

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر شاخص‌های رشد و سیستم‌های دفاعی آنزیمی، نشت یونی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در گیاه دارویی ریحان رقم کشکنی لوئو (*Ocimum basilicum* L. c.v. keshkeni luvelou)

آزاده لونی^۱، سارا سعادت‌مند^{۱*}، حسین لاری یزدی^۲، علیرضا ایرانبخش^۱

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بروجرد، دانشگاه آزاداسلامی، بروجرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۸

چکیده

ورود فناوری نانو به حوزه گیاهان دارویی، صنعت کشاورزی و صنایع غذایی متضمن افزایش میزان تولیدات و کیفیت آن‌ها، در کنار حفظ محیط‌زیست و منابع کره‌ی زمین می‌باشد. خصوصیات مواد با تغییر اندازه آن‌ها به سمت نانو تغییر می‌کند. نانوذرات بتاسیکلودکسترین به عنوان یک استراتژی جدید محافظت از گیاه توصیف می‌شود و واکنش دفاعی گیاه را القاء می‌کند. به همین منظور مطالعه اثر نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر روی شاخص‌های فیزیولوژیکی و فعالیت‌های بیوشیمیایی، در رقم کشکنی لوئو^۱ ریحان، آزمایشی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در چهار سطح ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر در گلخانه اجرا شد. نتایج نشان داد شاخص‌های مختلف رشد از جمله طول و قطر ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و سطح برگ نسبت به شاهد در سطح احتمال ۵ درصد افزایش معنی‌دار یافت. بیشترین افزایش در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتازو کاتالازو پراکسیدازو میزان مالون‌دی‌آلدئید و نشت یونی ریشه و برگ نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار یافت. شاخص پایداری غشاء از طریق اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت برگ و ریشه ارزیابی شد. کاهش معنی‌دار نشت یونی و مالون‌دی‌آلدئید ریشه و برگ در تیمار ۵۰ میلی‌گرم برلیتر از نانوبتاسیکلودکسترین مشاهده شد که نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌ها بود. ورود نانوذرات بتاسیکلودکسترین به حوزه‌ی کشاورزی می‌تواند دامنه کنترل شیمیایی و اختلال در اعمال فیزیولوژی محیطی را به حداقل برساند. روند تغییرات پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی در مطالعه حاضر، شاخص‌های نسبتاً مطمئن جهت معرفی بهترین غلظت از نانوبتاسیکلودکسترین برای گیاه دارویی ریحان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Ocimum basilicum*، آنزیم، بتاسیکلودکسترین، نانوذرات، نشت یونی.

مقدمه

می‌باشد (Javanmardi, Khalighi, Kashi, Bais and

1997; Omidbaigi, 2002; Vivanco, 2002). این گیاه به‌طور

گسترده‌ای در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری

جهان پراکنده شده است (Simon, Quinn, Murray

and others, 1990). ریحان منبع ترکیبات حلقوی و

ریحان یک گیاه مهم دارویی از خانواده نعنائیان

Lamiaceae که نام علمی آن *Ocimum basilicum* L.

*نویسنده مسئول: s_saadatmand@yahoo.com

نشاسته و ترکیبات مربوط به آن (از سیب زمینی، ذرت، برنج و سایر منابع) در مقیاس صنعتی و با خلوص بالا تولید می‌شوند و توسط پیوندهای گلیکوزیدی ۱-۴ مرتبط هستند (Annamalai et al., 2018). یک ساختار مخروطی شکل با یک حفره آبگریز را ایجاد می‌کند و این فضا اجازه می‌دهد که انواعی از ترکیبات مختلف در آن قرار بگیرند. سمیت کم و ایمن این مولکول‌ها، کاربرد آن را در زمینه‌های مختلف کشاورزی، دارویی و غیره بسیار بالا برده است (Almagro and Pedreño, 2020). با بهره بردن از فناوری نانو در فرآیند تولید گیاهان دارویی، هزینه‌های تولید، مصرف انرژی و روند تخریب محیط زیست به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. این فناوری می‌تواند راه‌هایی برای بالا بردن ارزش محصولات کشاورزی و رفع مشکلات محیطی ارائه دهد. نانوفناوری، درک و کنترل ماده در ابعاد تقریبی ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است (Pisoschi et al., 2018). محرک زیستی نانوذرات بتاسیکلودکسترین (β -CDNPs)، در تحلیل مسیرها و شبکه‌های زیستی کارایی قابل توجهی دارد. یکی از روش‌های موثر برای حفظ محصول کشاورزی، القای مقاومت گیاه بوسیله فعال نمودن سیستم دفاعی‌اش توسط الیستورهای است که با محیط زیست، سازگار و بی‌خطر باشند. با توجه به محبوبیت گیاه ریحان در میان مردم، تقاضا برای این گیاه روز به روز افزایش می‌یابد.

تحقیقات نشان می‌دهد محرک‌ها، سیستم ایمنی گیاه را با واسطه تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز منجر به افزایش تولید ترپنوئیدها و آلکالوئیدهای با ارزش دارویی در گیاهان می‌کند (Montiel, Zarei, Körbes and Memelink, 2011). نفوذپذیری غشاء تحت تاثیر الیستوری قرار می‌گیرد به عنوان مثال افزایش قدرت

اسانس است که دافع حشرات بوده و عملکرد ضدانگلی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیداتی دارد (Javanmardi et al., 2002; Labra et al., 2004; Omidbaigi, 1997; Omidbaigi, Hassani and Sefidkon, 2003).

