میزان کلروفیل در گونه‌های مختلف گیاهی در معرض تنش فلزهای سنگین

افزایش غلظت روی به ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش شدید میزان کلروفیل‌ها را سبب شد؛ با وجود این، میزان کلروفیل a و کل در این غلظت‌ها در مقایسه با شاهد همچنان بیشتر بود؛ درحالی‌که میزان کلروفیل b نسبت به شاهد بسیار کمتر بود. میزان رنگیزه‌ها در گیاهان، یکی از مشخصه‌های هر

بیان‌کننده افزایش کمتر کلروفیل a در برابر کلروفیل b در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی است (شکل ۲-D). این افزایش بیشتر، در میزان کلروفیل b نشان می‌دهد کلروفیل برای شکل‌گیری صحیح کمپلکس‌های جمع‌آوری‌کننده نور در کلروپلاست‌های گیاهان عالی و جلبک‌های سبز ضروری است (Eggink *et al.*, 2001; Eggink *et al.*, 2004; Biswal *et al.*, 2012). علاوه بر این، کلروفیل b بیان یک‌سری از پروتئین‌های ویژه غشای تیلاکوئیدی را تنظیم می‌کند و بدین ترتیب افزایش اندازه کمپلکس‌های آنتنی و در نتیجه افزایش میزان انتقال الکترون را سبب می‌شود (Tanaka *et al.*, 2001; Biswal *et al.*, 2012). افزایش شدید این نسبت در غلظت‌های بیشتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی نشان‌دهنده کاهش کمتر کلروفیل a در برابر کلروفیل b است. در حقیقت کاهش شدید میزان کلروفیل b در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی در مقایسه با شاهد دلیل افزایش نسبت کلروفیل a/b در این غلظت‌ها است. افزایش این نسبت در گونه‌های مختلف بید (*Salix spp.*) در معرض غلظت‌های مختلف روی (Borowiak *et al.*, 2015)، گیاهچه‌های لویا (*Phaseolus vulgaris*) در معرض غلظت‌های مختلف کادمیوم، مس و سرب (Zengin and Munzuroglu, 2005) و برگ‌های گیاه سنگروی سیاه (*Empetrum nigrum*) در معرض غلظت‌های مختلف مس و نیکل (Monni *et al.*, 2001) نیز گزارش شده است.

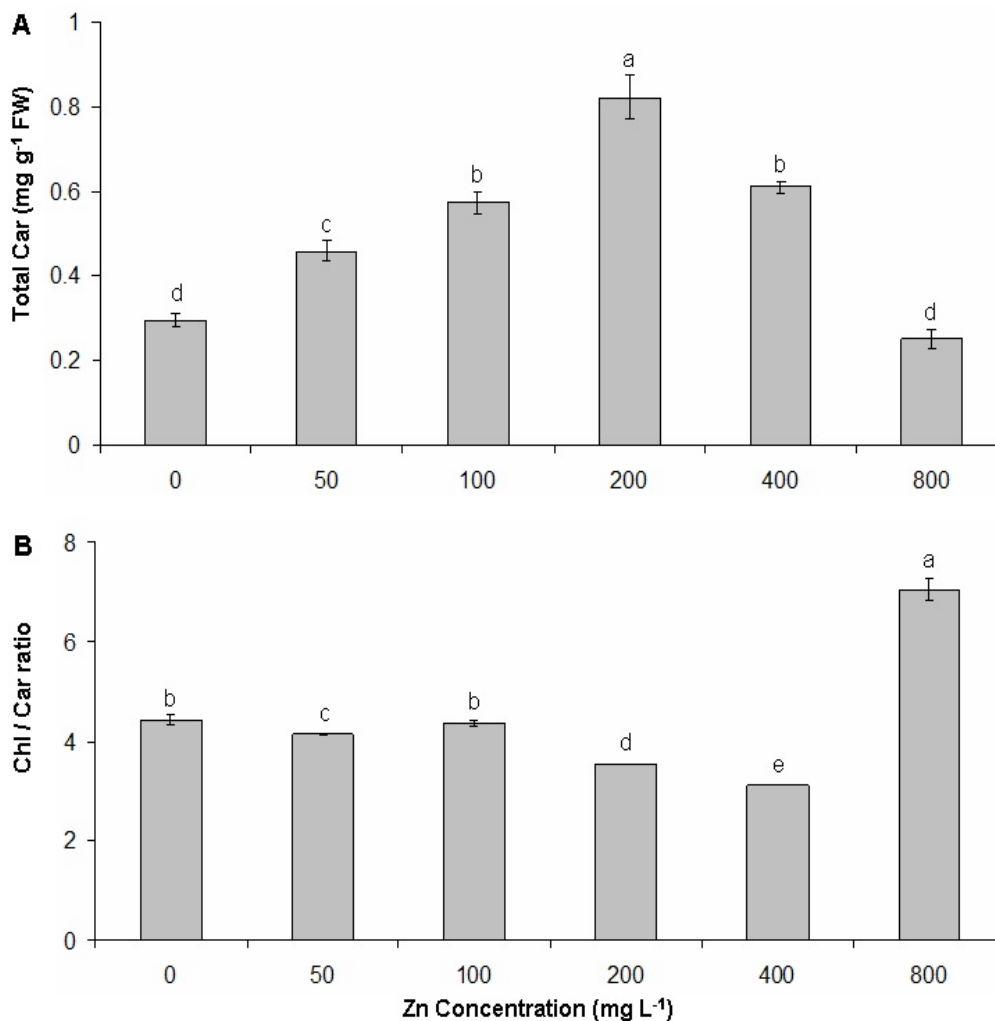
هستند (Prasad and Strzalka, 1999; Mishra and Dubey, 2005; Aggarwal *et al.*, 2012). این کاهش به علت تداخل یون‌های فلزهای سنگین با بیوسنتز کلروفیل با جانشینی آنها با یون منیزیم یا ممانعت مستقیم مراحل آنزیمی دخیل در بیوسنتز کلروفیل رخ می‌دهد (Cenkci *et al.*, 2010; Pourraut *et al.*, 2011). گیاهان ریحان تیمار شده با غلظت‌های مختلف روی، میزان بیشتری از کلروفیل‌ها را به‌ویژه کلروفیل a و کل در مقایسه با شاهد نشان دادند. این افزایش میزان کلروفیل‌ها سازوکاری دفاعی در برابر مسموم شدن ناشی از این فلز تلقی می‌شود؛ بنابراین، متابولیسم اولیه بر اثر سمی بودن روی دستخوش تغییر نمی‌شود؛ بلکه احتمالاً سمی بودن این فلز با سازوکارهای منتج به تجمع کلات‌های فلزی در واکوئل برطرف می‌شود (Borowiak *et al.*, 2015). تجمع کلروفیل در گیاهانی که با روی تیمار شده‌اند به تحمل آن گیاه نسبت به مسموم شدن با روی بستگی دارد. به هر حال گزارش‌هایی مبنی بر افزایش غلظت رنگیزه‌ها پس از قرار گرفتن در معرض فلزها وجود دارند (Stiborova *et al.*, 1986; Mishra and Dubey, 2005; Borowiak *et al.*, 2015). نسبت کلروفیل a/b که شاخص تنش در نظر گرفته می‌شود معمولاً در گیاهانی که در معرض غلظت‌های زیاد فلزها قرار دارند کاهش می‌یابد (Borowiak *et al.*, 2015). در بررسی حاضر این نسبت در همه غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و حتی در مقایسه با غلظت‌های بیشتر از این مقدار، بسیار کمتر بود که



