

## ارزیابی فعالیت‌های فتوسنتزی، میزان کربوهیدرات‌ها، پرولین و اسانس ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت ایسیتور نانوبتاسیکلودکسترین

آزاده لونی<sup>۱</sup>، سارا سعادت‌مند<sup>۲\*</sup>، حسین لاری یزدی<sup>۳</sup> و علیرضا ایرانبخش<sup>۲</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۵/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۲

### چکیده

القای نانوذرات مهندسی شده به گیاهان دارویی باعث ایجاد مقاومت، بالا بردن عملکرد کمی و کیفی و مواد موثره در آنها می‌شود. در این پژوهش نانوذرات  $\beta$ -سیکلودکسترین ( $\beta$ -CDNPs) سنتز شدند. مشخصات نانوذرات با طیف UV-VIS، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پراکندگی نور دینامیکی (DLS) تعیین شد. سپس غلظت‌های مختلف  $\beta$ -CDNPs شامل صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر را برای محلول پاشی قسمت‌های هوایی ریحان *Ocimum basilicum* رقم کشکنی لوءلوه به کار برده شد. آنالیز اسانس با استفاده از GC-MS انجام گرفت. مقدار رنگیزه‌های کلروفیلی و اسانس ریحان در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری ( $P \leq 5\%$ ) داشت. یافته‌ها حاکی از کاهش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) مقدار فلورسانس کمینه ( $F_0$ ) در تیمار ۵۰ ppm نسبت به کنترل و دو سطح ۱۰ و ۱۰۰ از نانوبتاسیکلودکسترین بود. ماکزیمم مقدار کلروفیل b در تیمار ۱۰۰ ppm مشاهده شد. سطح ۵۰ ppm باعث افزایش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) فلورسانس بیشینه، فلورسانس متغیر ( $F_v$ )، کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II نسبت به شاهد شد. محلول پاشی  $\beta$ -CDNPs موجب تغییراتی در تبادلات گازی ریحان شد. قندهای محلول و پرولین برگ و ریشه ریحان در تیمار ۵۰ ppm افزایش معنی‌داری ( $P \leq 5\%$ ) نسبت به شاهد داشت. به طوری که قند نامحلول در برگ و ریشه روند معکوس را نشان داد. غلظت فنیل پروپانویدها و ترپنوئیدهای ریحان در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری ( $P \leq 5\%$ ) داشت. القای نانوذرات  $\beta$ -CDNPs در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه موجب بهره‌وری از گیاه می‌شود. گیاه ریحان تحت تیمارهای نانوبتاسیکلودکسترین با رفتاری وابسته به غلظت موجب افزایش عملکرد در واحد سطح شد. بنابراین، محلول پاشی در غلظت مناسب می‌تواند به عنوان یک القا کننده ضمن تحریک، موجب حفظ و نگهداری مواد موثره در ریحان شود و محتوای اسانس را برای غذا و دارو افزایش دهد.

**واژگان کلیدی:** بتاسیکلودکسترین، فلورسانس، کارایی فتوسنتزی، کربوهیدرات، نانوذرات.

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- گروه زیست شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

## مقدمه

موثره و رنگدانه‌های گیاه به‌عنوان مولکول‌های مهمان جایگزین آب درون ساختار مولکولی بتاسیکلودکسترین می‌شوند و  $\beta$ -CD موجب پایداری مولکول‌های کمپلکس شده و افزایش ترکیبات فعال زیستی می‌شود. نیروی محرک لازم جهت ایجاد کمپلکس، توسط جایگزینی مولکول‌های آب با آنتالپی بالا به‌وسیله مولکول‌های مهمان مثل رنگیزه‌های گیاهی می‌شود (Almagro and Pedreño, 2020). بتاسیکلودکسترین به شکل نانو موجب پوشاندن پیگمنت‌های گیاهی تحت شرایط نامساعد، ضمن جلوگیری از تخریب، به آنها ثبات می‌بخشد و موجب بهبود حلالیت و پتانسیل شناسایی مولکول‌ها می‌شود. این ویژگی، آنها را برای کاربرد در کشاورزی و گیاهان دارویی مناسب می‌سازد. علم نانومطالعه ذرات در مقیاس یک تا صد نانومتر در یک یا چند بعد هندسی است (Mahmoudi *et al.*, 2011). نانوذرات ضمن سبک و کوچک‌تر بودن خصوصیات‌شان، تفاوت چشم‌گیر و کارآمدتری را نسبت به‌غیرنانویی خود دارند. سیکلودکسترین از کلروفیل‌ها حفاظت می‌کند (Cellamare *et al.*, 2013). آنها قادر به حمل رنگدانه‌ها به شکل مونومری هستند. حضورشان موجب افزایش کلروفیل شد (Dentuto *et al.*, 2007). فلورسانس کلروفیل جو، تحت تاثیر با سیکلودکسترین باعث افزایش معنی‌دار  $F_V/F_M$  و  $F_V/F_O$  نسبت به کنترل شد که با افزایش تکامل اکسیژن در فتوسیستم II همبستگی مثبت نشان داد (Sridharan *et al.*, 2002). هدایت روزنه‌ای و توانایی جذب دی‌اکسیدکربن می‌تواند به‌عنوان شاخصی از وضعیت فتوسنتزی برگ گیاه در نظر گرفته شود (Seyed *et al.*, 2022). فتوسنتز در متابولیسم گیاهان عالی نقش بسیار تعیین

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از تیره‌ی نعنائیان (Lamiaceae) است. این گیاه علاوه بر استفاده غذایی، به‌دلیل 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 Mérillon, 2008). ریحان گیاهی یک‌ساله و علفی است که تنوع زیادی در سطح مورفولوژی و ترکیبات ثانویه و مخصوصاً اسانس دارد. این گیاه در پزشکی سنتی کاربرد فراوان دارد. روغن‌های ضروری آن خاصیت ضد میکروبی بسیار زیادی دارد (Hanif *et al.*, 2011; Kashyap *et al.*, 2011; Shafique *et al.*, 2011). گیاه ریحان جزو پرمصرف‌ترین سبزیجات بوده و خیلی سریع دچار بیماری‌های گیاهی شده و در نتیجه رشد کاهش یافته و رنگ‌پریدگی، رشد نامتقارن و پژمردگی شاخ و برگ در آن مشاهده می‌شود. بتاسیکلودکسترین قادر به افزایش ترکیبات مختلف برای محافظت از گیاهان در برابر عوامل خارجی هستند (Fenyvesi *et al.*, 2016; Jansook *et al.*, 2018). بتاسیکلودکسترین‌ها، الیگوساکاریدهای حلقوی شامل واحدهای گلوکز با پیوندهای ۴-۱ آلفا گلیکوپیرانوزی هستند.  $\beta$ -CD دارای هفت واحد گلوکز با ساختار مخروطی، که گروه‌های OH آن در سطح بیرون و اتم‌های کربن یا واحدهای گلوکزی در سمت داخل مخروط واقع شده است (Gentili, 2020). مهم‌ترین خصوصیت آنها تشکیل کمپلکس میزبان-مهمان (Host-Guest) است (Gonzalez Pereira *et al.*, 2021). بتاسیکلودکسترین به‌عنوان مولکول میزبان عمل می‌کند و مکانیسم آن به این صورت است که مواد

اندازه نانو سطح بیشتری را ایجاد کرده و به راحتی حلالیت و دسترسی زیستی اسانس را افزایش داده و آزادسازی کنترل شده اسانس را بهبود می‌بخشد (Donsi *et al.*, 2011).