گیاه ریحان جزء پر مصرف‌ترین سبزیجات، خیلی سریع دچار عفونت قارچی شده، در نتیجه موجب کاهش عملکرد کیفی و کمی آن می‌شود. از این رو بدست آوردن محصولی با عملکرد کیفی بالا در سیستم کشاورزی پایدار بسیار حائز اهمیت می‌باشد. عوامل محیطی و بستر رشد، نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت اسانس و ترکیبات مؤثره ریحان و افزایش مقاومت آن در برابر بیماری‌های گیاهی دارند. به همین منظور، در پژوهش حاضر تکنیکی ارائه شده است تا گیاه دارویی ریحان از تأثیر عوامل فیزیوشیمیایی محیطی مصون بماند. استفاده از این روش ضمن جلوگیری از هدر رفتن ترکیبات فرار و حساس به شرایط محیطی، ریحان مقاوم و با کیفیتی را تولید می‌کند و ترکیبات فرار آن تحت شرایط کنترل شده‌ای رها می‌شود. طوری که ترکیبات فعال حساس مانند ویتامین‌ها، ترکیبات طعم و بو، عصاره گیاهی، اسانس‌ها و... به شکل پایدار تبدیل می‌شوند.

در سال‌های اخیر تعدادی از ترکیبات طبیعی کشف شده است که خواص ارزشمندی برای اهداف کشاورزی دارند. چنین ترکیباتی ممکن است فعالیت ضد میکروبی یا حشره‌کشی هم داشته باشند و ممکن است مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی ایجاد کنند یا رشد گیاه را افزایش دهند. یکی از این ترکیبات طبیعی، الیستور زیستی بتاسیکلودکسترین می‌باشد. سیکلودکسترین (CD) ها که گاهی آن‌ها را دکسترین‌های شاردینگر سیکلوآمیروز یا سیکلوگلوکان نیز می‌خوانند مجموعه‌ای از الیگوساکاریدها هستند که توسط فرآیند آمیلاز باکتری باسیلوس ماکران روی

ضروری است. به همین منظور، در راستای این اهداف، تحقیق حاضر بر روی شاخص‌های رشد و سیستم‌های دفاعی آنزیمی، نشت یونی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در برگ و ریشه رقم کشکنی لؤلؤ 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 سه تیمار اجرا شد. گیاه مورد استفاده در این تحقیق متعلق به جنس *Ocimum basilicum* L. رقم کشکنی لؤلؤ از مرکز تحقیقات کشاورزی ارومیه تهیه گردید. بعد از ضد عفونی کردن بذرها با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد 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 سانتی متری خاک گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۸ سانتی متر و ارتفاع ۱۵ سانتی متر، کاشته شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها قبل از اجرای آزمایش بررسی و در جدول (۱) آمده است. بعد از سبز شدن گیاه و قبل از اعمال تیمار مرحله دوم، عمل تنک کردن گلدان‌ها انجام شد و برای هر تیمار در هر گلدان ۴ گیاه گذاشته شد و سایر گیاهان حذف شد.

یونی بالا و تغییر pH از تغییرات اساسی در نفوذپذیری غشاء محسوب می‌شوند (Cai, Kastell, Knorr and Smetanska, 2012). سمیت سلولی احتمالی ناشی از نانوذرات از طریق تولید مقادیر بیش از حد ROSها نشان داده می‌شود. غلظت نامتناسب و بالای نانوذرات، باعث آسیب به غشاء سلول و مواد هسته‌ای می‌شود (Anjum, Anjum, Hano and Kousar, 2019).

تکنیک کارآمد محلول پاشی غلظت موثر از الیستور زیستی بکار برده شده در مطالعه حاضر، با توجه به قیمت پایین و غیر سمی بودن نوع الیستور، برای افزایش مواد موثره و ارتقا کیفیت محصول در کشت وسیع روش سودمندی می‌باشد. اهمیت این تحقیق علاوه بر اینکه نخستین گزارش در ارتباط با اثرات این الیستور بر روی فعالیت‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی *O. basilicum* می‌باشد، همچنین در نوع نانوذره بکاربرده شده است، که موجب افزایش تولید مواد موثره دارویی این گیاه می‌شود. براساس مطالعاتی که انجام شد، سابقه‌ای از محلول پاشی نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر روی ریحان و هیچ گیاه دیگری گزارش نشده بود. با توجه به گرایش جهانی تولید تکثیر گیاهان دارویی در سیستم‌های کشاورزی پایدار، انجام پژوهش‌هایی مبتنی بر الیگوساکارید طبیعی β -CD به شکل نانو و اثر آن بر گیاهان با هدف بهبود تولید ترکیبات موثره و افزایش عملکرد کیفی،

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	اسیدیته pH	نیترژن فسفر پتاسیم	آهن	روی	منگنز	سیلت	رس	شن
(میلی‌گرم / لیتر ppm)							درصد (%)	بافت خاک
۱/۷	۶/۹	۱۳	۱۸۷	۲/۳	۴/۹	۳/۲	۳۰	۴۴
		۶/۲						لومی‌شنی

به‌عنوان کنترل در سه مرحله‌ی پیش‌تیمار، دوبرگی و مرحله ۸ تا ۱۰ برگی (مدت زمان رشد تا این مرحله ۸ هفته بود) به صورت اسپری کردن روی بخش هوایی

الیستور زیستی مورد استفاده شامل نانوذرات بتاسیکلودکسترین در سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (ppm) و غلظت صفر (آب مقطر)

لیتر β -CDNPs و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

تهیه محلول برای آنالیز فیتوشیمیایی: تهیه محلول عصاره‌گیری: مخلوط ۱/۲ گرم تریس، ۰/۱ گرم اسیدآسکوربیک، ۱۷/۲ گرم ساکارز، ۰/۱ گرم سیستین کلراید و ۲۶/۸ میلی‌لیتر اسید کلریدریک و ۰/۲ نرمال را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر با $\text{pH}=7/5$ تهیه و در یخچال نگهداری گردید.