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و نسبت کلروفیل a/b (D) - LSD مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

ساختارهای فتوسنتزی را در برابر آسیب‌های اکسیداسیون نوری محافظت می‌کنند (Kenneth *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2007; Sengar *et al.*, 2008)؛ با وجود این، کاهش نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (شکل ۳-B) در همه غلظت‌ها بجز غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی بیان‌کننده تجمع بیشتر کاروتنوئیدها در برابر کلروفیل‌ها در این غلظت‌ها است. این نسبت، شاخص اختصاصی برهم‌کنش فلزها با رنگیزه‌ها در نظر گرفته می‌شود و مقدار آن به نوع فلز و مرحله رشد گیاه استفاده‌شده بستگی دارد (Mysliwa-Kurdziel and Strzalka, 2002). افزایش این نسبت در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز از کاهش بیشتر کاروتنوئیدها در مقایسه با کلروفیل‌ها در این غلظت ناشی می‌شود. کاهش

روندی مشابه با کلروفیل a درباره تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر میزان کاروتنوئیدهای کل نیز مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده محافظت سلول‌ها در برابر تغییرات اکسیداتیو است (شکل ۳-A). پژوهش‌های پیشین بر سایر گونه‌ها نیز نتایج مشابهی به دست آمده‌اند (Tewari *et al.*, 2002; Borowiak *et al.*, 2015). کاروتنوئیدها در بسیاری از جنبه‌های فتوسنتز دخیل هستند. این رنگیزه‌ها علاوه بر عملکردشان به صورت رنگیزه‌های کمکی در جذب نور، عملکرد آنتی‌اکسیدانی نیز دارند و با فروکش کردن کلروفیل برانگیخته از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها در شرایط تنش جلوگیری و بدین ترتیب



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان کاروتنوئید کل (A) و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (B)- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

میلی گرم بر لیتر روی کاهش یافت؛ ولی این کاهش در مقایسه با شاهد و غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر بسیار اندک بود؛ بنابراین، میزان قندهای محلول در غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر در مقایسه با این غلظت‌ها بسیار بیشتر بود. بررسی بر گونه‌های مختلف گیاه بید (*Salix spp.*) نیز نشان داده است تنش فلز روی افزایش قندهای محلول را در این گیاه سبب شده است (Borowiak *et al.*, 2015). در متابولیسم گیاهی، محصولات فتوسنتزی در برگ‌ها تولید و پس از انتقال به بافت‌های مختلف،

تجمع کاروتنوئیدها در پاسخ به غلظت‌های زیاد روی (Mangal *et al.*, 2013) و سایر فلزهای سنگین (Baszynski *et al.*, 1988) پیش‌تر نیز گزارش شده است.

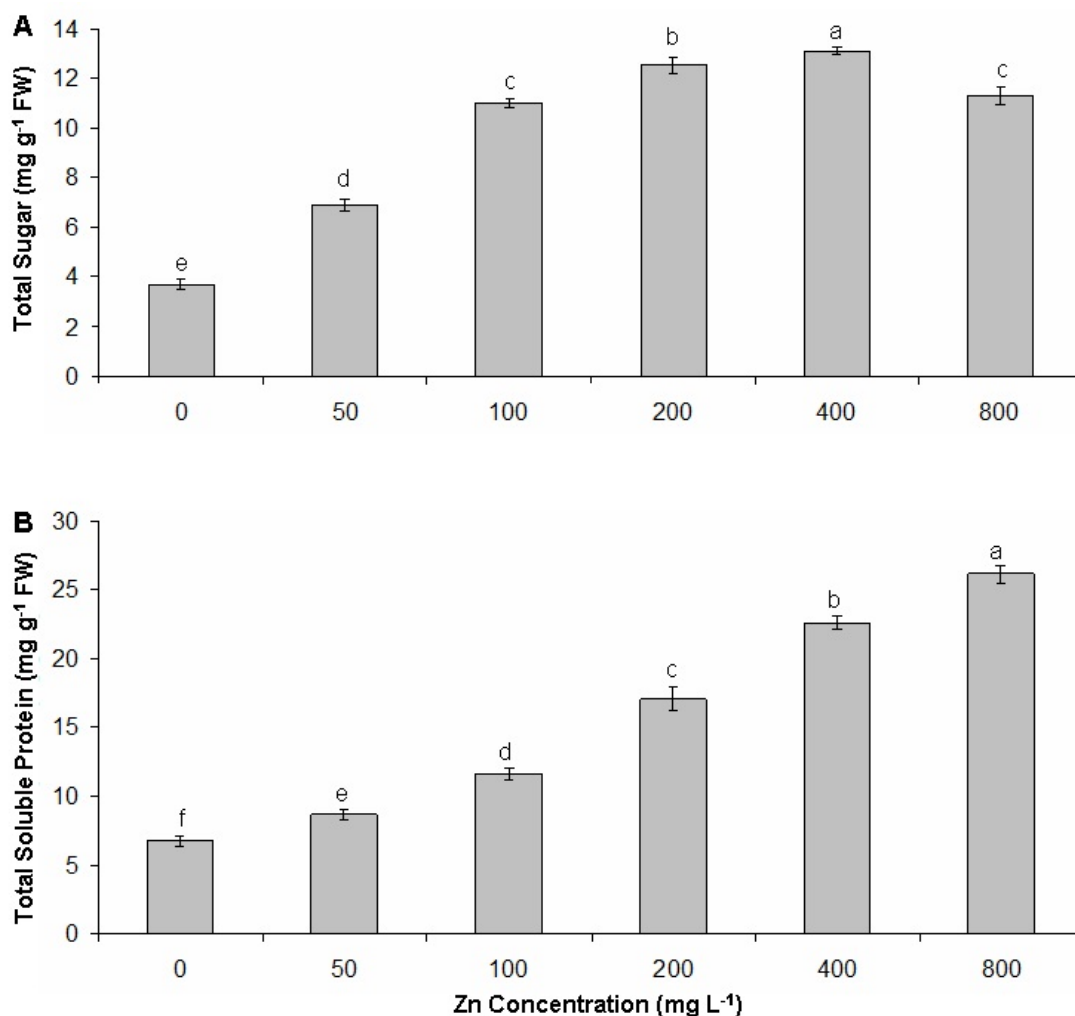
اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان قندها و پروتئین‌های محلول کل: میزان قندهای

