بررسی تأثیر نانوذرات مس و محلول کلرید مس بر جوانه‌زنی و برخی فاکتورهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

فروغ یوسف‌زایی[۱]، لطیفه پوراکبر[۱*]، خلیل فرهادی[۲] و رحیم مولایی[۲]

[۱] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[۲] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده شیمی

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۷

چکیده

مس یک ریزمغذی ضروری برای گیاه است، به گونه‌ای که کمبود آن متابولیسم گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مقدار زیاد مس از طریق ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن باعث ایجاد سمیت در گیاه می‌شود. این پژوهش به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات مس و محلول کلرید مس ppm ۱۰، ۵، ۱۰ بر رشد و مورفولوژی گیاه ریحان انجام شد. نتایج نشان داد که کاهش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص جوانه‌زنی در حضور محلول کلرید مس بیشتر از نانوذرات مس بود. اندازه‌گیری طول، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی نمایانگر تأثیر منفی افزایش غلظت‌های نانوذرات مس و محلول کلرید مس بر این پارامترهاست. با افزایش غلظت‌های محلول کلرید مس میزان کلروفیل a در کلیه گیاهان تحت تیمار کاهش یافت. همچنین افزایش غلظت محلول کلرید مس در مقایسه با نانوذرات مس، مقدار فلاونوئید و فنل کل را به طور چشمگیری افزایش داد. میزان آنتوسیانین در گیاهان تحت تأثیر نانوذرات مس بیشتر از کلرید مس بود. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات مس در مقایسه با محلول کلرید مس اثر سمیت کمتری بر رشد گیاه ریحان داشت.

واژه‌های کلیدی: ریحان (*Ocimum basilicum* L.) ، نانوذرات مس، فنل، فلاونوئید، کلروفیل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۴۰۰۹۸۷ ، پست الکترونیکی: l.pourakbar@urmia.ac.ir

مقدمه

نانوذرات عبارتند از: ذرات اولیه‌ای که ابعاد آنها کمتر از ۱۰۰ نانومتر است. امروزه در دنیا، نانو تکنولوژی به عنوان پیشرفته‌ترین فناوری عصر حاضر توانسته در تمامی بخش‌ها و زوایای حیات انسانی، جانوری، گیاهی، زیست محیطی و صنعتی رخنه کرده و با نوآوری خود، وضعیت فعلی و آینده آنها را تحت تأثیر خود قرار دهد و همانند اختراعاتی مانند موتور بخار و اینترنت، استعداد و پتانسیل ایجاد تحولاتی بنیادی و اساسی را در دیگر فناوری‌ها و بخشهای مختلف علمی و صنعتی ایجاد کند (۷). نتیجه فعالیت های بشر ورود نانوذرات به محیط است، هنوز اطلاعات دقیقی از تأثیر مواد بر محیط و آثار سمی آنها وجود ندارد (۲۲). در معدود تحقیقات انجام شده در مورد سمیت نانوذرات در گیاهان، نتایج حاکی از اختلال در جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهان است. نتایج مطالعات در دسترس بیانگر واکنش متفاوت گونه‌های مختلف گیاهان به مواد غذایی تهیه شده به شکل نانو می‌باشد. برای مثال، Zhu و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که *Cucurbita maxima* در حال رشد در یک محیط آبی حاوی نانو ذرات مگنتیت می‌تواند ذرات را در بافتهای گیاهی جذب کرده، حرکت داده وانباشته کند، از سوی دیگر، *Phaseolus limensis* قادر به جذب و انتقال نانوذرات مگنتیت نیست. بنابراین گیاهان مختلف واکنش

های متفاوتی به نانوذرات دارند(۲۹). گزارشهای محدودی مبنی برتأثیر مثبت مواد غذایی به شکل کودهای نانو بر رشد برخی گیاهان از جمله بادام زمینی(۲۱)، نخود (۱۷)، اسفناج (۲۶) و ریحان (۱۹) وجود دارد.

مس (Cu) عنصری کم مصرف، اما ضروری برای همه گیاهان عالی است که از نظر ویژگی‌های اکسیداسیون-احیا و همچنین تشکیل کمپلکس‌های بسیار پایدار به آهن شباهت دارد. مس دو ظرفیتی سریعاً می‌تواند به مس تک ظرفیتی احیاء شود. نقش مهم مس به عنوان عنصر غذایی به دلیل شرکت آن در ساختمان آنزیم‌های مهم و مشارکت در نقل و انتقال الکترون‌ها در واکنش‌های اکسیداسیون-احیا می‌باشد. به دلیل تمایل بالای این عنصر به تشکیل پیوند با گروه‌های مختلف، بیش از ۹۸-۹۹٪ مس به صورت کمپلکس در گیاهان وجود دارد (۱۰). سمیت مس در گیاهان از دو دیدگاه حائز اهمیت است: یکی اینکه عموماً گیاهان زراعی در مقابل سمیت مس حساسیت فوق‌العاده‌ای نشان می‌دهند و دیگری انباشتگی مس در خاک‌های زراعی به دلیل استفاده از علف‌کش‌ها و قارچ‌های صنعتی و نیز ورود آب‌های صنعتی و فاضلاب کارخانه‌ها به مزارع یکی از مشکلات رایج در کشاورزی مدرن است. سمیت مس محدوده وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی وبیوشیمیایی را در بر می‌گیرد که مهمترین آنها عبارتند از: فتوسنتز، سنتز رنگدانه‌ها، متابولیسم پروتئین‌ها و تمامیت غشا مسمومیت گیاه با مس می‌تواند به عنوان یک عامل تنش‌زا عمل کرده و توازن آبی گیاه را بر هم زده، سمیت این عنصر همچنین می‌تواند تجمع پرولین را در بافت‌های گیاهی موجب شود که این موضوع در بسیاری از گونه‌های گیاهی به خوبی اثبات شده است (۵). مطالعات نشان دادند که یونجه می‌تواند در وضعیت حاوی فلزات سنگین رشد کند. غلظت‌های کم کادمیوم، کروم، مس، نیکل و روی، رشد ریشه و ساقچه را در یونجه افزایش می‌دهند. تنها فلز روی توانست در غلظت‌های بیش از ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر، موجب افزایش رشد ریشه‌چه نسبت به ریشه گیاهچه‌های شاهد شود (۱۶).