استخراج عصاره آنزیمی: یک گرم از بافت تر گیاهی (برگ یا ریشه هر کدام جداگانه) را با ۵ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری سائیده شد. سپس مخلوط با قدرت ۱۰۰۰۰ g سانتیفیوژ شد. پس از آن، محلول رویی در دمای ۴ درجه نگهداری گردید.

آنالیز فیتوشیمیایی گیاه ریحان تحت تیمار با نانوذرات بتاسیکلودکسترین

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، ۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار ($\text{pH}=4/8$) و ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه سه درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین، ۰/۰۲ مولار اضافه شد و بلافاصله در دستگاه طیف سنج نوری با طول موج ۵۳۰ نانومتر میزان جذب آن ثبت گردید (Koroi, 1989).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: ۲/۵ میلی‌لیتر تامپون فسفات با $\text{pH}=7$ را با ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه سه درصد، به همراه ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول عصاره گیاهی با هم مخلوط گردید و در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu مدل UV-1200) در طول موج ۵۳۰ نانومتر، میزان جذب آن ثبت گردید (Chance, 1995).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار $\text{pH}=7/8$ ، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیموم کلراید ۷۵ میکرومولار،

و برگ‌های ریحان در گلدان‌های انتقال داده شده به گلخانه کنترل شده با شرایط محیطی یکسان و دمای روز و شب، به ترتیب در محدوده 25 ± 2 و 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد 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.

سنتز و بررسی مشخصات نانو ذرات بتاسیکلودکسترین: نانوذرات بتا سیکلودکسترین (β -CDNPs)، به روش (Li et al., 2016) تهیه شد. محلول ساخته شده در دمای ۴۵ درجه آون خشک و برای مطالعه ذخیره شد. مورفولوژی و اندازه نانوذرات سنتز شده توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل (SEM FEI Quanta 200) با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۵ کیلووات و عبوری (TEM) مدل (Philips EM 208S 100KV) ساخت کشور هلند و وضوح ۰/۲nm بررسی گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: جهت بررسی شاخص‌های رشد گیاه، بخش‌های زیرزمینی گیاهان با آب مقطر شستشو داده شد و سپس با کاغذ صافی خشک گردید و به سرعت توزین وزن تر ریشه و اندام هوایی با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ بر حسب گرم و طول ریشه و ساقه بر حسب سانتی‌متر و قطر ریشه و ساقه با کولیس بر حسب میلی‌متر و سطح برگ‌ها بر حسب سانتی‌متر مربع انجام شد (Celikel and Reid, 2002). در نهایت برای اندازه‌گیری دقیق‌تر از نرم‌افزار Digimizer استفاده شد.

همچنین گیاهان یکنواخت از نظر اندازه انتخاب شدند و جهت بررسی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و میزان نشت یونی و مقدار پراکسیداسیون لیپیدی غشاء برگ و ریشه در چهار غلظت ۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر

اتیلن دی‌آمین تترااستیک ۰/۱ میلی‌مولار، ریوفلاوین ۳۶۰ میکرومولار و ۳۰ میکرولیتری عصاره خام بود. بعد از اینکه مخلوط به هم زده شد. سل‌های اسپکتوفتومتر (Shimadzu مدل UV-1200) (به مدت ۱۰ دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵w به فاصله ۳۵ سانتی متر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید گردد (Dhindsa, Plumb, Dhindsa and Thorpe, 1981).

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید (MAD): ۰/۲ گرم از بافت گیاه (برگ و ریشه) در ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد تری‌کلرواستیک اسید همگن درهاون چینی سائیده شد. سپس هموژن به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. سپس در آب یخ سرد شد. بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول حاصل با استفاده از اسپکتوفتومتر (Shimadzu مدل UV-1200) (در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید (Katsuhara, Otsuka and Ezaki, 2005).

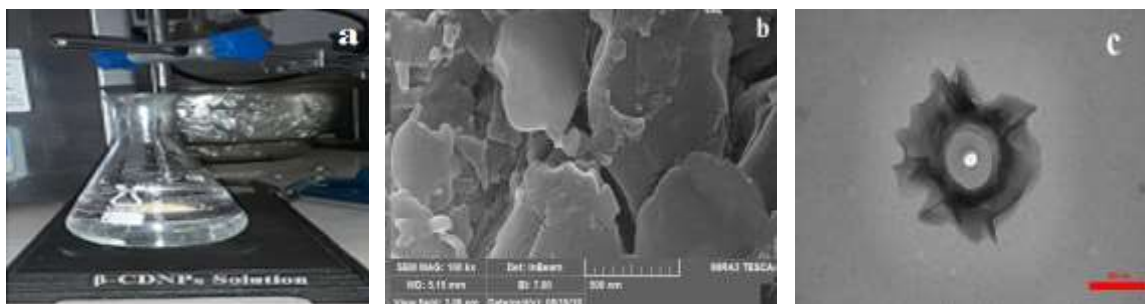
اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها: ۰/۲ گرم از نمونه برگ بعد از سه بار شستشو با آب مقطر خرد شدند و درون لوله‌های آزمایش قرار گرفتند و به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از اتمام این مرحله، میزان هدایت الکتریکی (EC₁) محلول اندازه‌گیری می‌شود. سپس نمونه‌ها در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بعد از رسیدن دمای نمونه به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هدایت الکتریکی ثانویه (EC₂) اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان نشت الکترولیت‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه می‌گردد (Ben Dkhil, Denden and others, 2012).