بر اساس مطالعاتی که انجام شد، سابقه‌ای از محلول‌پاشی نانوذرات بتاسیکلودکستین بر روی ریحان و هیچ گیاه دیگری گزارش نشده بود. با توجه به گرایش جهانی تولید و تکثیر گیاهان دارویی در سیستم‌های کشاورزی پایدار، انجام پژوهش‌هایی مبتنی بر الیگوساکارید طبیعی  $\beta$ -CD به شکل نانو و اثر آن بر گیاهان با هدف بهبود تولید ترکیبات موثره و افزایش عملکرد کیفی، ضروری است. به همین منظور، در راستای این اهداف، تحقیق حاضر بر روی فعالیت‌های فتوسنتزی، شاخص فلورسانس و محتوای کلروفیل و کربوهیدرات‌ها و پرولین در برگ و ریشه و مقدار اسانس در رقم کشکنی‌لو<sup>لو</sup> گیاه ریحان انجام شده است.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۸ به صورت کشت گلدانی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی خرم‌آباد، لرستان در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار تیمار اجرا شد. گیاه مورد استفاده *Ocimum basillicum* L. رقم کشکنی‌لو<sup>لو</sup> از مرکز تحقیقات کشاورزی ارومیه تهیه گردید. بعد از ضد عفونی کردن بذرها با هیپوکلریت سدیم ۰.۵٪ به مدت ۲۴ ساعت قبل از کاشت در گلدان‌ها جهت مرحله پیش تیمار، در داخل غلظت‌های مورد مطالعه قرار گرفت. سپس، ۱۵ بذر در عمق یک سانتی‌متری خاک گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر، کاشته شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها قبل از اجرای آزمایش

کننده‌ای دارد. بنابراین، سرعت فتوسنتز عامل اصلی تعیین‌کننده تولید ماده خشک و توان تولید گیاهان زراعی می‌شود (Taiz and Zeiger, 2002). تغییرات کربوهیدرات‌ها به دلیل ارتباط مستقیم با فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر فتوسنتز، انتقال و تنفس اهمیت خاصی دارند. با استفاده از تکنیک فلورسانس کلروفیل می‌توان عدم توازن بین فرآیند متابولیسم و تولید را ملاحظه نمود (Malakouti *et al.*, 2005). همچنین، محتوای کلروفیل یکی از مهم‌ترین فاکتورها برای تعیین ظرفیت فتوسنتزی است و تغییرات مثبت آن موجب افزایش زیادی در کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی در طول زندگی گیاه می‌شود. اهمیت این تحقیق علاوه بر اینکه نخستین گزارش در ارتباط با اثرات این الیسیتور بر روی فعالیت‌های فتوسنتزی و مورفولوژیکی و میزان اسانس ریحان می‌باشد، همچنین در نوع نانوذره به کار برده شده است، که موجب افزایش عملکرد و تولید مواد موثره دارویی این گیاه می‌شود.

اسانس گیاهان دارویی دارای اجزای ناپایداری هستند که می‌توانند در اثر برخی شرایط فیزیوشیمیایی مانند (اکسیدشدن عامل‌الکل‌ها و آلدئیدها)، نور (انتقال دادن مونوترپن‌ها، هیدروکربن‌ها و سزکوئی‌ترین‌های غیراشباع)، آب (هیدرولیز استرها و اترها) و pH خارج شوند.  $\beta$ -CD ضمن تحریک و افزایش ترکیبات فعال زیستی به عنوان یک استراتژی محافظت از اسانس در مقابل عوامل محیطی مانند اکسیژن، نور، رطوبت و اسیدیته به کار برده می‌شود (Ramirez- Estrada *et al.*, 2016). همچنین، نرخ تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Garcia-Perez *et al.*, 2019). حامل‌هایی به

بررسی و در جدول (۱) آمده است. بعد از سبز شدن گیاه و قبل از اعمال تیمار مرحله دوم، عمل تنک کردن گلدها انجام شد و برای هر تیمار در هر گلدها ۴ گیاه گذاشته شد و سایر گیاهان حذف شد. بر اساس مطالعاتی که انجام شد هیچ دانشی در مورد غلظت‌های اثرگذار وجود نداشت. بنابراین، به منظور تعیین سطوح مختلف از الیستور مورد استفاده در این تحقیق، مقادیر زیادی بین صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از غلظت‌های متفاوت نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر روی گیاه ریحان آزمایش شد. از بین آنها سه غلظت ۱۰ و ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (ppm) که اثرگذاری بیشتری را نشان دادند انتخاب گردید و در نهایت در راستای اهداف پژوهش حاضر یک سطح به عنوان غلظت بهینه ارایه گردید. هر سه سطح و غلظت صفر (آب مقطر) به عنوان تیمار کنترل در سه مرحله‌ی پیش تیمار، دو برگی و مرحله ۸ تا ۱۰ برگی (مدت زمان رشد تا این مرحله ۸ هفته بود) به صورت اسپری کردن روی بخش هوایی و برگ‌های ریحان در گلدها انتقال داده شده به گلخانه‌ی کنترل شده با شرایط محیطی یکسان و دمای روز و شب به ترتیب در محدوده  $25 \pm 2$  و  $20 \pm 2$  درجه سلسیوس و رطوبت شب در محدوده ۵۰ تا ۶۰ درصد و روشنایی نور طبیعی خورشید صورت گرفت. ۲۴ الی ۷۲ ساعت بعد از اعمال آخرین تیمار نمونه‌ها جمع‌آوری گردید.

ساعت قرار داده شد. برای جلوگیری از ایجاد رسوب و پایداری و تشکیل محلول همگنی از نانوذرات، از دستگاه اولتراسونیک مدل (100 w, 40KHz ساخت شرکت Heilsche آلمان) استفاده شد و محلول در آن به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. تشکیل نانوذرات بتاسیکلودکسترین با طیف UV-VIS مدل (UV-160 A ساخت شرکت Shimadzu) در محدوده ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نانوذرات سنتز شده در دو ناحیه ۲۰۰ و بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر ماکزیمم جذب نوری داشت و پیک جذبی در طول موج ۲۸۱ نانومتر برای نانوسیکلودکسترین رخ داد (شکل ۱.ا). جهت تعیین خصوصیات نانوذرات، مقدار یک میلی‌لیتر از آن بر روی جایگاه (Cell) دستگاه تعیین اندازه ذرات (VASCOPARTICLE SIZE Company) ساخت فرانسه قرار داده شد. بر اساس پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، اندازه ذرات در طول موج ۶۵۷ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به دست آمد. به طوری که میانگین قطر ذرات  $567/1$  Dmen number و شاخص پراکندگی ذرات  $PDI: 0/325$  محاسبه شد (شکل ۱.ب). اندازه نانوذرات نیز با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مدل (hilips EM 208S 100KV) ساخت کشور هلند و وضوح  $0/2$  nm، ۸۰ نانومتر تعیین شد (شکل ۱.ج).

#### سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

سنجش رنگدانه‌های کلروفیل های a, b جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتری با مشخصات (JENWAY 6320D) با توجه به وزن تر هر نمونه بر حسب میلی‌گرم وزن تر ارزیابی گردید (Arnon, 1949).

#### سننیز و بررسی مشخصات نانوذرات

##### بتاسیکلودکسترین

با استفاده از روش لی و همکاران (Li et al., 2016)، محلول بتاسیکلودکسترین تهیه گردید. جهت سننیز نانوذرات و پراکندگی آنها محلول همراه مگنت بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق به مدت یک

نمونه‌های موجود در کتابخانه انجام شد (Adams, 2007). به منظور محاسبه اندیس بازداری مخلوطی از آلکان‌های نرمال شش تا بیست و چهار کربنی در شرایط مشابه دستگاهی به سیستم تزریق شد و اندیس کوتاس هر ترکیب محاسبه شد (Grob, 2004).

داده‌های حاصل با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSSver.22 و Graphpad.7 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ( $P \leq 5\%$ ) انجام شد.

### نتایج و بحث

خصوصیات مواد با تغییر اندازه آنها به سمت نانو تغییر می‌کند. تصویر TEM، در تایید سنتز نانوذرات  $\beta$ -CD به اندازه ۸۰ نانومتر، ایجاد ساختار مخروطی شکل با یک حفره آبگریز و لایه بیرونی آب‌دوست، تشکیل کمپلکس درون‌گیر مهمان-میزبان با مولکول‌های آلی گیاه را می‌دهد. آنالیز UV-vis و پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مصداق تشکیل نانوبتاسیکلودکسترین می‌باشد. ارتباط بین سلول‌های گیاهی با نانوذرات منجر به تغییر مسیرهای بیولوژیکی مرتبط می‌شود که در نهایت، در رشد و نمو گیاهی تاثیر می‌گذارد. خواص منحصر به فرد و قابل تنظیم نانوالیستورهای زیستی، کاربردهای گسترده‌ای در تولیدات گیاهی داشته است. آنالیز واریانس محتوای کلروفیل تحت تیمارهای مختلف  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> معنی‌دار گردید (جدول ۲). محتوای کلروفیل برگ‌ها یکی از عوامل کلیدی در تعیین سرعت فتوسنتز و تولید ماده خشک است. بررسی‌ها نشان داد میانگین مقدار کلروفیل a در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> نسبت به کنترل و ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش

### اندازه‌گیری شاخص‌های فلورسانس

#### کلروفیل

اندازه‌گیری میزان فلورسانس و عملکرد کوانتومی فتوسیستم II، ۲۴ ساعت بعد از اعمال آخرین تیمار  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> انجام شد. با استفاده از دستگاه فلورومترا قابل حمل (مدل OSI-30) ساخت شرکت (OPTI SCIENCES)، پارامترهای فلورسانس از قبیل: FO (فلورسانس کمینه)، Fm (فلورسانس بیشینه)، Fv (فلورسانس متغیر) [Fm- (عملکرد کوانتوم فتوسیستم II) و Fo] (عملکرد کوانتوم فتوسیستم II) یادداشت برداری و ثبت شدند (Genty *et al.*, 1989).