ریحان یکی از محبوب‌ترین گیاهان دارویی پرورش یافته در جهان می‌باشد. این گیاه بومی قاره آسیا (هند، پاکستان، ایران، تایلند و دیگر کشورها) می‌باشد، همچنین بعضی از گونه‌های وحشی آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دیده می‌شود. ریحان متعلق به جنس *Ocimum* ، خانواده *Lamiaceae* ، راسته *Lamiales* ، زیررده *Asterideae* ، رده *Magnoliopsida* ، زیر شاخه *Spermatophyta* و سلسله *Phantae* می‌باشد (۳۰). ریحان گیاهی یکساله و علفی است که به ارتفاع یک متر رشد می‌کند و دارای ساقه چهارگوش می‌باشد، برگ ریحان برای معطر ساختن اغذیه به کار می‌رود، به حالت خام مصرف می‌گردد و خواص درمانی خاصی از جمله تقویت عمل دستگاه هضم، از بین بردن نفخ، سرگیجه، رفع ورم کلیه و ترشحات زنانگی دارد (۱).

هدف از این تحقیق بررسی مقایسه اثر نانوذره مس و کلرید مس بر شاخص های جوانه‌زنی بذر گیاه ریحان و همچنین برخی خواص فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ریحان است.

مواد و روشها

سنتز نانوذرات مس: سنتز نانوذرات مس با اندازه کمتر از ۲ nm با استفاده از نمک ۰/۲ مولار کلرید مس در حضور اسید آلی انجام شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌لیتر از کلرید مس ۰/۲ مولار با ۱۰۰ میلی لیتر اسیدآسکوربیک ۰/۴ مولار در حمام روغن برای مدتی از زمان قرار گرفت (۸).

شرایط و نحوه کشت: بذر گیاه ریحان از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. در این آزمایش ۲۵ عدد بذر انتخاب و ضد عفونی شدند. در ابتدا بذرها برای ضد عفونی در الکل ۷ درصد به مدت ۱۰ ثانیه و بعد از آن در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد و بعد با آب مقطر شستشو

داده شد. سپس ۲۵ بذر در داخل پتری دیش‌هایی که حاوی دو عدد کاغذ واتمن شماره ۱ بودند، قرار گرفتند. برای تیمار دهی از نانوذرات مس و کلرید مس در غلظت های ppm ۰، ۱، ۵ و ۱۰ استفاده گردید. بر حسب تیمار به هر پتری دیش ml ۵ از غلظت مورد نظر اضافه شد. برای هر تیمار سه تکرار کشت انجام گردید. سپس پتری دیش ها داخل انکوباتور با دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند. هر زمان که محیط کشت نیاز به محلول داشت به تکرارها به اندازه مساوی محلول مورد نظر اضافه شد.

آزمایش دوم به روش کشت گلدان انجام شد. بدین منظور بذرهای سالم به گلدانهای پلاستیکی حاوی ماسه انتقال یافتند. گلدان ها در اتاقک‌های کشت با شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی ، ۱۰ ساعت تاریکی و دمای بیشینه ۲۵ درجه سانتیگراد و کمینه ۲۱ درجه سانتیگراد و شدت نور 150 µmol.m-2.s قرار گرفتند–گلدان‌ها به طور متناوب در هفته اول با محلول یک چهارم قدرت هوگلند و آب مقطر و در هفته‌های بعد با محلول نیم قدرت هوگلند و در آخر هوگلند کامل و با آب مقطر به طور متناوب آبیاری شدند.

اعمال تیمار: زمانی که گیاهچه‌های ریحان به مرحله ۸-۶ برگی رسیدند؛ در هر گلدان ۶ پایه از گیاهان که رشد همسان داشتند نگهداری شده و بقیه پایه‌ها حذف شدند. گیاهان با نانوذرات مس(n) و محلول مس(m) با غلظت های ۰، ۱، ۵ و ۱۰ ppm به مدت ۱۵ روز به روش محلول پاشی روی برگ و با ۳ تکرار از هر غلظت تیمار شدند. پس از پایان دوره تیماردهی گیاهان گروه‌های شاهد و تیمار بمنظور اندازه‌گیری‌ها نمونه برداری شدند. اندام هوایی و ریشه ۳ پایه برای اندازه‌گیری وزن خشک جدا شده و داخل آون در دمای ۸۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند، پس از خشک شدن وزن آنها برای تعیین وزن خشک اندام هوایی و ریشه ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردیدند. ۳ پایه دیگر بعد از توزین برای تعیین وزن تر اندام هوایی و ریشه ها برای انجام آزمایش‌های فیزیولوژیک در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

جوانه‌زنی: برای محاسبه درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، ضریب سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه گیاهچه I و شاخص بنیه گیاهچهII از فرمول‌های زیر استفاده شد:

درصد جوانه‌زنی = تعداد کل بذرهای کشت شده در هر پتری /تعداد کل بذر های جوانه زده بعد از روز دهم

ضریب سرعت جوانه‌زنی = $\frac{\sum ni}{\sum niTi} \times 100$

شاخص جوانه‌زنی = $\frac{\sum niTi}{N}$

ni =تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در روز Ti , N تعداد کل بذرهای کشت شده

n = تعداد بذر جوانه‌زده در روز D, D تعداد روزهای سپری شده از شروع جوانه‌زنی

سرعت جوانه‌زنی = $\frac{Dn}{\sum n}$

شاخص بنیهI = درصد جوانه‌زنی × طول کل(سانتی‌متر)

شاخص بنیهII =درصد جوانه‌زنی × وزن خشک(گرم)