محلول با افزایش غلظت روی در محیط کشت افزایش یافت و در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۴-A). میزان قندهای محلول در گیاهان تیمار شده با غلظت ۸۰۰

در مقایسه با شاهد افزایش یافت (شکل ۴-۵). بیشترین میزان پروتئین در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی مشاهده شد. وجود همبستگی مثبت بین غلظت روی و میزان پروتئین‌های محلول بیان‌کننده دخالت این عنصر در سنتز پروتئین‌ها یا افزایش انحلال پروتئین‌ها است. این همبستگی مثبت در گیاهان خردل (Samreen et al., 2017) و ذرت (Hisamitsu et al., 2001) نیز مشاهده شده است. اثر مثبت تیمار روی بر میزان پروتئین‌های دانه‌های خردل نیز گزارش شده است (Krishna, 1995). عنصر روی، جزء ساختاری و کاتالیتیک پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و در نتیجه برای رشد و نمو معمول گیاهان ضروری است (Broadley et al., 2007). به‌هر حال وجود همبستگی بین غلظت روی و میزان ازت در گیاه چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) رشد یافته در شرایط کشت هیدروپونیک نیز گزارش شده است (Sagardoy et al., 2009).

اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان فنل کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاه: میزان فنل کل همگام با افزایش غلظت روی در محیط کشت افزایش یافت و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۵-۵). با افزایش غلظت روی به ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان فنل کل کاهش پیدا کرد؛ با وجود این، میزان فنل‌ها در این غلظت‌ها در مقایسه با شاهد و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر همچنان بیشتر بود. افزایش میزان فنل‌ها بر اثر روی نشان‌دهنده نقش مهم این ترکیبات در پاسخ گیاه ریحان به تنش ناشی از عنصر روی برای انجام سازوکارهای سم‌زدایی است. تجمع ترکیبات فنلی ناشی از تنش عنصر روی، در

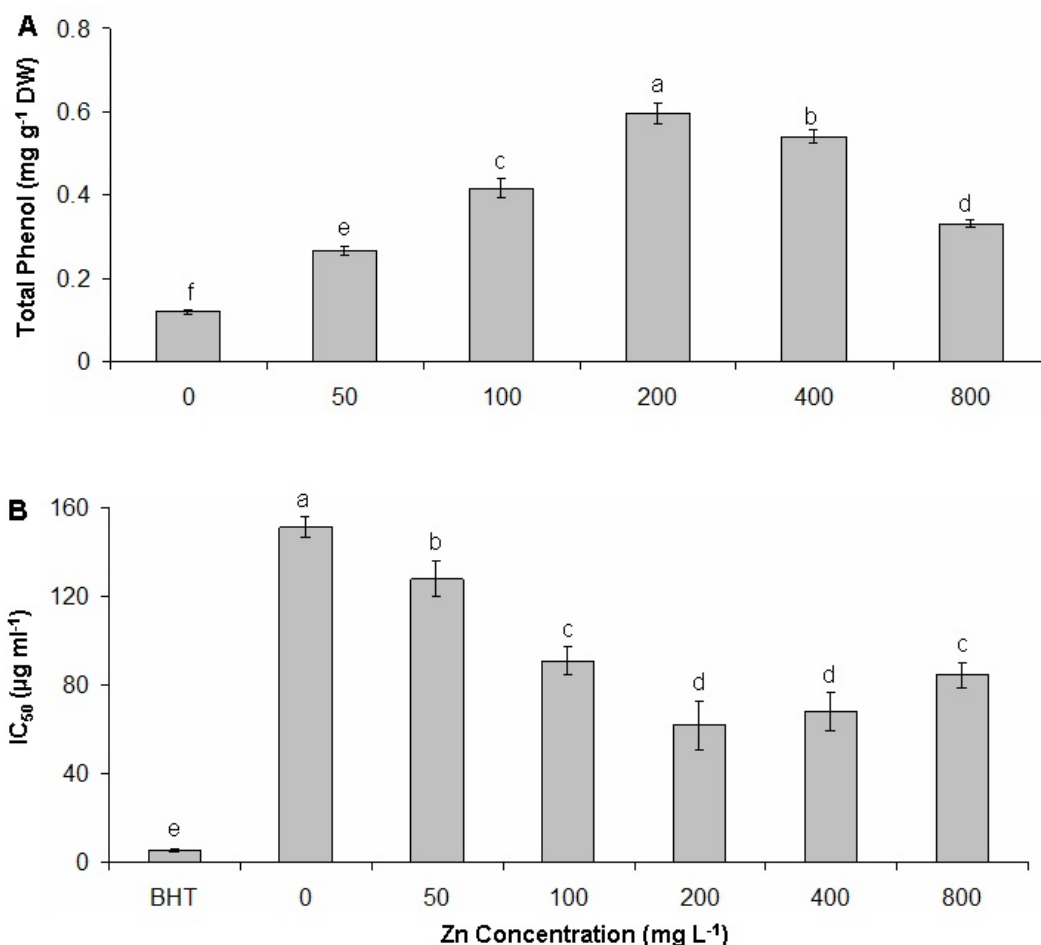
در پاسخ به ارتباطات منبع - مخزن تنظیم‌شده با بخش‌بندی کربن در مسیرهای بیوسنتزی سوکروز و نشاسته ذخیره می‌شوند (Taiz and Zeiger, 2006). معمولاً تنش فلزها تغییر در غلظت کربوهیدرات‌ها را در برگ‌های گیاهان سبب می‌شود. نتایج به‌دست آمده نشان دادند فلزهای سنگین مانند نیکل و مس بر تجمع قندهای محلول در برگ‌ها تأثیر می‌گذارند (Drzewiecka et al., 2012; Gasecka et al., 2012). در برگ‌های *Camellia sinensis*، مقادیر اضافی روی، افت قندهای محلول و احیاکننده را سبب شده‌اند (Mukhopadhyay et al., 2013). علاوه بر این مشخص شده است سایر فلزها مانند نیکل و مس تجمع قندها را در برگ‌های گونه‌های مختلف بید (*Salix* spp.) و نوعی کاج (*Pinus sylvestris*) تحریک می‌کنند (Roitto et al., 2005; Drzewiecka et al., 2017). افزایش غلظت قند در برگ‌ها احتمالاً در نتیجه اختلال در هیدرولیز نشاسته رخ می‌دهد (Taiz and Zeiger, 2006; Drzewiecka et al., 2012). سایر پژوهش‌ها نشان داده‌اند نتیجه تجمع ترکیبات فتوسنتزی، تغییر در میزان فتوسنتز و همچنین بروز اختلال در تعادل منبع - مخزن در گیاه است که در نهایت به پیری زودرس منجر می‌شود (Wingler et al., 2006; Tholen et al., 2007). در سایر پژوهش‌ها بیان شده است قندها مولکول‌های سیگنال کنترل‌کننده بیان ژن‌ها و فرایندهای تکوینی در گیاهان هستند (Morkunas et al., 2005; Hanson and Smeeckens, 2009). میزان پروتئین‌های محلول کل همگام با افزایش غلظت روی در محیط کشت به‌صورت معنی‌داری