$$\%REL = (EC_1/EC_2) \times 100 \quad (\text{معادله ۱})$$

داده‌های حاصل با استفاده از آنالیز واریانس دو سویه (ANOVA) توسط نرم‌افزار SPSS ver. 22 و Graphpad 7 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد ($P \leq 5\%$) انجام شد.

نتایج

تصاویر SEM و TEM، بیانگر سنتز محلول نانوذرات β -CD می‌باشد. متوسط اندازه نانوذرات دوحفره‌ای مخروطی شکل ۸۰ نانومتر است. β -CDNP_s به صورت ساختار ورقه‌ای و بلوری و اندازه متوسط ضخامت لایه‌ها ۴۵ نانومتر در تصویر SEM مشاهده می‌شود (شکل ۱: تصاویر a, b, c).



شکل ۱: محلول نانوذرات بتاسیکلودکسترین (a)، تصویر نانوذرات بتاسیکلودکسترین به ترتیب با میکروسکوپ الکترونی SEM (b) و TEM (c).

تغییرات رشد و نمو گیاه ریحان: نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر پارامترهای مورد مطالعه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بر اساس میانگین داده‌ها طول و قطر ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی تحت تیمارهای مختلف β -CDNP_s در رقم کشکنی لوء لوء به‌طور معنی‌دار (P≤5%) در غلظت ۵۰ ppm و دو سطح ۱۰۰ ppm و ۱۰ در مقایسه با شاهد بیشتر بود (جدول ۳). سطح برگ به‌طور معنی‌داری (P≤5%)، در تیمار ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافته است. کاهش معنی‌دار (P≤5%) شاخص‌های مذکور، در غلظت ۱۰۰ ppm نسبت به سایر تیمارها و کنترل مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۲: تجزیه واریانس پارامترهای رشد گیاه ریحان رقم کشکنی لوء لوء تحت تاثیر نانوذرات بتاسیکلودکسترین

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه (سانتی‌متر)	طول ساقه (سانتی‌متر)	قطر ریشه (میلی‌متر)	قطر ساقه (میلی‌متر)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	سطح برگ (سانتی‌متر مربع)
نانوذرات بتاسیکلودکسترین	۳	۲۷/۰۴**	۲۹/۲۷**	۱/۰۶۸**	۲/۰۶۲**	۱۴۲/۵**	۰/۱۹۷**	۲/۷۷۳**	۰/۱۹۰**	۱۳/۵۰**
تکرار	۱۲	۰/۰۱۷	۰/۰۱۶	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	۰/۱۲۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۳	۱/۵۰۴
کل	۱۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NS: عدم اختلاف معنی‌دار * : معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ** : معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳: اثرات نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر فاکتورهای رشد ریحان رقم کشکنی لوء لوء

شاخص‌های رشد	مقایسه میانگین نانوذرات بتاسیکلودکسترین (میلی‌گرم بر لیتر)			
	۱۰۰	۵۰	۱۰	۰
طول ریشه (سانتی‌متر)	۳,۰۰±۰,۰۱d	۹,۲۷±۰,۲۵a	۶,۶۰±۰,۰۳b	۵,۵±۰,۰۱c
طول ساقه (سانتی‌متر)	۱۴,۶۱±۰,۱۰d	۲۰,۴۲±۰,۰۸a	۱۶,۰۳±۰,۰۵c	۱۹,۲۰±۰,۲۲b
قطر ریشه (میلی‌متر)	۰,۱۰±۰,۰۳۲۱b	۳,۷۹±۱,۰۵a	۲,۷۹±۰,۰۴c	۲,۶۳±۰,۳۶d
قطر ساقه (میلی‌متر)	۰,۱۱±۰,۰۳۴۷b	۰,۰۲±۰,۰۱۵a	۰,۰۱±۰,۰۲۸۶c	۰,۰۲±۰,۰۵۲d
وزن تر ریشه (گرم)	۰,۱۴±۰,۰۱۷c	۰,۳۱±۰,۰۱۸a	۰,۲۴±۰,۰۲۰b	۰,۲۴±۰,۰۲۵b
وزن تر اندام هوایی (گرم)	۲,۴۹±۰,۴۰d	۵,۵۹±۰,۲۱a	۴,۷۷±۰,۲۸b	۴,۰۹±۰,۳۳c
وزن خشک ریشه (گرم)	۰,۰۰۹±۰,۰۸۶d	۰,۰۲±۰,۰۲۵a	۰,۰۱۹±۰,۰۱۸b	۰,۰۱±۰,۰۱۵c
وزن خشک اندام هوایی (گرم)	۰,۰۳±۱,۰۷c	۰,۰۳±۰,۰۱۱a	۰,۰۵±۰,۰۱۲b	۰,۰۴±۰,۰۱۷b
سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	۰,۸۴±۰,۰۳۶۱b	۱,۳۸±۰,۰۷۲۵a	۱,۰۳±۰,۰۷۶۹a	۱,۵۳±۰,۰۸۰a