اندازه‌گیری طول ریشه و ساقه: پس از برداشت نمونه های شاهد و تیمار، طول بلندترین ریشه از ناحیه یقه تا نوک ریشه و طول بلندترین ساقه از ناحیه یقه تا نوک مریستم انتهایی با استفاده از خطکش و بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید: برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید، ۰/۵ گرم از وزن تر برگ به همراه ۳۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد در هاون چینی ساییده شد. عصاره حاصل به مدت۱۰دقیقه در ۲۵۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس جذب فاز بالایی هر یک از نمونه‌های سانتریفوژ شده توسط اسپکتروفتومتر (WPA S2100, UK) UV/Vis در طول موج های ۶۶۲ نانومتر،

۶۴۵ نانومتر و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه کلروفیلa، کلروفیل b و کاروتنوئیدها از فرمول‌های زیر استفاده شد (۱۱)(A میزان جذب خوانده شده در هر طول موج توسط اسپکتروفتومتر می‌باشد).

$$Chla = 11.75\ A662 - 2.350\ A645$$

$$Chlb = 18.61\ A645 - 3.960\ A662$$

$$CX+C = 1000\ A470 - 2.270\ Chla - 81.4\ Chlb\ /22$$

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای سنجش آنتوسیانین ۰/۱ گرم از وزن تر برگ به همراه ۱۰میلی لیتر متانول اسیدی (شامل ۹۹ درصد متانول و ۱ درصد اسید کلریدریک) ساییده شد. سپس عصاره حاصل به مدت۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و فاز بالای آن به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی ($۳۳۰۰۰ m\ M^{-1}cm^{-1}$) استفاده شد(۲۵).

تعیین میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل برمبنای رنگ سنجی آلومینیوم و با استفاده از روش چانگ و همکاران(۲۰۰۲) تعیین گردید (۵). ۰/۱ گرم بافت تر برگ به همراه ۱ میلی لیتر آب دیونیزه در هاون ساییده شد. سپس به ۰/۵ میلی لیتر از نمونه ساییده شده، ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیترآب دیونیزه اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه آنکوبه گردید. پس از این مدت زمان جذب هریک از نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومترخوانده شد. برای تعیین میزان فلاونوئید کل، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم کاتچین برحسب میلی گرم برگرم وزن تر تهیه گردید .

تعیین میزان فنل کل: برای استخراج عصاره ۰/۵ گرم از بافت تر برگ به همراه۱۰ میلی لیتر متانول۸۰ درصد در هاون ساییده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد (۹). برای تعیین میزان فنل کل از روش مرینووا و همکاران (۲۰۰۵) استفاده گردید(۱۴). به ۱ میلی لیتر از عصاره استخراجی ۹ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. در ادامه ۱ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتئو نیز اضافه و مخلوط به هم زده شد. بعد از ۵ دقیقه ۱۰ میلی لیتر کربنات سدیم ۷ درصد اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه آنکوبه شد .بعد از مدت زمان یاد شده جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. میزان فنل کل، با استفاده از منحنی استاندارد-گالیک‌اسید بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

برنامه‌های رایانه‌ای مورد استفاده: داده‌های جمع‌آوری شده توسط برنامه نرم‌افزار آماری spss نسخه ۱۸مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه بین تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال $P<0.05$ انجام شد.

نتایج

جوانه‌زنی: نتایج حاصل از تأثیر نانوذرات مس و نمک مس بر درصد جوانه‌زنی، شاخص جوانه‌زنی، ضریب سرعت جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص کاهش در محلول مس نسبت به نانوذرات مس بیشتر بود. بیشترین ضریب سرعت جوانه‌زنی در تیمار نانوذرات مس در غلظت ppm ۵ مشاهده شد. با افزایش غلظت نانوذرات مس و کلریدمس سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت، بیشترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار نانوذرات مس با غلظت ppm ۱ بود. بررسی اثر نانوذرات مس و محلول کلرید مس بر شاخص بنیه I گیاه ریحان نشان داد که این شاخص کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. به‌طوری‌که بیشترین شاخص بنیه I در تیمار نانوذرات مس با غلظت ppm ۱ و کمترین مربوط به تیمار محلول کلریدمس در غلظت ppm۱۰ بود. بررسی اثر نانوذرات مس و محلول

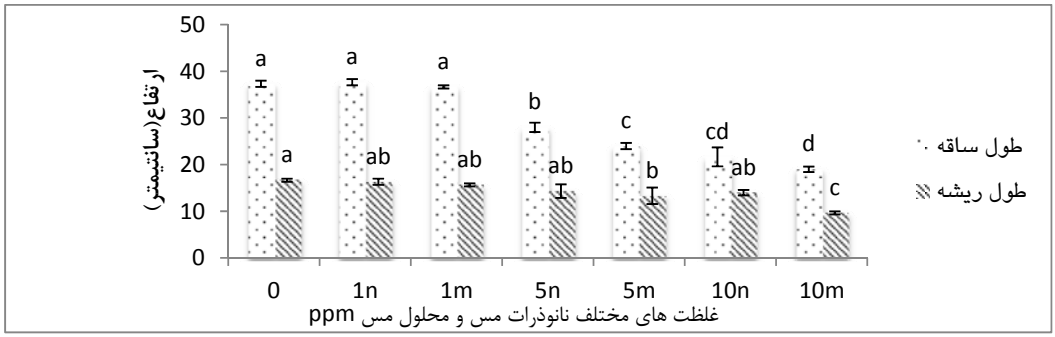
مس بر شاخص بنیه II گیاه ریحان نشان داد که این شاخص تحت تأثیر نانوذرات مس افزایش معنی داری نسبت به شاهد داشت. میانگین شاخص جوانه‌زنی در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. بنیهI و شاخص بنیهII در جدول ۱ آمده است. طبق این جدول با افزایش غلظت نانوذرات و محلول کلریدمس درصد جوانه‌زنی نسبت به شاهد کاهش یافت. بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار نانوذرات مس با غلظت ppm ۱ و کمترین مربوط به محلول مس با غلظت ppm۱۰ بود. بررسی تأثیر شاخص جوانه‌زنی حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نانوذرات و محلول مس شاخص جوانه زنی نسبت به شاهد کاهش می‌یابد.