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان قندهای محلول کل (A) و پروتئین‌های محلول کل (B) برگ‌های گیاه ریحان- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

برگی ریحان تیمارشده با غلظت‌های مختلف روی نشان داد میزان شاخص IC_{50} ، غلظتی از عصاره که در آن نیمی از رادیکال‌های دی فنیل پیکریل هیدرازیل خنثی می‌شوند، متناسب با افزایش غلظت روی در محیط کشت کاهش یافت و در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی به کمترین میزان خود رسید (شکل ۵-B). باوجود افزایش این شاخص در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، این میزان در مقایسه با شاهد و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر روی بسیار کمتر بود. کمتر بودن شاخص IC_{50}

برگ‌های گونه‌های مختلف بید (*Salix spp.*) و گیاه *Camellia sinensis* نیز مشاهده شده است (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Borowiak *et al.*, 2015) علاوه بر این، افزایش میزان فنل‌ها در برگ‌های نوعی بید (*Salix viminalis*) در معرض غلظت‌های مختلف مس و نیکل (Drzewiecka *et al.*, 2012; Gasecka *et al.*, 2012) و گیاه *Vaccinium myrtillus* بر اثر غلظت‌های مختلف روی و سرب (Bialonska *et al.*, 2007) نیز گزارش شده است. بررسی ظرفیت خنثی کردن رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل با عصاره‌های



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف روی بر میزان فنل کل (A) و قدرت آنتی‌اکسیدانی (B) برگ‌های گیاه ریحان- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

می‌شود (Valdez-Solana *et al.*, 2015). نقش گیاهان دارویی در ممانعت از بیماری‌ها یا تنظیم آنها به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن گیاهان مربوط می‌شود که به میزان پلی‌فنل‌های موجود در آنها بستگی دارد (Demiray *et al.*, 2009). ترکیبات فنلی، یک یا چند حلقه آروماتیک یا چندین گروه هیدروکسیل دارند (Rice-Evans *et al.*, 1995) این ترکیبات، از نظر زیستی فعال و به دلیل داشتن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد سرطانی در فرایندهای دفاع دخیل هستند (Lee *et al.*, 2004; Fresco *et al.*, 2006) ویژگی

نشان‌دهنده بیشتر بودن ظرفیت خنثی کردن رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل و در نتیجه بیشتر بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ‌ها است. مقایسه بین میزان ترکیبات فنلی و ظرفیت خنثی کردن رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل (شکل‌های ۵- A تا B) نشان‌دهنده وجود همبستگی مثبت بین افزایش میزان فنل‌ها با کاهش شاخص IC₅₀ و در نتیجه افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاه است. گیاهان، منبع مهم تغذیه‌ای و دارویی به شمار می‌روند. ارزش دارویی گیاهان بیشتر از میزان متابولیت‌های ثانویه و ترکیب عنصری آنها ناشی

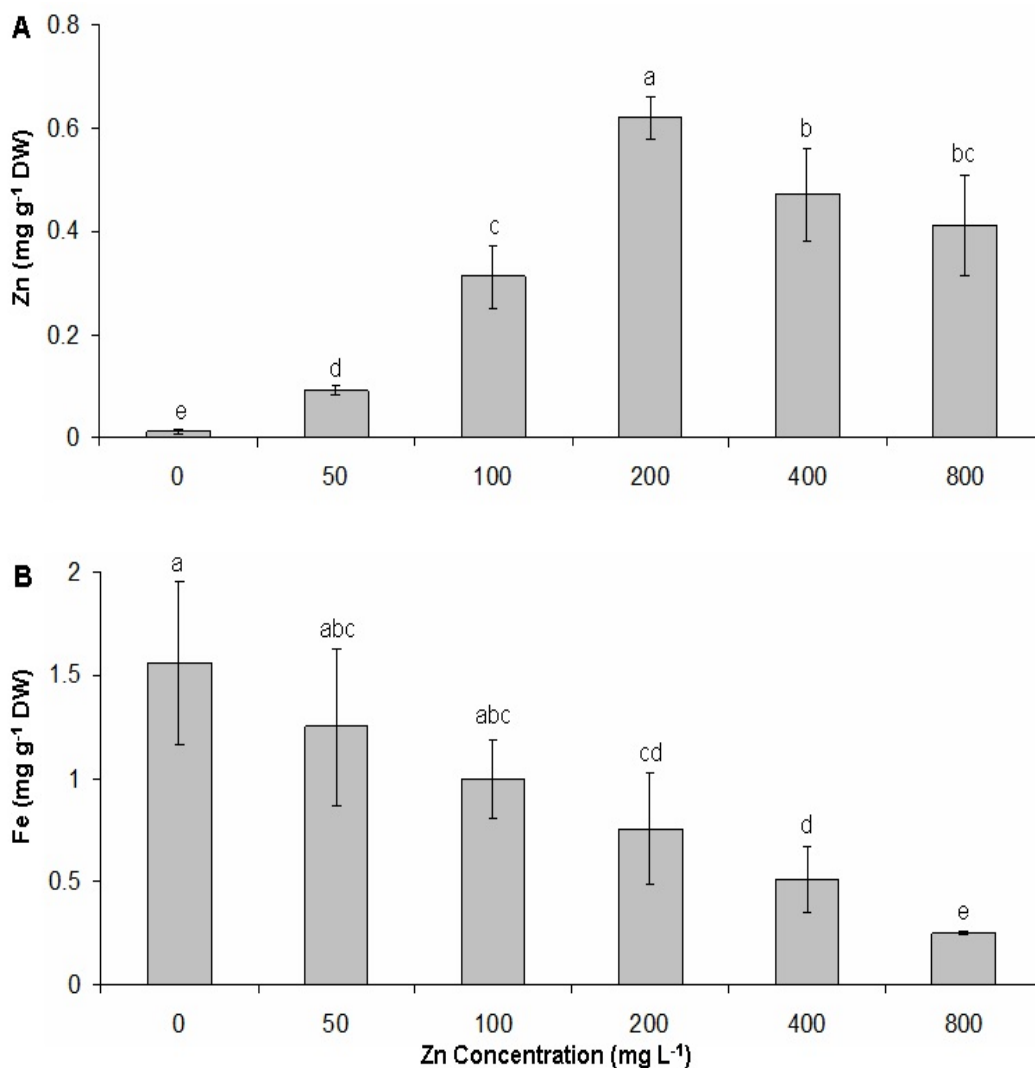
غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر روی (شکل ۶-۱) نشان‌دهنده توانایی زیاد این گیاه در انباشتن فلز روی در برگ‌ها در مناطق آلوده به این عنصر است. تأثیر مثبت غلظت‌های مختلف عنصر روی بر محتوای روی گیاه خردل نیز مشاهده شده است (Samreen et al., 2017). بررسی‌های انجام‌شده درباره ارتباط بین عنصر روی و فسفر در گیاه *Thlaspi caerulescens* نشان دادند محتوای کل روی در بخش‌های هوایی با اضافه کردن روی به محیط کشت گیاه افزایش می‌یابد (Zhao et al., 1998).