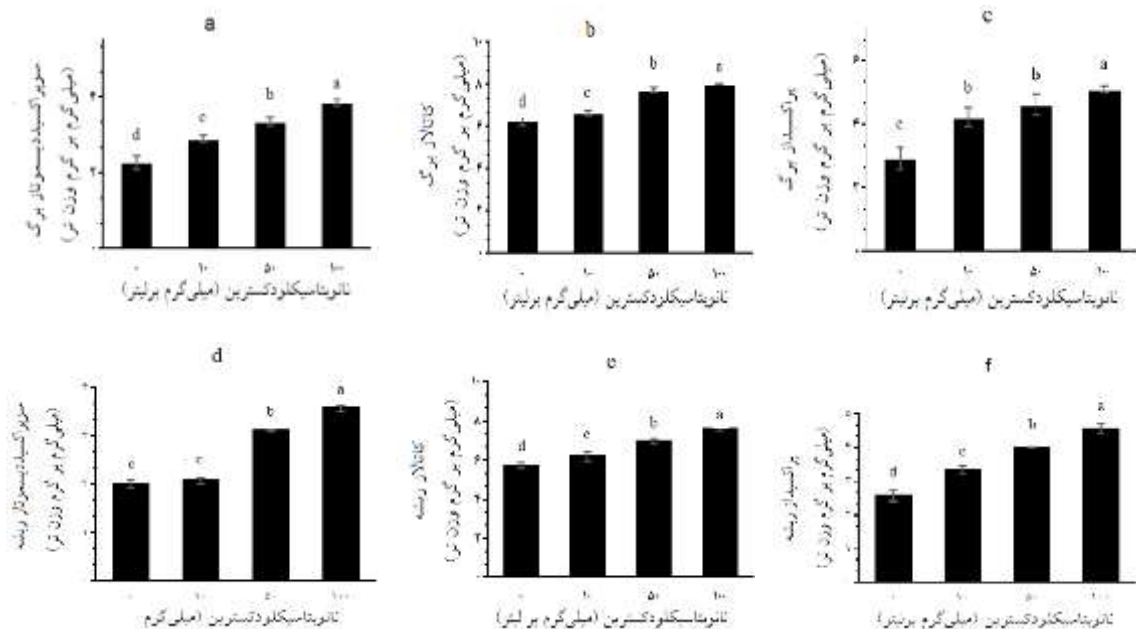
نشد (شکل ۲d). میزان فعالیت هرسه آنزیم در هر دو بخش رویشی تحت شرایط کنترل کمتر از همه بود. روند تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه و برگ ریحان نسبت به کنترل شدید نبود (شکل ۲b,e). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۵۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات بتاسیکلودکسترین از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ وجود نداشت (شکل ۲c).

تغییرات فعالیت‌های بیوشیمیایی: بررسی‌ها نشان داد که اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و پراکسیداز هر دو اندام برگ و ریشه در سطح ۵ درصد ($P \leq 5\%$) معنی‌دار بود (جدول ۴). ماکزیمم فعالیت هر سه آنزیم در برگ و ریشه در تیمار ۱۰۰ ppm بود. دو سطح شاهد و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در ریشه از نظر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در یک گروه آماری قرار گرفتند و تفاوت معنی‌دار بین آنها مشاهده

جدول ۴: تجزیه واریانس فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه ریحان رقم کشکنی لو'لو تحت تاثیر نانوذرات بتاسیکلودکسترین

منابع تغییرات	درجه آزادی	سوپراکسید دیسموتاز (میلی‌گرم / گرم وزن تر)		کاتالاز (میلی‌گرم / گرم وزن تر)		پراکسیداز (میلی‌گرم / گرم وزن تر)		نشت یونی (درصد)		مالون دی آلدئید (میلی‌مول / گرم ون تر)	
		برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه
نانو بتاسیکلو دکسترین	۳	۱/۸۲۲**	۱/۹۴۹**	۲/۸۱۳**	۲/۷۹۴**	۳/۴۹۴**	۲/۹۶۷**	۷۱۸/۰۳**	۳۹۰/۰۴**	۰/۵۸۱۷**	۰/۳۲۴۴**
تکرار	۱۲	۰/۰۱۷	۰/۰۲۴	۰/۰۲۳	۰/۰۲۶	۰/۰۱۸	۰/۰۱۷	۳/۱۲	۳/۷۷	۰/۰۲۱	۰/۰۰۳
کل	۱۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