### سنجش میزان کربوهیدرات، پرولین و

#### تبادلات گازی

سنجش قندهای محلول و نامحلول و پرولین به ترتیب با استفاده از روش فنل-اسیدسولفوریک نووتنی (Nowotny, 1979) و بی‌تس و همکاران (Bates *et al.*, 1973)، پارامترهای تبادلات گازی با روش فیشر و همکاران (Fischer *et al.*, 1998) اندازه‌گیری شد.

#### تهیه اسانس

پس از برداشت گیاهان و به منظور حفظ کمیت و کیفیت اسانس، گیاهان در سایه و دمای محیط خشک شدند. روش استخراج جذبی از فضای فوقانی (HS-SE)، در این پژوهش استفاده شد.

برای آنالیز اسانس گیاه مورد نظر از یک دستگاه (GC-MS (Mass-Gas Chromatography Spectrometer) مدل ۵۹۷۴ (امیلنت امریکا) مجهز به ستون از نوع (HP-5 x 0.25mm 30nm) استفاده شد

شناسایی ترکیبات با استفاده از محاسبه‌ی اندیس بازداری و مقایسه طیف جرمی و ترکیب با

محافظت از رنگدانه‌ها را فراهم می‌کند و باعث افزایش محتوای کلروفیل گیاه دارویی ریحان شده است. به‌طور کلی، می‌توان گفت با توجه به نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی در فرآیند فتوسنتز از نظر دریافت تشعشعات فعال فتوسنتزی، کاهش دادن انرژی بالای فوتون‌ها و تعدیل این انرژی به‌منظور جلوگیری از تخریب رنگیزه‌ها و توسعه تشعشعات دریافتی و انتقال آنها به مراکز واکنش در فتوسیستم‌ها، با اهداف راه‌اندازی زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و حفظ عملکرد مطلوب آن می‌شود (Tanaka and Tanaka, 2006). وجود محتوای بالاتری از این رنگیزه‌ها می‌تواند به بالا بودن کارایی فتوسنتزی و کاهش اکسیداسیون نوری کمک کرده و همراه با نقش حفاظتی کاروتنوئیدها برای مقابله با اکسیژن فعال برای گیاهان زراعی مفید واقع گردد (Sarvajeet and Narendra, 2010). مقدار فلورسانس کلروفیل، سالم بودن غشای تیلاکوئید و کارآمدی نسبی انتقال الکترون را از فتوسیستم II به فتوسیستم I نشان می‌دهد (Mohammadi *et al.*, 2008). هنگامی که نور در سطح متوسط باشد بخش غالب آن در فعالیت‌های فتوشیمیایی به مصرف فتوسنتز می‌رسد و بخش کمی از انرژی نورانی به‌صورت فلورسانس ساطع می‌گردد که به‌عنوان فلورسانس کمینه (Fo) شناخته می‌شود (Roháčec *et al.*, 2008). آنالیز واریانس شاخص فلورسانس در تمامی تیمارها معنی‌دار گردید (جدول ۲). با محلول پاشی ۵۰ ppm از  $\beta$ -CDNPs بر روی ریحان مقدار فلورسانس کمینه (Fo) کاهش معنی‌دار (P≤%5) یافت. در سطح ۱۰۰ ppm افزایش معنی‌دار (P≤%5)، نسبت به ۵۰ ppm حاصل شد (جدول ۴). افزایش محتوای کلروفیل باعث کمتر شدن فلورسانس حداقل (Fo) می‌شود که با افزایش

معنی‌دار (P≤%5) نشان داد. کمترین مقدار آن در تیمار ۱۰ ppm حاصل شد. بین محتوای کلروفیل برگی و سرعت فتوسنتز آن همبستگی بالایی وجود دارد. به‌طوری‌که، محتوای پایین کلروفیل نشانه‌ای از تنش اکسیداتیو است که ممکن است باعث اکسیداسیون نوری رنگدانه و تخریب کلروفیل شود (Ribaut *et al.*, 2012). افزایش معنی‌دار (P≤%5) کلروفیل b در تیمار ۱۰۰ ppm نسبت به سایر تیمارها و کنترل مشاهده شد. محتوای کلروفیل b در تیمار ۱۰ ppm کاهش معنی‌دار (P≤%5) را نسبت به سایر سطوح و کنترل نشان داد و روند تغییرات زیادی بین تیمار ۵۰ ppm و کنترل مشاهده نشد. کاهش میزان کلروفیل b بر پایداری کلروفیل a می‌افزاید و باعث افزایش مقدار کل کلروفیل می‌گردد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، افزایش معنی‌دار (P≤%5) مقدار کلروفیل کل در سطح ۵۰ ppm نسبت به سایر سطوح و کنترل حاصل شد. حفظ غلظت کلروفیل در غلظت ۵۰ ppm به ثبات فتوسنتز در این شرایط کمک می‌کند. بهبود فعالیت‌های فتوسنتزی با افزایش میزان کلروفیل کل و افزایش سطح برگ در غلظت موثر از- $\beta$  CDNPs به‌دست آمد (شکل ۲). بتاسیکلودکسترین‌ها جزو الیسیتورهای زیستی الیگوساکاریدی محسوب می‌شوند و دارای ساختار نشاسته‌ای و ترکیبات مربوط به آن می‌باشد (Annamalai *et al.*, 2018). به نظر می‌رسد فرآیندهای متابولیسمی گیاه ریحان با استفاده از نشاسته موجود در غلظت مناسب  $\beta$ -CDNPs به عنوان منبع کربوهیدراتی، موجب افزایش رشد و کلروفیل شده و مانع از تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود. ساختار مولکولی نانوذرات بتاسیکلودکسترین در غلظت بهینه امکان

حالت فلورسانس کلروفیل افزایش می‌یابد و مراکز فتوسیستم دارای بیشترین فلورسانس (Fm) است (Paknejad *et al.*, 2006). آلفا و بتا سیکلودکسترین باعث کاهش چشمگیر سطح (Fo) می‌شوند این شواهد به شدت از آزادسازی مراکز فتوشیمیایی جدید حمایت می‌کند. بتا و آلفا سیکلودکسترین فعالیت فتوسیستم II را افزایش می‌دهند که از یک طرف، مربوط به ظرفیت آنها برای القا است. از طرف دیگر، با تغییرات ساختاری در غشای تیلاکوئیدها، مراکز مسدود شده فتوسیستم II توسط Sridharan *et al.*, (2002). به نظر می‌رسد غلظت مطلوب از  $\beta$ -CDNPs تاثیر مثبت بر ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون دارد و موجب می‌شود سیستم به کندی به (Fm) برسد.

#### تغییرات شاخص‌های تبادلات گازی

حساس‌ترین شاخص برای بررسی وضعیت فیزیولوژیکی گیاه به‌ویژه، تحت شرایط الیستورها، بررسی رفتار روزنه‌ها است. آنالیز واریانس تبادلات گازی تحت تیمارهای مختلف  $\beta$ -CDNPs معنی‌دار شد (جدول ۲). محلول پاشی ۵۰ ppm و ۱۰ ppm از  $\beta$ -CDNPs هدایت روزنه‌ای را نسبت به شاهد افزایش و سطح ۱۰۰ ppm آن را کاهش داد. به طوری که ماکزیمم افزایش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (جدول ۴). اصولاً هدایت روزنه‌ای معیاری از وضعیت باز ماندن روزنه‌ها است. بازماندن روزنه‌ها با افزایش میزان تعرق، باعث حصول هدایت روزنه‌ای بالاتر و فتوسنتز بیشتر شده است (Rodriguez *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد محلول پاشی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر  $\beta$ -CDNPs موجب باز شدن روزنه‌ها می‌شود. در نتیجه بر هدایت روزنه‌ای افزوده شده