عنصر روی اثر منفی بر میزان آهن و جذب آن در گیاه ریحان دارد؛ به طوری که همگام با افزایش غلظت روی، میزان آهن گیاه کاهش می‌یابد (شکل ۶-۲). میزان آهن گیاهان تیمارشده با غلظت ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر روی در مقایسه با شاهد ۸۴ درصد کاهش یافت. تأثیر منفی افزایش غلظت روی بر جذب آهن در گیاهان ماش (Samreen et al., 2017) و لیموترش (Rajaie et al., 2009) نیز گزارش شده است. بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند استفاده از عنصر روی اثر منفی بر غلظت آهن در بافت‌های گیاهی دارد (Mousavi et al., 2012). گیاهان دچار کمبود روی، در بخش هوایی خود مقادیر بیشتر آهن را در مقایسه با گیاهان رشد یافته در مقادیر کافی این عنصر دارند (Imtiaz et al., 2003). مشخص شده است عنصر روی بر عملکرد متابولیک آهن به شدت تأثیر می‌گذارد. در حقیقت حضور بیش از حد یکی از این دو عنصر در جذب عنصر دیگر اختلال ایجاد می‌کند (Francois and Goodin, 1972). کاهش آهن ممکن است

آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی بیشتر به دلیل فعالیت‌های اکسید و احیای آنها، توانایی زیاد برای جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کلات کردن یون‌های فلزی است (Rice-Evans et al., 1995; Rice-Evans et al., 1997; Fresco et al., 2006). به همین دلیل، میزان ترکیبات فنلی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه مرتبط است. این نتایج نشان می‌دهند فعالیت دارویی گیاهان که بیشتر به ترکیبات فعال موجود در گیاهان وابسته است، به محل رشد و عوامل اقلیمی و تغذیه‌ای بستگی دارد؛ بنابراین، ترکیب عناصر معدنی و غلظت آنها در محلول خاک بر میزان متابولیت‌های ثانویه و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و تغذیه‌ای گیاه مؤثر است.

اثر غلظت‌های مختلف روی بر محتوای

روی و آهن برگ‌ها: اندازه‌گیری محتوای عنصر روی برگ‌های گیاه ریحان در معرض غلظت‌های مختلف روی نشان داد با افزایش غلظت روی در محیط کشت گیاه، محتوای روی برگ‌ها به طور معنی‌دار افزایش یافت و در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر به بیشترین مقدار خود رسید (شکل ۶-۱). با وجود کاهش محتوای روی در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر لیتر، میزان این عنصر در غلظت ۴۰۰ نسبت به شاهد و غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر روی و در غلظت ۸۰۰ نسبت به شاهد و غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر روی بیشتر بود. کاهش جذب روی در غلظت‌های بیشتر از ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر ممکن است از اشباع نسبی جایگاه‌های جذب این عنصر در ریشه ناشی شود. به هر حال بیشتر بودن محتوای روی در این غلظت‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد و تیمارشده با