جدول ۱- تغییرات شاخص‌های جوانه‌زنی گیاه ریحان در نمونه شاهد و تیمارهای نانوذرات مس (n) و محلول کلریدمس (m) در غلظت‌های ppm ۱۰، ۵، ۱، ۰

تیمار	درصد جوانه‌زنی	شاخص جوانه‌زنی	ضریب سرعت جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	شاخص بنیه I	شاخص بنیه II
شاهد	۸۸ a	۲۹ /۶۰a	۲۰/۶۳bc	۴۵ /۲۹ b	۵۰۷/۲۰a	۰/۳۸ d
1n	۸۵ a	۲۹/۴۶ a	۲۱/۳۵a	۵۱ /۰۱ a	۴۵۴/۵۳ b	۰/۷۳ a
1m	۷۳b	۲۵/۱۶ b	۲۱ /۰۶ab	۴۱/۳۰c	۳۲۲/۹۳c	۰/۴۸bc
5n	۶۶c	۲۳/۵۶b	۲۱/۳۸ a	۳۹ /۴۶ c	۱۷۱/۰۶ d	۰/۵۳b
5m	۶۴c	۲۱ /۲۸c	۲۰ /۴۰cd	۳۲/۹۳d	۱۳۱/۴۰e	۰/۴۷ bcd
10n	۵d	۱۷/۵۰ d	۱۹ /۸۸ de	۲۴/۱۴ e	۴۰/۶۶ f	۰/۴۱cd
10m	۵۰ d	۱۵ /۸۱d	۱۹ /۳۸e	۲۰/۶۰f	۲۳/۶۰ f	۰/۳۷ d

حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد. - نتایج میانگین سه تکرار و SE ± می‌باشند ($P<0.05$).

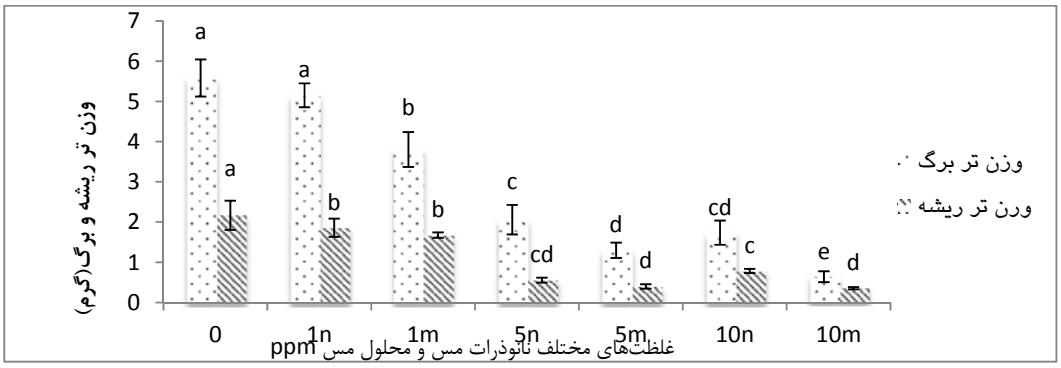
رشد گیاهچه: اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات مس و محلول مس بر طول ریشه و برگ ریحان در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق این‌شکل ، با افزایش غلظت نانوذرات مس و محلول کلرید مس طول ریشه و اندام هوایی بطور معنی‌داری کاهش‌می‌یابد. در غلظت‌های ppm ۱ نانوذرات مس و محلول کلریدمس تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر نانوذرات مس و محلول کلریدمس در سطح ۵ درصد معنی‌دار است. اثر سمیت محلول کلرید مس بر روی طول ریشه و ساقه نسبت به اثر سمیت نانوذرات مس بیشتر بود.



شکل ۱- تغییرات طول ساقه و ریشه گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و کلرید مس (m) (۰، ۱، ۵، ۱۰ppm)

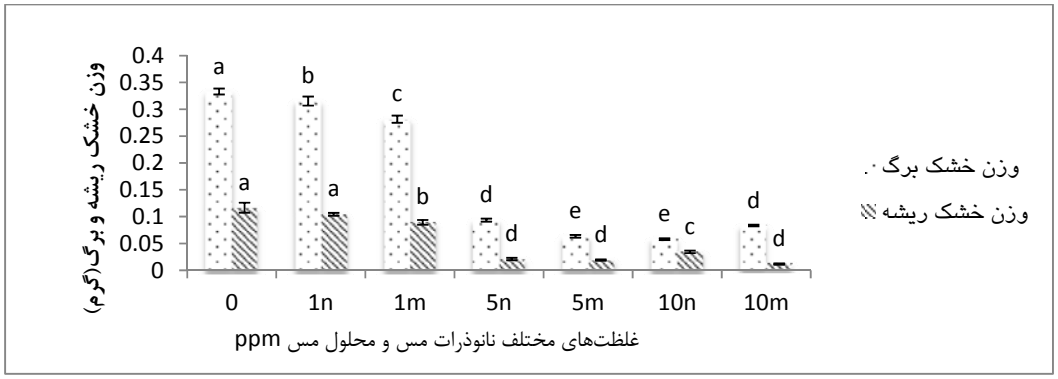
حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

مطابق شکل۲ افزایش غلظت نانوذرات مس و محلول کلریدمس موجب کاهش معنی‌دار وزن تر ریشه و برگ گردید. اثر نانوذرات مس در غلظت ppm ۱ سمیت کمتری بر وزن تر ریشه و برگ نشان داد و بیشترین سمیت در غلظت ppm ۱۰ مشاهده شد؛ اثر سمیت نانوذرات مس نسبت به محلول کلریدمس کمتر بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر نانوذرات مس و محلول کلریدمس در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشت. بر اساس نتایج واریانس، تأثیر نانوذرات مس بر وزن خشک ریشه و برگ ریحان در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. وزن خشک ریشه و برگ ریحان تمام تیمارها نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار نشان دادند. با افزایش غلظت نانوذرات مس و محلول کلریدمس وزن خشک برگ کاهش یافت. نانوذرات مس و محلول کلریدمس در غلظت‌های ۱۰ppm موجب کاهش معنی‌دار در وزن خشک برگ گردید. غلظت ppm ۱ نانوذرات مس در مقایسه با شاهد تأثیر معنی‌داری بر میزان وزن خشک ریشه نداشت. بررسی اثر نانوذرات مس و محلول کلریدمس بر وزن خشک ریشه حاکی از آن بود که بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به نانوذرات مس در غلظت ppm ۱ و کمترین مربوط به محلول کلریدمس در غلظت ۱۰ppm مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲- تغییرات وزن تر برگ و ریشه گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و کلریدمس (m) (۱۰ppm، ۵، ۱، ۰)

حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

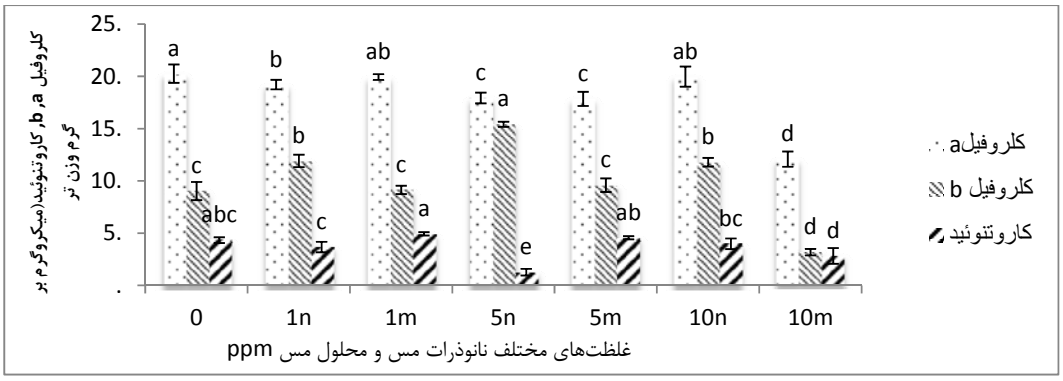


شکل ۳- تغییرات وزن خشک برگ و ریشه گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و کلریدمس (m) (۱۰ppm، ۵، ۱، ۰)

حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

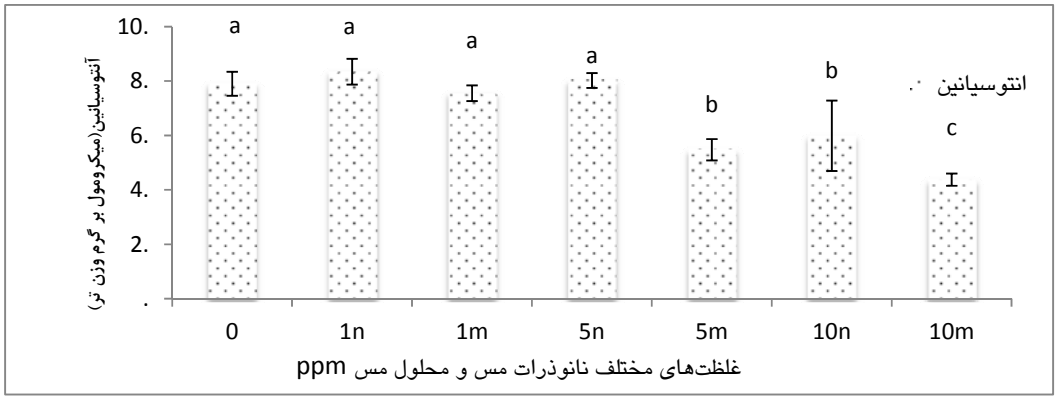
نتایج حاصل از بررسی میزان کلروفیل a ، b و کاروتنوئید در برگ گیاهان شاهد و تحت تیمار نانوذرات مس و کلریدمس در نمودار ۴ نشان داده شده است. طبق این نتایج کمترین میزان کلروفیل a در برگ تحت تأثیر نانوذرات مس

در غلظت ppm ۵ مشاهده شد، با افزایش غلظت های محلول کلرید مس میزان کلروفیل a در کلیه گیاهان تحت تیمار کاهش یافت. تحت تأثیر نانوذرات مس میزان کلروفیل b نسبت به شاهد افزایش یافت و کمترین میزان کلروفیل b تحت تأثیر محلول مس در ppm ۱۰ مشاهده شد. بیشترین میزان کاروتنوئید تحت تأثیر نانوذرات مس در غلظت ppm ۱۰ مشاهده شد، با افزایش غلظت محلول کلرید مس میزان کاروتنوئید افزایش یافت. میانگین میزان کلروفیل و کاروتنوئید برگ در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار با گیاهان شاهد بود.



شکل ۴- تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها) در گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و کلرید مس (m) (۱۰ppm ، ۵ ، ۱ ، ۰) - حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

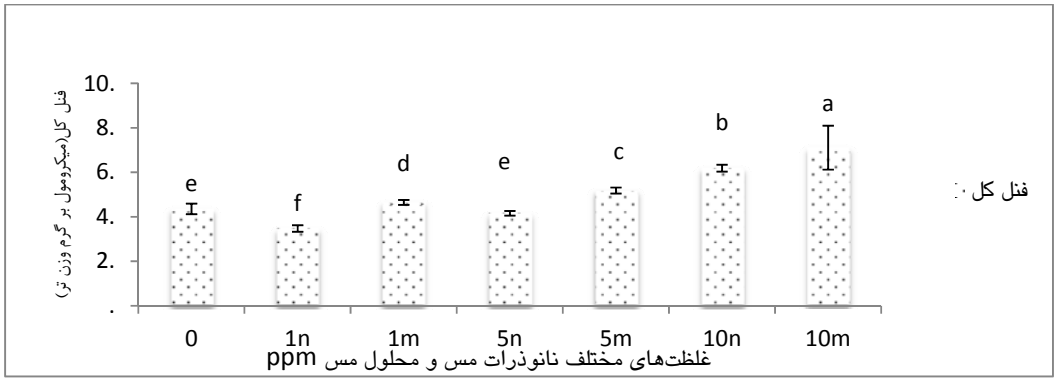
نتیجه تجزیه واریانس نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات مس و محلول کلریدمس میزان آنتوسیانین کاهش یافت. میزان آنتوسیانین در گیاهان تحت تأثیر نانوذرات مس بیشتر از کلریدمس بود. در غلظت‌های ppm ۵ و ۱ نانوذرات مس و ppm ۱ محلول مس تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد. البته میانگین میزان آنتوسیانین برگ در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود (نمودار ۵).