محتوای کلروفیل کل در غلظت موثر از نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. فلورسانس اولیه نشان‌دهنده سطحی از فلورسانس است که پذیرنده کوئینون آ (QA) در بالاترین شرایط اکسیداسیونی قرار دارد (مرکز فتوسیستم دو باز است) در حقیقت هرچه مقدار (Fo) کمتر باشد، نشان از مطلوبیت جریان فعالیت فتوسنتزی است و در این شرایط تثبیت کربن یا انتقال الکترون با سرعت بیشتری در جریان است (Sadeghi- Shoaie *et al.*, 2014). افزایش غلظت  $\beta$ -CDNPs در سطح ۵۰ ppm باعث افزایش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) فلورسانس بیشینه و متغیر و کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II نسبت به شاهد در ریحان شد (جدول ۴). کاهش در (Fo) و افزایش در (Fm)، فعالیت فتوسیستم II را مختل نمی‌کند. افت (Fm) ممکن است با کاهش فعالیت کمپلکس آنزیم تجزیه کننده آب و همچنین چرخه انتقال الکترون در درون یا اطراف فتوسیستم II مرتبط باشد (Zlatev, 2009). مقدار فلورسانس متغیر (Fv) نشانگر احیای کامل پذیرنده الکترون (QA) می‌باشد. وقتی مولکول‌های کوئینون (اولین پذیرنده الکترون در فتوسیستم II) در وضعیت اکسید شده هستند (وضعیتی که مرکز واکنش فتوسیستم II فعال بوده و پذیرنده‌های الکترون که به ترتیب شامل کوئینون، کوئینون آ (QA) و کوئینون ب (QB) بوده انرژی را به PQ و از PQ به فتوسیستم I انتقال داده بود و صرف تولید ATP و NADPH می‌کنند. در این حالت سیستم دارای کمترین فلورسانس (Fo) است. به تدریج با افزایش درجه احیاء شدن، فلورسانس افزایش می‌یابد. این فرآیند تا احیای کامل ادامه یافته و مراکز احیای فتوسیستم II به تدریج بسته می‌شوند و انتقال الکترون به فتوسیستم I صورت نمی‌گیرد. در این

و  $CO_2$  ورودی جهت انجام فتوسنتز بیشتر می‌شود. با افزوده شدن سرعت فتوسنتز با مصرف  $CO_2$  از غلظت دی‌اکسیدکربن زیر اتاقک روزنه کاسته می‌شود. در دسترس بودن دی‌اکسیدکربن در کلروپلاست توسط هدایت روزنه‌ای تنظیم می‌شود. مقایسه میانگین میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای روند مشابهی در سطح ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> نشان داد (جدول ۴). بررسی نتایج حاضر نشان داد در غلظت موثر  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> تعرق روزنه‌ای احتمالاً باعث آسیمیلاسیون بیشتر دی‌اکسیدکربن شده و در نهایت بیوماس و تولید بیشتر می‌شود و بالا بودن نرخ تعرق با افزایش هدایت روزنه‌ای مشاهده شد. تعرق به هدایت روزنه‌ای وابسته است. هرچه هدایت بیشتر باشد تعرق بیشتر شده و فعالیت و رشد گیاه بهتر می‌شود. روند تغییرات فتوسنتز خالص در غلظت‌های مختلف  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> نسبت به کنترل معنی‌دار بود. ماکزیمم افزایش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) در تیمار ۵۰ ppm حاصل شد. علت افزایش نرخ فتوسنتز را می‌توان به افزایش غلظت کلروفیل نسبت داد. با به‌کاربردن غلظت مناسب از  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub>، مقدار کلروفیل کل بیشتر شد و ظرفیت فتوسنتزی و تخصیص مواد فتوسنتزی را به مخازن افزایش داد. تغییر در هدایت روزنه‌ای و تبادلات  $CO_2$ ، تعرق، دلایل اختلاف در میزان فتوسنتز آنها می‌تواند باشد.

#### قندهای محلول و نشاسته

کربوهیدرات‌ها یکی از ذخایر غذایی مهم برای گیاه است و برای رشد و ادامه حیات گیاه به این ذخایر غذایی لازم دارند. گیاهان برای حفظ تعادل اسمزی و توانایی جذب بیشتر آب از محیط ریشه، کربوهیدرات‌ها که در ساختار سلول شرکت دارند و باعث رشد گیاه می‌شوند را در خود افزایش

می‌دهند تا تنظیم اسمزی به‌صورت مطلوبی صورت گیرد. در پژوهش حاضر، با بررسی آنالیز واریانس، میزان قندهای محلول برگ و ریشه ریحان تحت  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> معنی‌دار بود (جدول ۳). میانگین تغییرات افزایش معنی‌داری ( $P \leq 5\%$ ) در تیمار ۵۰ ppm نسبت به شاهد نشان داد. اما قند محلول ریشه در دو سطح ۱۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام روند معکوسی را نسبت به قند محلول برگ در این دو سطح داشت. به‌طوری‌که این روند برای برگ افزایش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ )، ولی برای ریشه کاهش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) را نسبت به کنترل نشان داد (شکل ۳. آ، ب). قندهای محلول به‌عنوان اسمولیت سازگار در شرایط محلول‌پاشی الیسیاتور زیستی  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> افزایش می‌یابد. تنظیم اسمزی عبارت است از کاهش در پتانسیل شیره سلولی به علت افزایش مواد محلول داخل سلول، و نه از طریق کاهش مقدار آب سلول می‌باشد. تجمع قندهای محلول سبب تنظیم اسمزی و تورژسانس سلول‌ها شده، باعث حفاظت و پایداری غشاء و پروتئین‌ها می‌شود. نانوبتاسیکلودکسترین به‌دلیل ساختار کربنی خود، می‌تواند به‌عنوان منبع کربوهیدراتی مورد استفاده قرار گیرد. بخش مهمی از کربن مورد نیاز جهت ساخت ترکیبات اسانس از فتوسنتز جاری و مواد ذخیره شده در اندام‌های گیاه تامین می‌گردد. انباشتگی قند محلول در سلول می‌تواند به‌علت تجزیه نشاسته به واحدهای کوچک‌تر و در نتیجه کاهش نشاسته سلول باشد. همان‌طوری‌که مقایسه میانگین داده‌های قند نامحلول برگ و ریشه در تحقیق حاضر نشان داده شد نانو بتاسیکلودکسترین موجب کاهش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) آنها در سطح ۵۰ ppm نسبت به شاهد و دو سطح دیگر شده است (شکل ۳. ج، د). کاهش نشاسته دلیلی بر این ادعا است که نشاسته تجزیه



مشاهده شد (شکل ۴. آ، ب). پرولین به‌عنوان یکی از محافظت‌کننده‌های غشاء می‌باشد. افزایش میزان پرولین در پاسخ به اثرات تنشی غلظت بالا می‌باشد. در نتیجه‌ی کاهش اسیدی شدن سلول، تولید  $\text{NADP}^+$  و حمایت از مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات می‌شود. چون وابسته به  $\text{NADP}$  بوده و توسط  $\text{NADPH}$  مهار می‌شود. احتمالاً افزایش پرولین در ریشه ناشی از انتقال آن از برگ باشد. در سلول‌های گیاهی، پرولین نقش تنظیمی مهمی در فعالیت و عملکرد آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و مشارکت آنها در توسعه پاسخ‌های متابولیک به عوامل محیطی ایفا می‌کند. افزایش پرولین موجب کاهش اثرات منفی  $\beta\text{-CDNP}_s$  شد.

#### تغییرات اسانس

اسانس ریحان شامل دو گروه ترپن‌ها (لیمونن، کامفور، لینالول، ژرانیول و غیره) و فیل‌پروپانوئیدها (اوژنول، چاویکول، متیل چاویکول، سینامات و غیره) است که این ترکیبات نماینده صفات دارویی در این گیاه است (Achnine *et al.*, 2004). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تغییرات میزان اسانس در تیمارهای مختلف از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P \leq 5\%$ ) (جدول ۳). بیشترین مقدار فنیل پروپانوئیدها با به‌کار بردن غلظت  $50 \text{ ppm}$   $\beta\text{-CDNP}_s$  به‌دست آمد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین مقدار مونوترپن‌ها در غلظت  $50 \text{ ppm}$  و کمترین آنها در غلظت  $100 \text{ ppm}$  بود و عکس این روند در سزکوئی‌ترین‌ها مشاهده شد. مقدار ترکیبات دیگر مانند استرها، الکل‌ها و آلدئیدها در تمامی سطوح معنی‌دار بود. کمترین مقدار آنها در سطح  $50 \text{ ppm}$  نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۵).