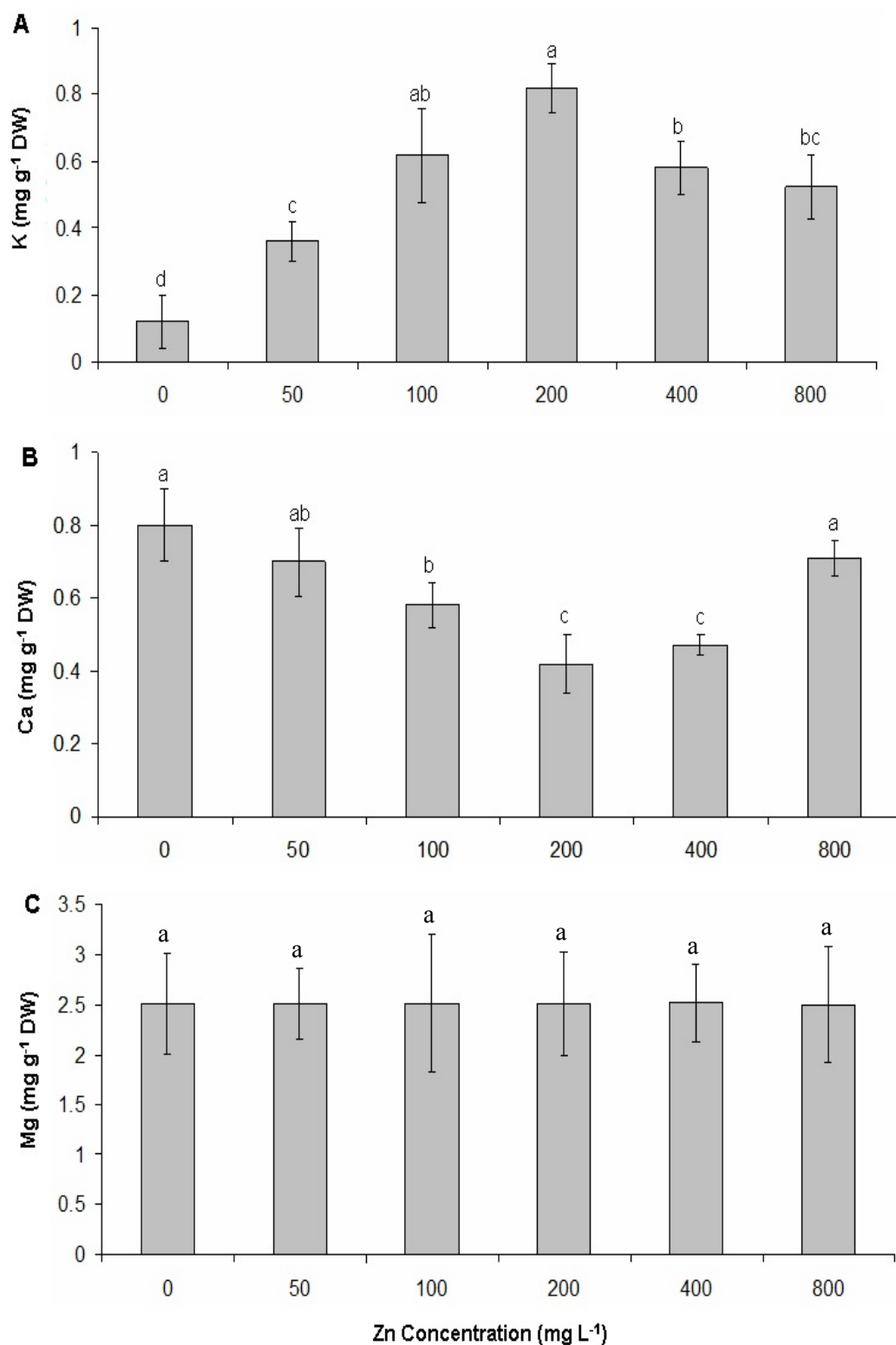
شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف روی بر محتوای روی (A) و آهن (B) برگ‌های گیاه ریحان- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

پژوهش حاضر افزایش غلظت روی، میزان آهن را در بافت برگ گیاه ریحان کاهش داد.

اثر غلظت‌های مختلف روی بر محتوای

پتاسیم، منیزیم و کلسیم برگ‌ها: محتوای پتاسیم برگ‌های گیاه ریحان با افزایش غلظت روی در محیط‌کشت افزایش یافت؛ در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به بیشترین مقدار خود رسید و در غلظت‌های بیشتر روی کاهش یافت (شکل ۷-A).

به دلیل برهم کنش‌های رقابتی با عنصر روی در جایگاه‌های جذب موجود در ریشه‌های گیاه باشد. احتمالاً کمبود روی، تنظیم جذب یون‌های غذایی مختلف را از جمله آهن مختل می‌کند و تجمع این یون‌ها را در بافت‌های گیاهی سبب می‌شود (Lonergan *et al.*, 1982)؛ بنابراین روی، نقش اساسی در کارایی غشای سلول‌های ریشه دارد (Graham *et al.*, 1987). به همین دلیل، در



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف روی بر محتوای پتاسیم (A)، کلسیم (B) و منیزیم (C) برگ‌های گیاه ریحان- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. حروف متفاوت بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با آزمون LSD هستند.

میزان منیزیم هیچ تغییری نکرد. در غلظت‌های زیاد روی، کاهش رشد، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و ترکیبات فنلی مشاهده شد؛ ولی میزان آنها به مقدار شاهد نرسید و بیشتر از آن بود که نشان می‌دهد گیاه ریحان مقاومت بسیار زیادی نسبت به تنش فلز روی دارد و با رشد در نواحی آلوده به این عنصر نقش مؤثری در تغذیه روی در انسان ایفا می‌کند. تجمع قندها و پروتئین‌های محلول کل به صورت پیوسته همگام با افزایش غلظت روی اتفاق افتاد. به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده نقش مهم روی در پایداری و محافظت از گیاه ریحان در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند.

سپاسگزاری

در اینجا از معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان بابت حمایت مالی از مقاله حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M. and Sharma, V. (2012) Metal toxicity and photosynthesis. In: photosynthesis: overviews on recent progress and future perspectives (Eds. Itoh, S., Mohanty, P. and Guruprasad, K. N.) 229-236. IK International Publishing House (Pvt) Limited, New Delhi.
- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Baker, A. J. M. (1978) Ecophysiological aspects of zinc tolerance in *Silene maritime*. *New Phytologist* 80: 635-642.

باوجود این کاهش، میزان پتاسیم در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی نسبت به شاهد و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر روی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود؛ برعکس، تأثیر غلظت‌های مختلف روی بر میزان کلسیم برگ‌های گیاه ریحان مانند تأثیر این عنصر بر محتوای آهن، منفی بود و با افزایش غلظت روی در محیط کشت، محتوای کلسیم برگ‌ها کاهش یافت و در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر روی به کمترین مقدار خود رسید (شکل ۷-B)؛ در نتیجه ممکن است هردو عنصر روی و کلسیم با سازوکار مشابهی جذب شوند و بنابراین، مقادیر اضافی یک عنصر از جذب عنصر دیگر ممانعت کند. برخلاف تأثیر مثبت غلظت‌های زیاد روی بر جذب عنصر منیزیم در گیاه خردل (Samreen et al., 2017)، در برگ‌های ریحان تیمار با غلظت‌های مختلف روی، تأثیر معنی‌داری بر جذب منیزیم در این گیاه نداشت (شکل ۷-C).