شکل ۵- تغییرات آنتوسیانین گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و محلول مس (m)(۱۰ppm ، ۵ ، ۱ ، ۰)

حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

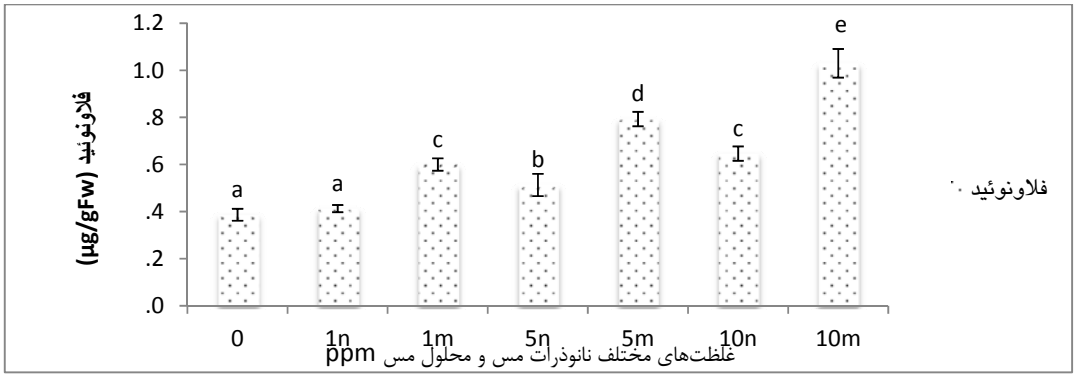
بر اساس آنالیز نتایج واریانس، اختلاف تأثیر نانوذرات مس و کلرید مس بر میزان فنل برگ ریحان در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. میانگین مقدار فنل کل در اندام هوایی گیاهان تحت تیمار نانوذرات مس و کلرید مس با افزایش غلظت، افزایش یافت. میزان افزایش فنل در گیاهان تحت تیمار کلریدمس نسبت به نانوذرات مس بیشتر بود. کمترین میزان فنل در تیمار ppm ۱و بیشترین در تیمار ppm ۱۰مشاهده شد (شکل ۶).



شکل۶- تغییرات فنل کل گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و کلرید مس ((m) (۱۰ppm ، ۵ ، ۱ ، ۰)

حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

نتایج حاصل از بررسی میزان فلاونوئید در–اندام هوایی گیاهان شاهد و تحت تیمار نانوذرات مس و محلول کلریدمس در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشانگر آن است با تیمار نانوذرات مس و محلول کلریدمس میزان فلاونوئید در گیاه افزایش می‌یابد. بیشترین افزایش در تیمار ppm ۱۰محلول کلریدمس و کمترین در تیمار ppm ۱نانوذرات مس مشاهده شد. البته میانگین میزان فلاونوئید- اندام هوایی در نمونه‌های شاهد و تحت تیمار در سطح آماری ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود.



شکل ۷- تغییرات فلاونوئید کل گیاه ریحان تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات مس (n) و محلول کلرید مس (m)(۱۰ppm ، ۵ ، ۱ ، ۰)

حروف یکسان طبق آزمون دانکن فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$).

بحث

مس ازجمله عناصری است که برای رشد و نمو طبیعی گیاهان ضروریست، با این حال غلظت بالای آن در خاک می‌تواند باعث ایجاد علائم سمیت و بازدارندگی رشد در گیاه گردد (۱۳). با افزایش نانوذرات مس و محلول کلریدمس درصدجوانه‌زنی، طول ریشه و اندام هوایی، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه کاهش نشان داد. تحقیقات مختلف اثرات مثبت و منفی نانوذرات را در گیاهان عالی نشان داده است. مطالعه Yang و همکاران (۲۰۰۶) بر گیاه اسفناج نشان داده است که رشداین گیاه تحت تأثیر نانوذرات Tio_2 افزایش می‌یابد(۲۶). مطالعه Lee و همکاران (۲۰۰۸) تأثیر نانوذرات مس بر جوانه گندم و ماش نشان داده است که در پاسخ به این نانو ذره جوانه ماش حساسیت بیشتری نسبت به گندم داشته و کاهش رشد بیشتری را نشان می‌دهد (۲۴). با افزایش فلزات سنگین در وضعیت رشد گیاهان، مقدار آبسزیک

اسید(ABA) در بذر گیاهان افزایش می‌یابد و این می‌تواند دلیلی برای کاهش جوانه‌زنی در حضور فلزات باشد (۱۵).