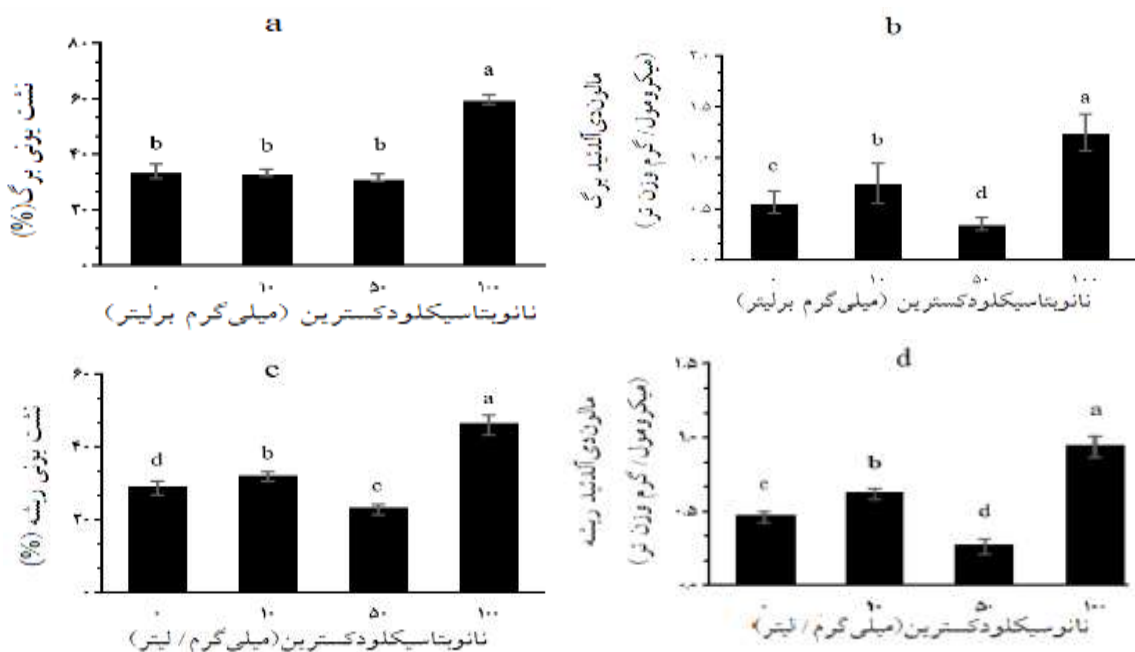
ns: عدم اختلاف معنی‌دار * : معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ** : معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد



شکل ۲: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های ریحان رقم کشکنی لو'لو در سطوح مختلف β-CDNPs: سوپراکسید دیسموتاز (SOD) برگ و ریشه، کاتالاز (CAT) برگ و ریشه، پراکسیداز (POD) برگ و ریشه. (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 5\%$) و خطای استاندارد (Mean±SEM) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ۵ درصد ($P \leq 5\%$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

تخریب غشاء در هر دو اندام رویشی به ترتیب در غلظت ۱۰۰ و ۵۰ ppm مشاهده شد (شکل ۳a,c). روند تغییرات میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید برگ و ریشه در تیمارهای مختلف β -CDNPs نسبت به کنترل معنی‌دار ($P \leq 5\%$) بود (جدول ۴). طوری که حداقل و حداکثر میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در برگ و ریشه به ترتیب در (۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) مشاهده شد (شکل ۳b,d).

نانوذرات بتاسیکلودکستین منجر به افزایش میزان نشت یونی برگ و ریشه در غلظت (۱۰۰ پی‌پی‌ام) نسبت به گروه شاهد و دو سطح (۱۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام) شده که از نظر آماری این افزایش در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). روند تغییرات معنی‌دار برگ بین دو تیمار ۵۰ و ۱۰ و کنترل مشاهده نشد. اما در ریشه تمامی سطوح نسبت به شاهد معنی‌دار ($P \leq 5\%$) بود. بیشترین و کمترین میزان



شکل ۳: مقایسه میانگین تغییرات (a,c) میزان نشت یونی (REL) برگ و ریشه و (b,d) غلظت مالون دی آلدئید (MAD) برگ و ریشه ریحان رقم کشکنی لولو در سطوح مختلف β -CDNPs (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 5\%$) و خطای استاندارد (Mean \pm SEM) می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار در یک زمان برداشت از نظر آماری در سطح ($P \leq 5\%$) تفاوت معنی‌دار ندارند.

سریع‌تری از خود نشان می‌دهند (Mphahlele, Onyango and Mhlanga, 2015). تصویر TEM، در تایید سنتز نانوذرات β -CD به اندازه ۸۰ نانومتر، ایجاد ساختار مخروطی شکل با یک حفره آگریز و لایه بیرونی آب‌دوست، تشکیل کمپلکس درون‌گیر مهمان-میزبان با مولکول‌های آلی گیاه را می‌دهد. این ارتباط بین سلول‌های گیاهی با نانوذرات منجر به

بحث

توسعه نانو مواد می‌تواند برنامه‌های کاربردی جدیدی را در بیوتکنولوژی گیاهی و کشاورزی فراهم نماید (Scrinis and Lyons, 2007). سرعت سریع جذب به اندازه ذرات نسبت داده شده است که با تغییر اندازه ذرات، مسیر انتشار نیز تغییر می‌کند. ذرات کوچک، به دلیل کاهش سرعت، سینتیک جذب