جمع‌بندی

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نقش دوگانه روی را نشان می‌دهند؛ به‌طوری‌که تیمار گیاه ریحان با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر این عنصر افزایش معنی‌دار رشد، سطح برگ، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها، پروتئین‌های محلول کل، ترکیبات فنلی، قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاه و محتوای عناصری مانند روی و پتاسیم را سبب شد؛ درحالی‌که غلظت‌های بیشتر و کمتر روی، عوامل یادشده را کاهش دادند. محتوای آهن و کلسیم گیاه متناسب با افزایش غلظت روی به‌شدت کاهش یافت؛ ولی

- Baszynski, T., Tukendorf, A., Ruszkowska, M., Sko'rzynska, E. and Maksymiec, W. (1988) Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal of Plant Physiology* 132: 708-713.
- Bert, V., MacNair, M. R., De Laguerie, P., Saumitou-laprade, P. and Petit, D. (2000) Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* 146: 225-233.
- Bialonska, D., Zobel, A. M., Kuras, M., Tykarska, T. and Sawicka-Kapusta, K. (2007) Phenolic compounds and cell structure in bilberry leaves affected by emissions from a Zn-Pb smelter. *Water, Air and Soil Pollution* 181: 123-133.
- Biswal, A. K., Pattanayak, G. K., Pandey, S. S., Leelavathi, S., Reddy, V. S., Govindjee, and Tripathy, B. C. (2012) Light intensity-dependent modulation of chlorophyll b biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide a oxygenase in tobacco. *Plant Physiology* 159: 433-449.
- Borowiak, K., Gasecka, M., Mleczek, M., Dabrowski, J., Chadzinikolau, T., Magdziak, Z., Golinski, P., Rutkowski, P. and Kozubik, T. (2015) Photosynthetic activity in relation to chlorophylls, carbohydrates, phenolics and growth of a hybrid *Salix purpurea* × *triandra* × *viminalis* 2 at various Zn concentrations. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 155.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. and Lux, A. (2007) Zinc in plants. *New Phytologist* 173: 677-702.
- Bunrathep, S., Palanuvej, C. and Ruangrunsi, N. (2007) Chemical compositions and antioxidative activities of essential oils from four *Ocimum* species endemic to Thailand. *Journal of Health Research* 3: 201-206.
- Cenkci, S., Cigerci, I. H., Yildiz, M., Ozay, C., Bozdog, A. and Terzi, H. (2010) Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genome template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany* 67: 467-473.
- Cuypers, A., Vangronsvve, J. and Clijsters, H. (2001) The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 657-664.
- Demiray, S., Pintado, M. E. and Castro, P. M. L. (2009) Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plant: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 54: 312-317.
- Deng, H., Ye, Z. H. and Wong, M. H. (2006) Lead and zinc accumulation and tolerance in populations of six wetland plants. *Environmental Pollution* 141: 69-80.
- Dhir, B., Sharmila, P. and Pardha Saradhi, P. (2008) Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 61-70.
- Drzewiecka, K., Mleczek, M., Gasecka, M., Magdziak, Z., Budka, A., Chadzinikolau, T., Kaczmarek, Z. and Goliński, P. (2017) Copper and nickel co-treatment alters metal uptake and stress parameters of *Salix purpurea* × *viminalis*. *Journal of Plant Physiology* 216: 125-134.
- Drzewiecka, K., Mleczek, M., Gasecka, M., Magdziak, Z. and Golinski, P. (2012) Changes in *Salix viminalis* L. cv. 'Cannabina' morphology and physiology in response to nickel ions-

- hydroponic investigations. *Journal of Hazardous Materials* 217-218: 429-438.
- Dudka, S., Piotrowska, M. and Terelak, H. (1996) Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop: a field study. *Environmental Pollution* 994: 181-188.
- Eggink, L. L., LoBrutto, R., Brune, D. C., Brusslan, J., Yamasato, A., Tanaka, A. and Hooper, J. K. (2004) Synthesis of chlorophyll b: localization of chlorophyllide a oxygenase and discovery of a stable radical in the catalytic subunit. *BMC Plant Biology* 4: 5-21.
- Eggink, L. L., Park, H. and Hooper, J. K. (2001) The role of chlorophyll b in photosynthesis: hypothesis. *BMC Plant Biology* 1: 2-9.
- Einali, A. and Valizadeh, J. (2015) Propyl gallate promotes salt stress tolerance in green microalga *Dunaliella salina* by reducing free radical oxidants and enhancing b-carotene production. *Acta Physiologicae Plantarum* 37: 83.
- Francois, L. E. and Goodin, J. R. (1972) Interaction of temperature and salinity on sugar beet germination. *Agronomy Journal* 64: 272-273.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. and Marques, M. P. M. (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews* 26: 747-766.
- Gasecka, M., Mleczek, M., Drzewiecka, K., Magdziak, Z., Rissmann, I., Hadzinikolau, T. and Golinski, P. (2012) Physiological and morphological changes in *Salix viminalis* L. as a result of plant exposure to copper. *Journal of Environmental Science and Health A* 47: 548-557.
- Graham, R. D., Welch, R. M., Grunes, D. L., Cary, E. E. and Norvell, A. A. (1987) Effect of zinc deficiency on the accumulation of boron and other mineral nutrients in barley. *Soil Science Society of America Journal* 51: 652-657.
- Hanif, A. M., Al-Maskari, Y. M., Al-Maskari, A., Al-Shukaili, A., Al-Maskari, Y. A. and Al-Sabahi, N. J. (2011) Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored Omani basil. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 751-757.
- Hanson, J. and Smeekens, S. (2009) Sugars perception and signaling-an update. *Current Opinion Plant Biology* 12: 562-567.
- Hisamitsu, T. O., Ryuichi, O. and Hidenobu, Y. (2001) Effect of zinc concentration in the solution culture on the growth and content of chlorophyll, zinc and nitrogen in corn plants (*Zea mays* L.). *Journal of Tropical Agriculture* 36: 58-66.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q. and Chang, C. (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 62-69.
- Imtiaz, M., Alloway, B. J., Shah, K. H., Siddiqui, S. H., Memon, M. Y., Aslam, M. and Khan, P. (2003) Zinc Nutrition of Wheat: II: Interaction of Zinc with other trace elements. *Asian Journal of Plant Sciences* 2: 156-160.
- Kashyap, C. P., Ranjeet, K., Vikrant, A. and Vipin, K. (2011) Therapeutic Potency of *Ocimum Kilimandscharicum* Guerke - A Review. *Global Journal of Pharmacology* 5: 191-200.
- Kenneth, K., Pallett, K. E. and Young, A. J. (2000) Carotenoids. In: *Antioxidants in higher plants* (Eds. Ruth, G. A. and Hess, J. L.) 59-91. CRC Press, Boca Raton.
- Krishna, S. (1995) Effect of sulphur and zinc application on yield, S and Zn uptake and protein content of mung (green gram). *Legume Research* 18: 89-92.
- Kukic, J., Popovic, V., Petrovic, S., Mucaji, P., Ciric, A., Stojkovic, D. and Sokovic, M. (2008) Antioxidant and antimicrobial