شده و قندهای محلول را ایجاد کرده است. روند تغییرات معنی‌دار نشاسته در سطوح دیگر نوسانات شدیدی را نسبت به شاهد نشان نداد. افزایش نسبت ساکارز به نشاسته و تجزیه نشاسته همچنین کاهش انتقال ساکارز به خارج از برگ‌ها منجر به افزایش کربوهیدرات‌های محلول می‌گردد.  $\beta\text{-CD}$  مانع از کمپلکس شدن آمیلوز و لیپید می‌شود و یک کمپلکس جدید با بتاسیکلودکسترین تشکیل می‌دهد. این شکل‌گیری نشان می‌دهد که نشاسته با تاخیر تجزیه می‌شود و با تجزیه مجدد آن، نشاسته کاهش می‌یابد. به‌دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل سطح بیرونی  $\beta\text{-CD}$  هنگام تشکیل کمپلکس آمیلوز با آن، خصوصیات فیزیکوشیمیایی گرانول‌های نشاسته را بهبود می‌بخشد (Tian *et al.*, 2011).

#### تغییرات پرولین

پرولین ترکیب یا جزء عمده‌ای از پاسخ‌های گیاهان نسبت به محرک‌ها است و یک اسید آمینه کلیدی در تنظیم اسمزی است. علاوه بر این، پرولین منبع نیتروژن و کربن برای رشد و ترمیم گیاهان و یک خورنده رادیکال‌های آزاد نیز محسوب می‌شود (Nayyar and Walia, 2003). در پژوهش حاضر، آنالیز واریانس پرولین تحت سطوح مختلف  $\beta\text{-CDNP}$  معنی‌دار شد (جدول ۳). تیمار ریحان با  $50$  و  $100$  میلی‌گرم بر لیتر نانوبتاسیکلودکسترین موجب افزایش معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) پرولین برگ نسبت به شاهد و  $10$  میلی‌گرم بر لیتر شد. بین دو سطح شاهد و  $10 \text{ ppm}$  تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. روند تغییرات پرولین در ریشه مشابه با برگ بود. با این تفاوت که هر سه سطح تیمار با گروه شاهد در چهار گروه آماری قرار گرفتند و افزایش معنی‌دار

غلظتی از الیسیاتور که در یک گیاه اثر تحریکی دارد ممکن است در گیاه دیگر اثر نداشته باشد. فنیل پروپانویدها با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر علیه رادیکال‌های آزاد ترکیبی حفاظتی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌شمار می‌آید. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از انتقال سیگنال را القاء می‌کند که با تشخیص مولکول‌های محرک توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. اسانس استخراج شده از گیاهان کشت شده تحت تیمار با سیکلودکستین، به‌عنوان ضد میکروب طبیعی پایدار مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kfoury *et al.*, 2018). یکی از مهم‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی در مورد گیاهان دارویی استفاده از غلظت مناسب الیستورهای زیستی بر میزان عملکرد کمی و کیفی گیاهان است. از مهم‌ترین دغدغه‌های تولیدکنندگان گیاهان دارویی علاوه بر میزان کمی محصول، تولید گیاهی با کیفیت و مواد موثره بالا می‌باشد. هدف اصلی و نهایی از کشت گیاهان دارویی، استفاده از مواد موثره و متابولیت‌های ثانویه مهم در آنها است. هر چقدر حفظ این مواد در گیاه بالاتر باشد و باعث استخراج متابولیت‌های ثانویه بیشتری شود از نظر اقتصادی نفع بیشتری حاصل خواهد شد. بنابراین، استفاده هوشمندانه از غلظت مناسب ماده موثر زیستی نانوذرات  $\beta$ -CD منجر به تولید گیاهان دارویی و زراعی با کیفیت و با بیشترین درصد متابولیت‌های ثانویه می‌شود.

### نتیجه‌گیری کلی

ورود نانوذرات  $\beta$ -CD به‌عنوان ترکیبات فعال زیستی به بخش کشاورزی موجب افزایش تولیدات گیاهی و عملکرد کیفی گیاه می‌شود. بهترین راه افزایش تولید ریحان، افزایش عملکرد آن در واحد سطح می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد که تاثیر  $\beta$ -

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد مونوترپن‌های ریحان تحت  $\beta$ -CDNs در چهار گروه آماری قرار گرفتند و نسبت به شاهد معنی‌دار ( $P \leq 5\%$ ) بودند. بین کنترل و سطوح 100 و 10 ppm میزان تولید ترکیبات استری و الکلی و آلدئیدها از نظر آماری در چهار گروه قرار گرفتند. کمترین مقدار آن در سطح 50 ppm مشاهده گردید (شکل ۵). اسانس می‌تواند به ترکیباتی آبگریز مثل لیپیدها و پروتئین‌ها متصل شده و فعالیت آنها را کاهش دهد (Burt *et al.*, 2014; Turkez *et al.*, 2005). اما سیکلودکستین‌ها می‌توانند این تعامل‌ها را کاهش داده و باعث حفظ آن و کاهش رادیکال‌های آزاد شوند. از طرف دیگر، هرچه فعالیت فتوسنتزی افزایش پیدا کند ساخت اسانس افزایش می‌یابد. در یک مطالعه پژوهشی، ژنوتیپی از یک گیاه که فتوسنتز بیشتری داشت مقدار اسانس بیشتری نیز از پیکر رویشی آن استخراج شده است (Misra *et al.*, 2006). با توجه به نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر با افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی در سطح 50 میلی‌لیتر برگرم موجب افزایش مقدار ترکیبات موثره در ریحان دارویی ضمن حفظ اسانس فرار با بکارگیری غلظت مناسب از نانو بتاسیکلودکستین شده است. همچنین، سیکلودکستین‌ها می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه عمل کنند و باعث تقویت ضد درد شوند. مقایسه میانگین داده‌ها وجود سطح بالاتری از ترکیبات فنیل پروپانویدی در غلظت 50 میلی‌گرم بر لیتر را نشان داد (شکل ۵). این امر در گیاه موجب فعال شدن سیستم دفاعی می‌شود. غلظت الیسیاتور نقش مهمی در فرآیند تحریک دارد و عامل مؤثری بر شدت پاسخ است. غلظت مؤثر الیسیاتور نیز بر حسب گونه گیاهی فرق می‌کند، به‌طوری‌که

می‌کند. یافته‌ها نشان داد الیسیاتور نانو بتاسیکلودکسترین میزبانی برای افزایش و نگهداری اسانس ریحان است. نکته قابل توجه این که  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> می‌تواند اسانس فرار را هم به صورت محلول و هم به صورت خشک در برگیرند و علاوه بر نوع شکل‌گیری در گیاه، امکان استفاده بهتر و کارآمدتر و آسان‌تر اسانس گیاهان را فراهم می‌کند. در مجموع نتایج این بررسی نشان می‌دهد کاربرد ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> به عنوان محرک رشد در رقم کشکنی‌لؤلؤ گیاه ریحان در افزایش کیفیت و عملکرد آن به کمک تغییر در رنگیزه‌ها و کارایی فتوسنتزی و فتوشیمیایی فتوسیستم II، افزایش و حفظ مواد موثره و مقدار قند محلول و نامحلول و پرولین، موثر عمل می‌کند. با توجه به محبوبیت گیاه دارویی ریحان، اولین گزارش از تکنیک کارآمد محلول‌پاشی غلظت موثر الیسیاتور به کار برده شده در مطالعه حاضر، محلول‌پاشی  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> به عنوان روشی که بتوان ارزش افزوده این منبع دارویی مهم را ارتقا داد، پیشنهاد می‌گردد.

CDNP<sub>s</sub> وابسته به غلظت است. غلظت ۵۰ ppm از نانوذرات بتاسیکلودکسترین بیشترین تاثیر را بر روی محتوای کلروفیل و کارایی فتوسنتز و شاخص فلورسانس و میزان کربوهیدرات‌های محلول و نامحلول و پرولین و اسانس در ریحان داشت. بنابراین، به‌کارگیری این تکنیک جهت تضمین ایمنی، تناسب، امکان دسترسی و توسعه تجاری و اقتصادی در راستای بهبود کیفیت محصول و حداکثر بازده عملکرد و اسانس گیاهان دارویی در نظام‌های کشاورزی پایدار ضروری به نظر می‌رسد. ساختار مولکولی نانوذرات بتاسیکلودکسترین در غلظت بهینه امکان محافظت از رنگدانه‌ها را فراهم می‌کند و باعث افزایش محتوای کلروفیل گیاه دارویی ریحان شد. کاهش نشاسته هر دو اندام رویشی در ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر منعکس‌کننده افزایش تقاضای انرژی برای رشد است. توانایی پرولین در کاهش اثرات منفی محرک‌ها است. به نظر می‌رسد تجمع پرولین نه تنها فعالیت‌های شیمیایی را متوقف نمی‌کند، بلکه به‌عنوان یک محافظ اسمزی عمل

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1-physical and chemical properties of the soil used in this experiment