رشد گیاهانی مانند خیار، کاهو، لوبیا، ذرت، چاودار و کدو سبز با توجه به غلظت نانوذرات نقره، مس، اکسید مس، دی اکسید تیتانیوم، روی و اکسید روی دچار اختلال می‌شود (۲۷). تحقیقات نشان داده است که نانوذرات نقره رشد دانه های *Lactuca* را تحت تأثیر قرار می‌دهد، این اثر با اندازه‌گیری طول ریشه و ساقه این گیاه پس از ۱۵ روز انکوباسیون مورد آزمایش قرار گرفته است و نتایج نشان داده است که گیاهان تحت تیمار نانوذرات در مقایسه با گیاهان شاهد دارای نسبت ساقه به ریشه بیشتری هستند (۲۴). مسمومیت ناشی از ازدیاد مس در محیط باعث زردی و کاهش رشد گیاه می‌گردد. البته زردی به کمبود آهن ناشی از غلظت بالای مس در بافت نسبت داده می‌شود (۶). کاهش رشد گیاه را تحت تیمار مس بر دیواره سلولی و تیغه میانی نیز نسبت می‌دهند. با اتصال مس به پکتین دیواره سلولی، قابلیت ارتجاعی آن کاهش می‌یابد (۳). کاهش رشد-در شرایط تنش مس را می‌توان به افزایش اتیلن و کاهش سیتوکنین، پلی آمین (۲۰) و بازدارندگی گسترش رشد سلول ناشی از اثرات مستقیم و یا غیر مستقیم مس بر متابولیسم یا ساختمان اکسین نسبت داد (۶). در غلظت‌های بالای مس کاهش رشد ریشه نسبت ساقه بیشتر است، این دلالت می‌کند که رشد ریشه به استرس مس حساس تر از رشد اندام هوایی است. سمیت مس معمولاً رشد ریشه را بیشتر از اندام هوایی متأثر می‌سازد، زیرا بخش اعظم مس در ریشه‌ها انباشته می‌شود. ۹۰ درصد کل مس در ریشه‌ها در ساختار دیواره سلولی یا در فضای بین غشاء و دیواره سلولی متمرکز شده ایجاد سمیت می‌کند، بدون آنکه با مواد آلی تشکیل کمپلکس پیچیده دهد و یا به اندام هوایی منتقل گردد (۱۲). طویل شدن سلول ها و اندامک ها از مهمترین اعمال اکسین در گیاه است. بنابراین مس با تأثیر بر تنظیم و تعدیل اکسین بر ارتفاع ساقه مؤثر است (۱۸). مس با تأثیر بر متابولیسم نیتروژن و در نتیجه با تولید اسید آمینه تریپتوفان و تولید اکسین باعث افزایش ارتفاع گیاه می‌شود. محلول پاشی عناصر مس و روی در گیاه نیشکر در کمترین میزان باعث افزایش وزن، تعداد میانگره، طول میانگره و در نتیجه افزایش طول ساقه و افزایش ارتفاع متوسط گیاه شده است. همچنین استفاده از منگنز و بر در بالاترین میزان باعث افزایش این خصوصیات می گردد (۱۲). در این پژوهش مشخص گردید در غلظت ppm ۱۰ نانوذرات مس میزان کلروفیل a افزایش می یابد و محلول کلرید مس در غلظت ۱۰ppm میزان کلروفیل a وb و کارتنوئید را کاهش می‌دهد. قربانلی و همکاران (۱۳۸۶) کاهش محتوای کلروفیل‌هایa وb را در گیاه کلزا در پاسخ به تیمارهای کلریدمس (۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰ میکرومولار) گزارش کردند(۲). کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار مس، به خصوص در غلظت‌های بالای این فلز می‌تواند نشان دهنده شدت آسیب‌های اکسیداتیو باشد. این کاهش می‌تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف سنتز کلروفیل و رنگیزه‌های دیگر باشد. فلزات سنگین با بازدارندگی بیوسنتز پروتئین‌های کمپلکس LHCII در سطح رونویسی روند تشکیل این کمپلکس را مختل می‌سازند (۲۳). در مطالعه زنگ و همکاران (۲۷) افزایش جوانه‌زنی، وزن خشک گیاه، تشکیل کلروفیل، فعالیت آنزیم روبیسکو و سرعت فتوسنتز در اسفناج در اثر تیمار با نانوذرات Tio_2 مشاهده شده است. فلزات سنگین با القای بسته شدن روزنه‌ها، آسیب به ساختمان کلروپلاست، کاهش غلظت رنگیزه‌ها، اختلالات آنزیمی و عدم تعادل در روابط آبی، آسیب شدیدی به دستگاه فتوسنتزی گیاهان وارد می‌کنند (۲۰).

در این تحقیق مشخص شد که با افزایش غلظت نانوذرات مس و محلول کلریدمس میزان فلاوونوئید و فنل کل افزایش یافت. میزان سمیت نانوذرات مطابق با گزارش‌های قبلی وابسته به گونه گیاهی می‌باشد. یکی از راهبردهای پیشنهادی برای اینکه نانوذرات چگونه موجب آسیب زدن

به گیاه می‌شوند، بی‌نظمی در مسیر انتقال آب و مواد معدنی است(۴). پیدا کردن اثرات مثبت و منفی نانوذرات در گیاهان عالی عجیب نیست. با توجه به اینکه صنعت فناوری نانو در حال رشد بسیار سریع است، بنابراین یک ضرورت حیاتی برای انجام مطالعات بیشتر در مورد این موضوع به منظور ایجاد مقررات درستی نانومواد برای استفاده و دفع آنها وجود دارد.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه نشان داد که گیاه ریحان تحت تأثیر نانوذرات مس و محلول کلرید مس حساس است و میزان حساسیت به محلول کلریدمس بیشتر از نانوذرات مس است. این گیاه از لحاظ مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تغییرات وسیعی را تحت تأثیر محلول کلریدمس متحمل می‌شود، تغییرات ایجاد شده مانند کاهش طول، وزن خشک و وزن تر ریشه و برگ و همچنین کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله اثرات مخرب آن می‌باشد. غلظت مس در سلول نیازمند این است که در سطح پایین تری نگه داشته شود، زیرا این عنصر با توجه به مشخصه های اکسایشی-احیایی‌اش بشدت سمی است.

منابع

۱- زرگری ع .۱۳۶۹. گیاهان دارویی، (موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران) جلد سوم.

۲- قربانلی م. میقانی ف. و اسدالهی ب .۱۳۸۵. اثر کلرید مس برغلظت کلرفیل، انباشتگی کربوهیدرات و برخی از شاخص‌های رشد در دو رقم کلزا پژوهش و سازندگی۷۶ ۱۴۱، - ۱۳۴

3-Aidid, S. B. and Okamoto H. 1993. Responses of elongation rate, turgor pressure and cell wall extensibility of stem cells of *Impatiens balsmina* to Lead, Copper and Zinc. Biometals. 6: 245-249.

4-Asli, S. and Neumann, P.M. 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport**.** Plant Cell Environment. 32:577–584.

5-Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents Biochemical Society Transactions.11: 591-592.