همچنین دلیل دیگر بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی و ارتقا پارامترهای رشد گیاه ریحان احتمالاً کمپلکس شدن اتیلن به عنوان مولکول مهمان با نانوذرات بتاسیکلودکسترین است که موجب تاخیر در آزاد سازی آن می‌گردد. به سبب کمپلکس شدن با مولکول مهمان، ضمن افزایش پایداری و رهایش کنترل شده باعث کاهش تصعید و فراریت اتیلن گردید. تا کنون مطالعاتی مبنی بر اثر تیمارهای مختلف نانوذرات بتاسیکلودکسترین بر روی گیاهان گزارش نشده است. یافته‌ها برای اولین بار بر روی ریحان بیان شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز برگ ریحان در تمام غلظت‌های نانوذرات بتاسیکلودکسترین (۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ ppm) نسبت به شاهد بیشتر بود. روند تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور در ریشه مشابه برگ بود. حداکثر میزان فعالیت آنزیم‌ها در ریشه و برگ در غلظت ۱۰۰ ppm از β -CDNPs مشاهده گردید. آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نقش مهمی در غیر فعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاهی دارند (Israr and Sahi, 2006). کلروپلاست و میتوکندری دو محل عمده حضور چرخه‌های انتقال الکترون در سلول‌های گیاهی می‌باشند همواره در معرض خطر تولید گونه‌های فعال اکسیژن قرار دارند. حضور گونه‌های فعال اکسیژن در محیط سلولی، سبب تخریب غشاءهای سلولی، ماکرومولکول‌های عمده سلولی نظیر DNA، RNA و آنزیم‌های حیاتی می‌باشد (Ashraf and Ali, 2008). آنزیم SOD اولین خط دفاعی را بر علیه رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول تشکیل می‌دهد (Alscher, Erturk and Heath, 2002). رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کند. پراکسید هیدروژن حاصل در مرحله بعدی بوسیله

تغییر مسیرهای بیولوژیکی مرتبط می‌شود که در نهایت، در رشد و نمو گیاهی تاثیر می‌گذارد. مورفولوژی ورقه‌های β -CDNPs در تصویر SEM، مشاهده شد که با مطالعات (Swaminathan et al., 2013). مطابقت دارد. شاخص‌های مهم و غیرقابل انتظار نانوذرات تا حدود زیادی در نتیجه ویژگی‌های سطحی مواد است که به جای خصوصیات توده‌ای مواد غالب شده است با افزایش نسبت اتم‌ها در سطح، انرژی آزاد نانوذرات بالا می‌رود و باعث تغییرات زیادی در خواص مواد می‌شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، با افزایش غلظت نانوذرات بتاسیکلودکسترین تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، طول، قطر، وزن تر و وزن خشک ریشه و ساقه و سطح برگ نسبت به شاهد و دو سطح ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشتر بود. بنابراین می‌توان اظهار داشت تغییر در ویژگی‌های رویشی وابسته به غلظت نانوذرات بتاسیکلودکسترین می‌باشد. محققین مطالعاتی مبتنی بر عقب ماندگی رشد تحت تاثیر بتاسیکلودکسترین بر روی غلات انجام داده بودند، که این عقب ماندگی برگشت پذیر بود. طوریکه در ۶ روز ابتدایی رشد طول ریشه کوتاهتر بود اما تغییر شکل یافته و محتوای ماده خشک آنها به میزان قابل توجهی افزایش پیدا کرد (Szejtli, nee Erdosi and Tetenyi, 1981). تولید ماده خشک در گیاهان یکی از مهمترین عوامل تاثیر گذار بر عملکرد است و این صفت نشان‌دهنده‌ی پتانسیل گیاه در جذب نور و تبدیل انرژی نورانی به شیمیایی می‌باشد (Reynolds et al., 2009). β -CDNPs در غلظت موثر نقش مثبتی بر افزایش عملکرد کمی و کیفی ریحان داشت، که با حفظ آب در ساختار آن باعث افزایش سرعت رشد ریشه و بخش‌های هوایی شده است. افزایش فرآیند جذب آب می‌تواند افزایش طول، قطر، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌هوایی و سطح برگ را توجیه کند.

شده و در آسیب به بیومولکول‌ها مانند مولکول‌های سازنده غشای سلولی، افزایش پیدا می‌کند (Jaleel et al., 2007). افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیدانت باعث کاهش گونه‌های فعال اکسیژن شده و همچنین پتانسیل ردوکس سلول را افزایش می‌دهد (Akram, Athar and Ashraf, 2007). پراکسیداز مجموعه‌ای از آنزیم‌های چرخه آسکوربات-گلوتاتیون ردوکتاز هستند که قادرند با حذف آب اکسیژنه آن را به آب تبدیل کنند. بسیاری از محققین فعالیت این آنزیم‌ها را به عنوان یک عامل کلیدی جهت حفاظت گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی عنوان نموده‌اند (Meloni, Oliva, Martinez and Cambraia, 2003). افزایش فعالیت آنزیم‌های برگ و ریشه گیاه ریحان در سه سطح تیمار بکاربرده شده نسبت به کنترل معنی‌دار ($P \leq 5\%$) شد (جدول ۴). احتمالاً علت افزایش آنزیم‌ها را می‌توان به نقش حفاظتی نانوذرات بتاسیکلودکسترین با رهایش کنترل شده مولکول‌ها، افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه و جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد نسبت داد. β -CDNPs به عنوان محرک موجب القاء تنش زیستی می‌شود و گیاه از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی کنند. نانوبتاسیکلودکسترین با افزایش فعالیت آنزیم‌ها موجب کاهش غلظت رادیکال‌های آزاد شده است.