	شن Sand	رس Clay	سیلت Silt	منگنز Mn	روی Zn	آهن Fe	پتاسیم K	فسفر P	نیتروژن N	اسیدیته Acidity	هدایت الکتریکی Ec (ds.m <sup>-1</sup> )
بافت خاک	Soil texture (%)			(ppm)						pH	
لومی‌شنی (Sandy-loam)	44	30	26	3.2	4.9	2.3	187	13	6.2	6.9	1.8

**جدول ۲-** تجزیه واریانس محتوای کلروفیل، فعالیت‌های فتوسنتزی و تبادلات گازی گیاه ریحان رقم کشکنی لوءلوه تحت تاثیر نانوذرات بتاسیکلودکستین

**Table 2-** Analysis of variance for chlorophyll content, photosynthetic activities, gas exchanges in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni levelou

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	فلورسانس بیشینه (Fm)	فلورسانس متغیر (Fv)	بتانسیل عملکرد کوانتوم (Fv/Fm)	کلروفیل آ Chl a	کلروفیل ب Chl b	کلروفیل کل Total chl
نانوذرات بتاسیکلودکستین $\beta$ -CDNP <sub>s</sub>	3	14700**	20230**	0.0098**	0.0002**	0.0002**	0.0001**
Error خطا	12	5750	3650	0.0006	0.0003	0.0002	0.0001
C.V.(%) ضریب تغییرات	-	1.9	2.3	2.4	1.3	3.6	0.2

ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively. ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively.

ادامه جدول ۲-

**Table 2-** Continued

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	هدایت روزنه‌ای Stomata conductance	دی‌اکسیدکربن زیر روزنه sub- stomatalCO2 concentration	شدت تعرق Transpiration rate	نرخ فتوسنتز خالص Net photosynthesis	فلورسانس اولیه (Fo)
نانوذرات بتاسیکلودکستین $\beta$ -CDNP <sub>s</sub>	3	0.0009**	3536**	0.9873**	20.02**	44630**
Error خطا	12	0.0004	14.04	0.039	0.035	1007
C.V.(%) ضریب تغییرات	-	0.6	0.6	4.3	1.6	8.6

ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively. ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively.

**جدول ۳-** تجزیه واریانس قندهای محلول و نامحلول، محتوای پرولین و اسانس گیاه ریحان رقم کشکنی لوءلوه تحت تاثیر نانوذرات بتاسیکلودکستین

**Table 3-** Analysis of variance for carbohydrates, prolin and essence content in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni levelou

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	پرولین ریشه Prolin root	قند محلول برگ Soluble sugar leaf	قند محلول ریشه Soluble sugar root	قند نامحلول برگ Un soluble sugar root	قند نامحلول ریشه Un soluble sugar root
نانوذرات بتاسیکلودکستین $\beta$ -CDNP <sub>s</sub>	3	0.542**	0.0033**	0.0041**	0.0003**	0.0001**
Error خطا	12	0.001	0.0005	0.0001	0.0005	0.0002
C.V.(%) ضریب تغییرات	-	2.2	0.6	0.7	0.1	0.4

ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively. ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively.

ادامه جدول ۳-  
Table 3- Continued

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	ترکیبات دیگر Other compounds	فنیل پروپانوئیدها Phenylpropanoids	سزکوئیترینها Sesquiterpenes	مونوترپینها Monoterpenes	پرولین برگ Prolin leaf
نانوذرات بتاسیکلودکسترین $\beta$ -CDNP <sub>s</sub>	3	507.4**	13.47**	0.357**	172.4**	3.491**
خطا Error	12	0.697	0.204	0.102	0.143	0.049
ضریب تغییرات (%) C.V.	-	0.2	0.1	0.7	0.3	0.1

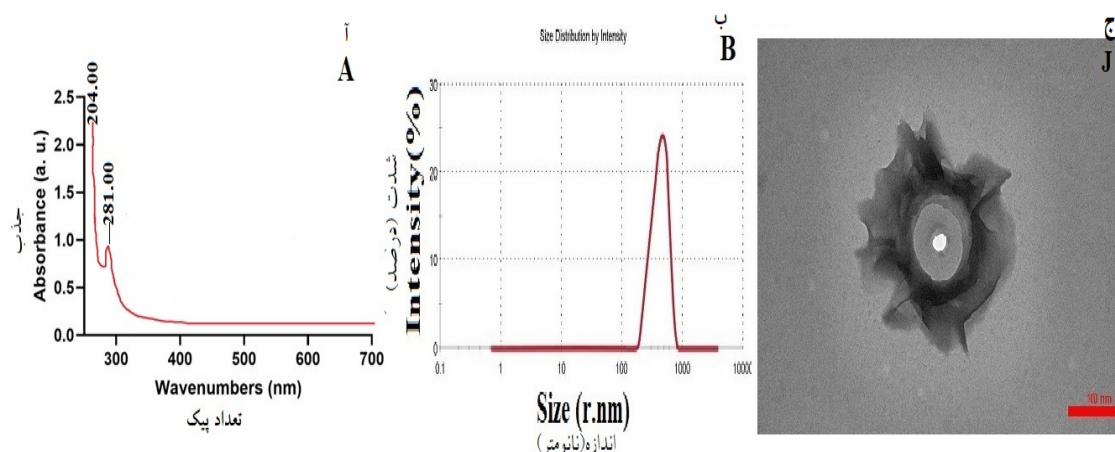
ns, \*\* و \* به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد.  
ns, \* and \*\* non-significant, significant at 5 and 1% level, respectively.

جدول ۴- اثرات نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر پارامترهای مورد بررسی ریحان رقم کشکنی لولوء

Table 4- The effect of  $\beta$ -CD nanoparticles on the studied parameters in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni luvellou

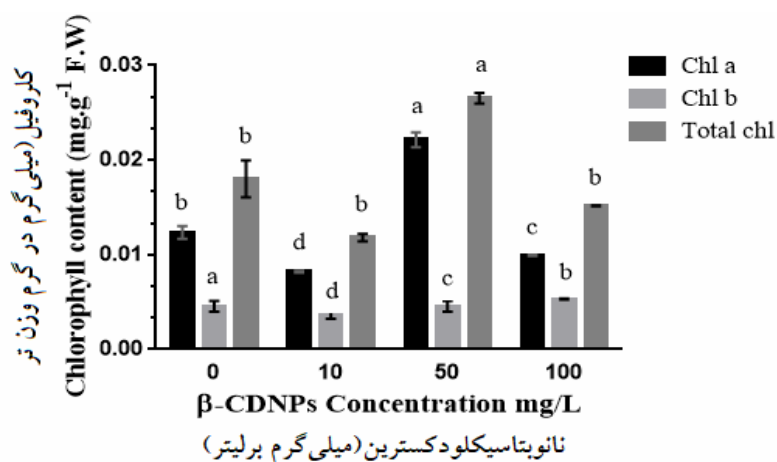
پارامترها Parameters	مقایسه میانگین نانوذرات بتاسیکلودکسترین Means comparison $\beta$ -CDNP <sub>s</sub> (mg/l)			
	100	50	10	0
فلورسانس اولیه (Fo)	5593±108.55a	3454±297.86b	5361±586.87a	569.25±156.90a
فلورسانس بیشینه (Fm)	3207±361.45ab	4336±826.07a	3279±259.07ab	2970.75±159.48b
فلورسانس متغیر (Fv)	2648±277.02bc	3990±952.90a	3279±2103.28b	2401.5±126.81c
بتانسیل عملکرد کوانتوم (Fv/Fm)	0.826±0.019b	0.921±0.008a	0.837±0.009b	0.809±0.044b
هدایت روزنه‌ای Stomataconductance (mol co <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> . S <sup>-1</sup> )	0.031±0.002d	0.042±0.006a	0.038±0.004b	0.034±0.003c
دی اکسید کربن زیر روزنه Sub-stomatal CO <sub>2</sub> concentration (mmol co <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	378±2.160a	309.75±1.708d	353.5±6.454c	365.75±2.639b
شدت تعرق Transpiration rate (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> . S <sup>-1</sup> )	2.325±0.330a	2.45±0.129a	1.9±0.018b	1.35±0.129c
نرخ فتوسنتز خالص Net photosynthesis ( $\mu$ molco <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> . S <sup>-1</sup> )	7.65±0.265b	8.8±0.141a	5.75±0.129c	3.7±0.183d

حروف مشترک بیان کننده عدم تفاوت معنی دار در سطح (P≤%5) با استفاده از آزمون دانکن است.  
Means followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test at (P≤%5).