- activity of *Cynara cardunculus* extracts. Food Chemistry 107: 861-868.
- Lee, J. Y., Hwang, W. I. and Lim, S. T. (2004) Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. Journal of Ethnopharmacology 93:409-415.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry F4.3.1-F4.3.8.
- Mangal, M., Agarwal, M. and Bhargava, D. (2013) Effect of cadmium and zinc on growth and biochemical parameters of selected vegetables. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2: 106-114.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. 2nd edition, Academic Press, London.
- Marwat, S. K., Rehman, F., Khan, M. S., Ghulam, S., Anwar, S., Mustafa, G. and Usman, K. (2011) Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of Sweet Basil-*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Asian Journal of Chemistry 23: 3773-3782.
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silveira, V. and Owens, H. S. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry 22: 1156-1158.
- Mishra, S. and Dubey, R. S. (2005) Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. In: Handbook of photosynthesis (Ed. Pessaraki, M.) 845-863. 2nd edition. CRC Press, Taylor and Francis Publishing Company, Florida.
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E. and Magel, E. (2001) Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metals pollution. Environmental Pollution 112: 121-129.
- Morkunas, I., Marczak, L., Stachowiak, J. and Stobiecki, M. (2005) Sucrose induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: sucrose stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. Plant Physiology and Biochemistry 43: 363-373.
- Mousavi, S. R., Galavi, M. and Rezaei, M. (2012) The interaction of zinc with other elements in plants: a review. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 4: 1881-1884.
- Mukhopadhyay, M. S., Das, A., Subba, P., Bantawa, P., Sarkar, B., Ghosh, P. and Mondal, T. K. (2013) Structural, physiological, and biochemical profiling of tea plants under zinc stress. Biologia Plantarum 57: 474-480.
- Mysliwa-Kurdziel, B. and Strzalka, K. (2002) Influence of metals on biosynthesis of photosynthetic pigments. In: Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants (Eds. Prasad, M. N. V. and Strzalka, K.) 201-227. Springer, Amsterdam.
- Omokolo, N. D., Tsala, N. G. and Djocgoue, P. F. (1996) Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. Annals of Botany 77: 153-158.
- Pourraut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. (2011) Lead uptake, toxicity and detoxification in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 213: 113-136.
- Prasad, M. N. V. (2004) Heavy metal stress in plants. From biomolecules to ecosystems. Springer, Berlin.
- Prasad, M. N. V. and Strzalka, K. (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Heavy metal stress in plants (Eds. Prasad, M. N. V. and Hagemeyer, J.) 117-138. Springer Verlag, Berlin.
- Rajaie, M., Ejraie, A. K., Owliaie, H. R. and Tavakoli, A. R. (2009) Effect of

- zinc and boron interaction on growth and mineral composition of lemon seedlings in a calcareous soil. *International Journal of Plant Production* 2: 39-50.
- Ramawat, K. G. and Merillon, J. M. (2008) Bioactive molecules and medicinal plants. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ravandeh, M., Valizadeh, J., Noroozifar, M. and Khorasani-Motlagh, M. (2011) Screening of chemical composition of essential oil, mineral elements and antioxidant activity in *Pulicaria Undulata* L. C. A. Mey from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 2035-2040.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. and Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 23: 375-383.
- Richardson, M. D., Hoveland, C. S. and Bacon, C. W. (1993) Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and nonsymbiotic tall fescue. *Crop Science* 33: 145-149.
- Roitto, M., Rautio, P., Julkunen-Tiitto, R., Kukkola, E. and Huttunen, S. (2005) Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings exposed to nickel and copper. *Environmental Pollution* 137: 603-609.
- Sagardoy, R., Morales, F., Lopez-Millan, A. F., Abadia, A. and Abadia, J. (2009) Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology (Stuttgart)* 11: 339-350.
- Samreen, T., Shah, H. U., Ullah, S. and Javid, M. (2017) Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mung beans plant (*Vigna radiata*). *Arabian Journal of Chemistry* 7: 145-152.
- Sengar, R. K., Gautam, M., Sengar, R. K., Grag, S. K., Sengar, K. and Chaudhary, R. (2008) Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 196: 73-93.
- Shafique, M., Khan, J. S. and Khan, H. N. (2011) Study of antioxidant and antimicrobial activity of sweet basil (*Ocimum basilicum*) essential oil. *Pharmacology Online* 1: 105-111.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Stiborova, M., Doubravova, M., Brezinova, A. and Friedrich, A. (1986) Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley. *Photosynthetica* 20: 418-425.
- Symeonidis, L., McNeilly, T. and Bradshaw, A. D. (1985) Differential tolerance of three cultivars of *Agrostis capillaris* L. to Cd, Cu, Pb, Ni and Zinc. *New Phytologist* 101: 309-315.
- Taiz, R. L. and Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*. 4th edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K. and Tanaka, A. (2001) Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 26: 365-373.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N. and Bisht, S. S. (2002) Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* 162: 381-388.
- Tholen, D., Pons, T., Voeselek, L. and Poorter, H. (2007) Ethylene insensitivity results in down-regulation of Rubisco

- expression and photosynthetic capacity in tobacco. *Plant Physiology* 144: 1305-1315.
- Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H. and Coudret, A. (2005) Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. *Chemosphere* 59: 1005-1013.
- Valdez-Solana, M. A., Mejia-Garcia, V. Y., Tellez-Valencia, A., Garcia-Arenas, G., Salas-Pacheco, J., Alba-Romero, J. J. and Sierra-Campos, E. (2015) Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* grown in Mexico. *Journal of Chemistry* 2015: ID860381.
- Vassilev, A., Nikolova, A., Koleva, L. and Lidon, F. (2011) Effect of excess zinc on growth and photosynthetic performance of young bean plants. *Journal of Physiology* 3: 58-62.
- White, M. C., Chaney, R. L. and Decker, A. M. (1974) Differential varietal tolerance in soybean to toxic levels of zinc in sassafras sandy loam. *Agronomy Abstracts* 1: 144-145.
- Wingler, A., Purdy, S., MacLean, A. and Pourtau, N. (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 57: 391-399.
- Zarcinas, B. A., Pongsakul, P., McLaughlin, M. J. and Cozens, G. (2004) Heavy metals in soils and crops in Southeast Asia 2, Thailand. *Environmental Geochemistry and Health* 26: 359-371.
- Zengin, F. K. and Munzuroglu, O. (2005) Effect of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47: 157-164.
- Zhao, F. J., Shen, Z. G. and McGrath, S. P. (1998) Solubility of zinc and interactions between zinc and phosphorus in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment* 21: 108-114.