6-Coombes, A. J., Lep, N. W. and Phipps, D. A.1976 . Effect of copper on IAA oxidase activity in root tissue of barly (*Hordeum vulgare* L. zephyr). Plant Physiology. 55: 236-242.

7-Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L., Duffin, A., Newby, R., Mills, D. E., MacNee, N. and Ston, V**.** 2005. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. Particle and Fibre Toxicology, 2:10

8-Jing, Xiong., Wang, Ye., Qunji, Xue and Xuedong Wu*. 2011. Synthesis of highly dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid.13: 900-904 .

9- Horii, A., Mccup, P. and Shetty k. 2007.Enhance of Seed Vigour Following Insecticide and Phenolic Elicitor Treatment. Bioresour Technology. 98: 623- 632.

10-Kabata-Pendia, A. and Pendias, H. 1992. Trace elements in soil and plants.CR Press, BocaRaton

11- Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R. 1985. Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents Biochemica Society Transactions.11: 91- 592.

12- Marschner, H. 1985. Mineral nutrition of higher plants. 2nd. Ed., Academic Press. New York, NY.

13-Marschner, H. 1995. Mineral nutritionof higer plants. 2 nd edition, Academ Zn2+absorption and translocation to shoot in Zn hyperaccmulator and nonaccumulator species of Thlaspi. Journal of Plant Physiology. 112: 1715-1722 .

14-Marinova, D., Ribarova, F. and Atanassova, M. 2005. Total phenolics and Total Flavonoids in Bulgaria Fruits and Vegetables. The University of Chemical Technology and Metallurgy.40: 255-260.

15-Mumzurglu, O., Zengin, F.k and Yahgyagil, Y.2008.The abscisic acid levels of wheat (Triticum aestivum L.cv. Cakmak79).GU journalof science . 21:1-7.

16 - Loneragan, J.F**.** 1975. The availability and absorption of trace elements in soil- plant system and their relation to movement and concentration of trace elements in plants-in trace in soil-plant-animal system, NicholasD.J.D. and Egan, A.R, EDS. Academic press, New York, 109.

17-Pandey, A.C., Aanjay, S.S and Yada, V. R. S. 2010.Application of zno nanoparticles in fluencing the growth rate of Cicer arietinum L. Journal of Eepermenthal Nanoscience . 5: 488-497.

18- Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. K., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S.,Rascon, E., Parsons, J. G. 2000. Study of the effect of heavy metals on seed In:germination and plant growth on alfalfa plant(*Medicago sativa*) grown in solid media. Proceeding of the conference on hazardous waste research.

19-Peyvandi, M., Parande, H. and Mirza, M. 2011. Comparison of nano Fe chelate with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of Ocimum basilicum. New Cell Mol Biotech. 4:89-99

20-Prasad, M. N. V. 1995. The inhibition of maize Leaf chorophylls, carotenoids and gas exchange functions by cadmium. Photosynthetica.31: 635-640.

21-Prasad,T.N.V.K.V., Sudhakar., P., Sreenivasulu, Y.,Latha,P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K ., Sreeprasad, T.S., Sajanlal, P.R. and pradeep, T. 2012. Effect of nanoscales zinc oxide on the germination, growth and yield of peanut. Journal of plant nutrition. 35:905-927.

22-Shah, V., and Belozerova, I. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds**.** Water Air and Soil Pollution, 97,143-148.

23-Tzvetkova N. and Kolarov, D. 1996. Effect of air pollutionon carbohydrate and nutrients concentrations in some deciduous tree species, Bulg. Journal of Plant Physiology 22(1-2), 53.

24- W.-M., Lee Y.-J. An , H. Yoon , H.-S. 2008.Kweon,Toxicity and bioavailability of copper nanoparticlesto terrestrial plants Phaseolus radiatus (Mung bean)and Triticum aestivum (Wheat); plant agar test for water-insoluble nanoparticles, Environ.Toxicology and chemistry. 27 : 1915–1921

25-Wagner, G.J. 1979 . Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Journal of Plant Physiology. 64: 88-93.

26-Yang, F., Hong, F.S., You, W.J., Liu, c., Gao, F.Q., Wu, C . and Yang, P. 2006. Influences of nanoanatase Tio_2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. Biological Trace Element Research. 110: 179-190.

27-Zhang, ZY., Zhang,He X., HF., Zhang P., Ding, YY., and Zhao, YL. 2011. Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. Metallomics 3:816–822.

28-Zheng, L., Hong, F., Lu, S. and Liu, C. 2005. Effect of nano-TiO2 onstrength of naturally aged seeds and growth of spinach, *Biological Trace* Element Research, vol. 104(1): 83–91**.**

29-Zhu, H. J. Han, Q. and Jin Y. 2008. Uptake, translocation, accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. Journal Environmental monitoring.10: 713-717.

30- https://en.wikipedia.org

The Effect of copper Nanoparticles and Copper chloride solution On Germination And solution some morphological and physiological factors *Ocimum basilicum* L.

Yusefzaei F.[1], Poorakbar L.[1], farhadi Kh.[2] and Molaei R.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[2] Chemistry Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Copper is an essential micronutrient for plant, so that its shortage will affect plant metabolism. High levels of Cu can cause phytotoxicity through the generation of reactive oxygen species. This study aimed to investigate the effect of different concentrations of nanoparticles and chloride solution, 0,1,5,10 ppm on growth and morphology of basil. The findings indicated that reduction of germination percentage, germination speed and germination index in the presence of copper chloride solution was more than that of copper nanoparticles. The measurement of length, wet and dry weight of root and aerial organ showed the negative effect of increased concentrations of copper nanoparticles and copper chloride solution on these parameters. Chlorophyll a level in all plants under treatment was reduced with an increase in copper chloride concentrations. Also, increased concentration of copper chloride solution significantly increased flavonoid and total phenol in comparison with copper nanoparticles. Anthocyanin level in the plants under the influence of copper nanoparticles was reported to be higher than that of copper chloride. The results of this study revealed that copper nanoparticles exerted less toxicity effect on the basil plant growth than copper chloride solution.

Key words: *Ocimum basilicum* L., copper nanoparticles , phenol, flavonoid, chlorophyll