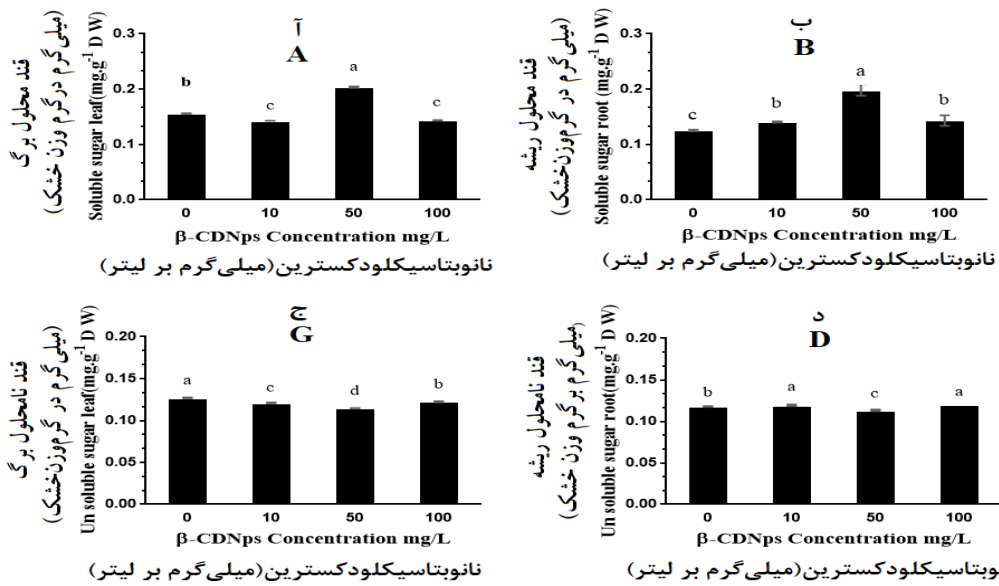
شکل ۱- خصوصیات مختلف فیزیکوشیمیایی نانوبتاسیکلودکسترین. (آ) طیف جذب نانوذرات بتاسیکلودکسترین. (ب) توزیع اندازه نانوبتاسیکلودکسترین بر اساس شدت در محلول آبی باطیف پراکندگی نور دینامیکی. (ج) مورفولوژی و اندازه ذرات نانو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (TEM)

**Figure 1-**The different physicochemical characteristics of nano-  $\beta$ -CD; A) UV-Vis scan The size distribution by the intensity in aqueous solution based )B.spectrum curve of  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> on the Dynamic Light Scattering (DLS) of the  $\beta$ -CD nanoparticles, reflecting narrow size, J) The morphology and size of nano-particle manifested using field emission scanning electron microscopy (TEM)



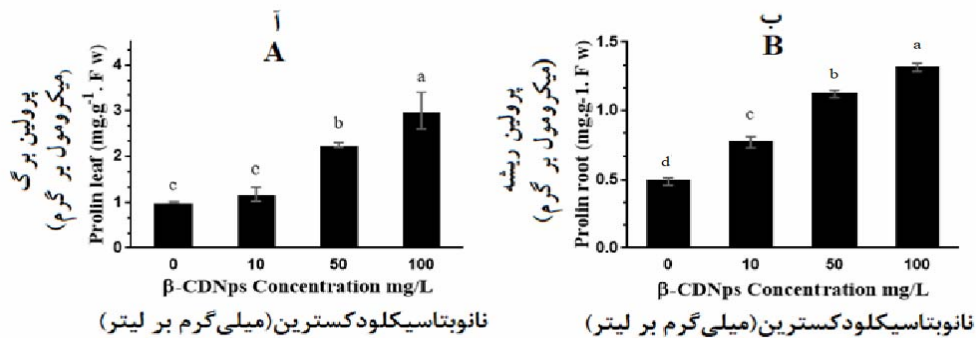
شکل ۲- مقایسه میانگین محتوای کلروفیل (a,b,a+b) ریحان رقم کشکنی لوء لوء در سطوح مختلف  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> **Figure 2-** Means comparison for chlorophyll content (a,b,a+b) in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni levelou under the influence of  $\beta$ -CD nanoparticles.

حروف مشترک بیان کننده عدم تفاوت معنی دار در سطح (P≤%5) با استفاده از آزمون دانکن است. Means followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test at (P≤%5).



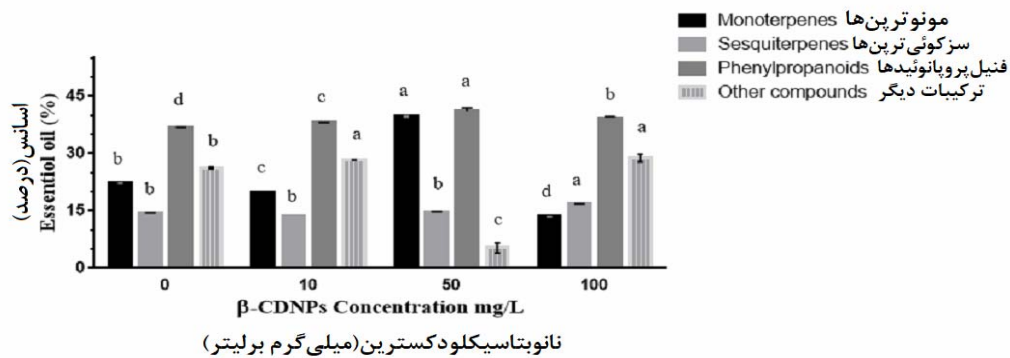
شکل ۳- مقایسه میانگین قندهای محلول برگ و ریشه (آ و ب) نامحلول برگ و ریشه (ج و د) ریحان رقم کشکنی لوءلوه در سطوح مختلف  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub>

Figure 3- Means comparison for soluble sugar leaf, root (A,B) and un soluble sugar leaf, root (G,D) in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni luvellou under the influence of  $\beta$ -CD nanoparticles



شکل ۴- مقایسه میانگین پرولین برگ (آ) و ریشه (ب) ریحان رقم کشکنی لوءلوه در سطوح مختلف  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub>

Figure 4- Means comparison for proline leaf (A) and root (B) in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni luvellou under the influence of  $\beta$ -CD nanoparticles



شکل ۵- مقایسه میانگین مقدار اسانس ریحان رقم کشکنی لوءلوه در سطوح مختلف  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub>

Figure 5- Means comparison for essential oil in *Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni luvellou under the influence of  $\beta$ -CD nanoparticles

حروف مشترک بیان کننده عدم تفاوت معنی دار در سطح (P≤5%) با استفاده از آزمون دانکن است. Means followed by the same letters are not significantly different using Duncan's test at (P≤5%).

## References

## منابع مورد استفاده

- Achnine, L., E.B. Blancaflor, S. Rasmussen, and R.A. Dixon. 2004. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell*. 16: 3098–3109.
- Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation Carol Stream, IL.
- Almagro, L., and M.A. Pedreño. 2020. Use of cyclodextrins to improve the production of plant bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews*. 19: 1–20.
- Annamalai, S., M. Santhanam, S. Selvaraj, M. Sundaram, K. Pandian, and M. Pazos. 2018. Green technology: Bio-stimulation by an electric field for textile reactive dye contaminated agricultural soil. *Science of The Total Environment*. 624: 1649–1657.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24: 1-15.
- Bates, L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205–207.
- Burt, S.A., R. Vlieland, H.P. Haagsman, and E.J.A. Veldhuizen. 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of Food Protection*. 68: 919–926.
- Cellamare, B.M., P. Fini, A. Agostiano, S. Sortino, and P. Cosma. 2013. Identification of ROS produced by photodynamic activity of chlorophyll/cyclodextrin inclusion complexes. *Photochemistry and Photobiology*. 89: 432–441.
- Dentuto, P.L., L. Catucci, P. Cosma, P. Fini, A. Agostiano, S. Hackbarth, F. Rancan, and B. Roeder. 2007. Cyclodextrin/chlorophyll a complexes as supramolecular photosensitizers. *Bioelectrochemistry*. 70: 39–43.
- Donsi, F., M. Annunziata, M. Sessa, and G. Ferrari. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*. 44: 1908–1914.
- Fenyvesi, E., M. Vikmon, and L. Szenté. 2016. Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56: 1981–2004.
- Fischer, R.A., D. Rees, K.D. Sayre, Z.M. Lu, A.G. Condon, and A.G. Saavedra. 1998. Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. *Crop Science*. 38: 1467–1475.
- Garcia-Pérez, P., S. Losada-Barreiro, P.P. Gallego, and C. Bravo-Díaz. 2019. Cyclodextrin-elicited bryophyllum suspension cultured cells: Enhancement of the production of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 1-18.
- Gentili, A. 2020. Cyclodextrin-based sorbents for solid phase extraction. *Journal of Chromatography*. 16: 1-20.
- Genty, B., J.M. Briantais, and N.R. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 87–92.



- Gonzalez Pereira, A., M. Carpena, P. Garcia Oliveira, J.C. Mejuto, M.A. Prieto, and J. Simal Gandara. 2021. Main applications of cyclodextrins in the food industry as the compounds of choice to form host-guest complexes. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 1-23.
- Grob, R.L. 2004. Theory of gas chromatography. *Modern Practice of Gas Chromatography*. 23-63.
- Hanif, M.A., M.Y. Al-Maskari, A. Al-Maskari, A. Al-Shukaili, A.Y. Al-Maskari, and J.N. Al-Sabahi. 2011. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 751-757.
- Jansook, P., N. Ogawa, and T. Loftsson. 2018. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 535: 272-284.
- Kashyap, C.P., K. Ranjeet, A. Vikrant, and K. Vipin. 2011. Therapeutic potency of *Ocimum Kilimandscharicum* Guerke. A Review. *Global Journal of Pharmacology*. 5: 191-200.
- Kfoury, M., L. Auezova, H. Greige-Gerges, and S. Fourmentin. 2018. Cyclodextrins for essential oils applications, in: *Cyclodextrin applications in medicine, food, environment and liquid crystals*. 4: 81-123.
- Li, Z., H. Li, C. Wang, J. Xu, V. Singh, D. Chen, and J. Zhang. 2016. Sodium dodecyl sulfate/ $\beta$ -cyclodextrin vesicles embedded in chitosan gel for insulin delivery with pH-selective release. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 6: 344-351.
- Mahmoudi, M. V. Serpooshan, and S. Laurent. 2011. Engineered nanoparticles for biomolecular imaging. *Nanoscale*. 3: 3007-3026.
- Malakouti, M.J., F. Moshiri, and M.N. Ghaibi. 2005. Optimum levels of nutrients in soil and some agronomic and horticultural crops. *Soil and Water Research Institute. Technical Bulletin*. 405.
- Misra, A., S. Dwivedi, A.K. Srivastava, D.K. Tewari, A. Khan, and R. Kumar. 2006. Low iron stress nutrition for evaluation of Fe-efficient genotype physiology, photosynthesis, and essential monoterpene oil (s) yield of *Ocimum sanctum*. *Photosynthetica*. 44: 474-477.
- Mohammadi, H., A. Soltani, H.R. Sadeghipour, E. Zeynali, and H.R.A. Najafi. 2008. Effect of seed deterioration on vegetative growth and chlorophyll fluorescence in soybean (*Glycine max*). *Agricultural Sciences and Natural Resources*. 15: 112-118.
- Nayyar, H., and D.P. Walia. 2003. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum*. 46: 275-279.
- Nowotny, A. 1979. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In *Basic exercises in immunochemistry*. Publisher: Springer, Berlin, Heidelberg. 171-173.
- Paknejad, F., H.E. Majidi, G. Nourmohammadi, A.A. Siadat, and S. Vazan. 2006. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield in some wheat cultivars. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*. 33: 481-492.
- Ramawat, K.G., and J.M. Mérillon. 2008. *Book Bioactive molecules and medicinal plants*. Publisher: Springer Berlin, Heidelberg . 18-22.

- Ramirez-Estrada, K., H. Vidal-Limon, D. Hidalgo, E. Moyano, M. Golenioswki, R. Cusidó, and J. Palazon. 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. 21: 1-24.
- Ribaut, J.M., D.J. Bertioli, B. Raatz, P. Roberts, V. Vadez, R.K. Varshney, and N.N. Diop. 2012. Innovative approaches to increase tropical legume productivity in Africa and South Asia, in: Proceedings of International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG). VII-GAB01.
- Rodriguez, P., A. Torrecillas, M.A. Morales, M.F. Ortuno, and M.J. Sánchez-Blanco. 2005. Effects of NaCl salinity and water stress on growth and leaf water relations of *Asteriscus maritimus* plants. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 113-123.
- Roháček, K., J. Soukupová, and M. Barták. 2008. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. Plant, cell compartments- Selected Topics. Research Signpost, Kerala, India 41–104.
- Sadeghi -Shoae, M., D. Habibi, D. Taleghani, F. Paknejad, and A. Kashani. 2014. Evaluation the effect of paclobutrazol on bolting, qualitative and quantitative performance in autumn sown -sugar beet genotypes in Moghan region. *International Journal of Biosciences*. 5: 345 -354.
- Sarvajeet, S.G., and T. Narendra. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry*. 48: 909–930.
- Seyedi, M., A.A. Mousavi Mirkalaei, and H. Zahedi. 2022. The effect of water deficit stress and foliar application of zinc oxide nano particles on morphophysiological characteristics of landraces *Withania coagulans* L. *Crop Ecophysiology*. 62: 163-178.
- Shafique, M., S.J. Khan, and N.H. Khan. 2011. Study of antioxidant and antimicrobial activity of sweet basil (*Ocimum basilicum*) essential oil. *Pharmacologyonline*. 1: 105–111.
- Sridharan, G., E. Daneau, and M. Fragata. 2002. Relationship between chlorophyll a fluorescence induction and oxygen evolution in barley (*Hordeum vulgare*) thylakoids treated with alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins. *Canadian Journal of Botany*. 80: 741–751.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. 3rd. England: Sinauer Associates.
- Tanaka, A., and R. Tanaka. 2006. Chlorophyll metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 248–255.
- Tian, Y., Y. Li, X. Xu, and Z. Jin. 2011. Starch retrogradation studied by thermogravimetric analysis (TGA). *Carbohydrate Polymers*. 84: 1165–1168.
- Turkez, H., B. Togar, A. Tatar, F. Geyikoglu, and A. Hacimuftuoglu. 2014. Cytotoxic and cytogenetic effects of  $\alpha$ -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia*. 69: 936–942.
- Zlatev, Z. 2009. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 23: 438–441.

Research Article

DOI: 10.30495/JCEP.2023.1915954.1742

## Evaluation of Photosynthetic Activity, Carbohydrates, Proline and Essential Oils (*Ocimum basilicum* L.) under the Elicitor of $\beta$ -Cyclodextrin Nanoparticles

Azadeh Loni<sup>1</sup>, Sara Saadatmand<sup>2\*</sup>, Hossien Lari Yazdi<sup>3</sup> and Alireza Iranbakhsh<sup>2</sup>

Received: December 2020, Revised: 3 August 2021, Accepted: 23 August 2021

### Abstract

Induction of engineered nanoparticles into medicinal plants causes resistance, enhances quantitative and qualitative performance and effective substances in them. In this study,  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles ( $\beta$ -CDNP<sub>s</sub>) were synthesized. The nanoparticle profile was determined by UV-VIS spectrum, transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). Then different concentrations of  $\beta$ -CDNPs including 0, 10, 50, 100 mg / l were used for foliar spray of basil (*Ocimum basilicum* v. Keshkeni luvellou). The amount of chlorophyll pigments and basil essential oil was significantly different ( $P \leq 5\%$ ) compared to the control. The maximum amount of chlorophyll b was observed in 100ppm treatment. The results showed a significant reduction ( $P \leq 5\%$ ) of the minimum fluorescence value ( $F_0$ ) in the treatment of 50 ppm compared to the control and two levels of 10 and 100 ppm of  $\beta$ -CDNPs. The level of 50 ppm significantly increased ( $P \leq 5\%$ ) the maximum fluorescence, variable fluorescence ( $F_v$ ), photochemical efficiency of the photosystem compared to the control. Foliar spray of  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> caused changes in basil gas exchange. Soluble sugars and proline of basil leave and root in 50ppm treatment had a significant increase ( $P \leq 5\%$ ) compared to the control, so that insoluble sugars in leave and root showed the opposite trend. In the presence of  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub>, phenylpropanoids and terpenoids concentration, in the basil showed a significant difference ( $P \leq 5\%$ ) compared to the control group. Induction of  $\beta$ -CDNP<sub>s</sub> nanoparticles in the biosynthesis pathway of secondary metabolites results in plant productivity. Basil plant under the treatment of nano  $\beta$ -cyclodextrin, with concentration-dependent behavior increased yield per unit area. Therefore, foliar spray at the right concentration can act as an inducer while stimulating, preserving the active ingredients in basil and increase the content of essential oil for food and drug consumption.

**Key words:** Carbohydrate, Fluorescence, Nanoparticles, Photosynthetic efficiency,  $\beta$ -cyclodextrin.

1- Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran.

\*Corresponding Author: [sadatmandsara@gmail.com](mailto:sadatmandsara@gmail.com)