شاخص پایداری غشاء از طریق اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت برگ و ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت. در پژوهش حاضر کاهش نشت یونی برگ و ریشه ریحان در تیمار ۵۰ ppm β -CDNPs، نسبت به شاهد و دو سطح (۱۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) مشاهده شد (شکل ۳a,c). غشاء سلول وقتی پایداری خود را از دست بدهد، در صورت قرار گرفتن در محیط آبی مواد محلول از سلول‌های آن به بیرون تراوش می‌کند

آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز پاکسازی می‌شود (Zeid and Shedeed, 2006) که بیانگر تاثیر مثبت فعالیت آنزیم در گیاه ریحان است. ماهیت اصلی فرآیند محرک‌ها در ایجاد عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پاکسازی آن‌ها در سلول است (Kar and Kavdia, 2011). غلظت بالا و سمی رادیکال‌های فعال اکسیژن باعث آسیب شدید به ساختارهای پروتئینی، مهار فعالیت آنزیم‌های متعدد از مسیرهای متابولیک و در نتیجه اکسیداسیون ماکرومولکول‌هایی از جمله چربی‌ها و DNA می‌باشد. تشدید و تداوم این رخدادها نامطلوب ممکن است منجر به مرگ سلولی شود (Gill and Tuteja, 2010). افزایش بیشتر فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برگ و ریشه در بالاترین سطح تیمار از β -CDNPs، باعث کاهش اثرات مخرب گردید. همانطور که در نتایج ملاحظه شد با افزایش میزان غلظت، رادیکال‌های سوپراکسید، میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نیز افزایش یافت که با توجه به نقش آن در تعدیل رادیکال سوپراکسید، این افزایش توجیه‌پذیر است.

کاتالاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی است و به‌طور فراوان در بافت‌های مختلف وجود دارد و سلول‌ها را در مقابل اثرات مضر هیدروژن محافظت می‌کند (Akhtar et al., 2012). افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ در غلظت ۱۰۰ ppm β -CDNPs حاکی از آن است که تولید ROS داخل سلولی و استرس اکسیداتیو احتمالاً به عنوان مکانیسم اولیه در ایجاد سمیت سلولی در این غلظت می‌باشد. کاتالاز از مهمترین آنزیم‌های حذف‌کننده پراکسید هیدروژن است که کاهش آن باعث تجمع پراکسید هیدروژن در غلظت ۱۰ ppm می‌شود. گزارش شده است کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در چرخه کالوین که با کاهش نسبت H^+ و $NADP^+/NADPH$ در کلروپلاست همراه می‌باشد، سبب افزایش تولید فرم‌های فعال اکسیژن

لذا پایداری غشاء به وسیله تراوش یون‌ها از آن ارزیابی می‌شود (Sairam, Rao and Srivastava, 2002). کاهش معنی‌دار در غلظت 50 ppm بیانگر آسیب کمتر به غشاء می‌باشد. چربی‌های غشاء اولین هدف گونه‌های فعال اکسیژن هستند و پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشاء منجر به تولید مالون دی‌آلدئید (MDA) می‌شود که عموماً به عنوان یک نشانگر زیستی پراکسیداسیون چربی و شاخص مهمی از حساسیت به استرس در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lata, Jha, Dixit, Sreenivasulu and Prasad, 2011; Türkan, Bor, Özdemir and Koca, 2005). کاهش در تخریب پراکسیداسیون غشاء سلولی و تولید MDA با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بهبود می‌یابد. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد تیمار گیاه ریحان با غلظت بهینه از $\beta\text{-CDNPs}$ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داد و از تخریب غشاء سلول‌ها جلوگیری کرد. کاهش معنی‌دار در تیمار 50 ppm از $\beta\text{-CDNPs}$ نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌ها است. به نظر می‌رسد غلظت مناسب از $\beta\text{-CDNPs}$ با پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، از اکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری نموده و مانع افزایش مالون‌دی‌آلدئید می‌شود. فعالیت کمتر آنزیم‌ها از عوامل محدودکننده مکانیسم‌های دفاعی به شمار می‌رود که در نتیجه باعث وارد شدن خسارت به غشاء سلولی و افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید شده است. غلظت موثر از نانوذرات $\beta\text{-CDNPs}$ باعث کمتر شدن میزان پراکسیداسیون چربی‌ها و دارای ظرفیت بالاتری جهت حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد.

نتیجه‌گیری نهایی

ورود نانوذرات $\beta\text{-CD}$ به‌عنوان مواد فعال

بیولوژیکی، به حوزه‌ی کشاورزی می‌تواند دامنه کنترل شیمیایی و اختلال در اعمال فیزیولوژی محیطی ریحان را به حداقل برساند. غلظت 50 ppm از نانوذرات بتاسیکلودکسترین بیشترین تاثیر را بر روی رشد ریحان نشان داد. کاربرد نانوذرات $\beta\text{-CD}$ به دلیل کوچک بودن اندازه ذرات به راحتی توسط گیاهان قابل جذب هستند و به عنوان یک راهکار جدید مورد استفاده در کشت گیاهان معرفی می‌گردد و باعث بهبود رشد، افزایش عملکرد، کیفیت محصول و افزایش مقاومت گیاه می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، باعث تخریب کمتر غشاء سلولی (تولید مالون‌دی‌آلدئید) و نشت یونی در سطح 50 ppm از $\beta\text{-CDNPs}$ شد. که نشان دهنده تاثیر مثبت فعالیت این آنزیم بر کاهش اثر منفی رادیکال‌های آزاد اکسیژن بر سلامت غشاء‌های سلولی در ریحان است. نشت یونی شاخصی از خسارت به غشاء محسوب می‌شود. ماهیت اصلی فرآیند محرک‌ها در ایجاد عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پاک‌سازی آن‌ها در سلول است. محرک زیستی $\beta\text{-CDNPs}$ یک استراتژی سازگار با محیط زیست است. مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیان‌کننده میزان حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد ارزیابی رشد گیاه، غلظت مالون‌دی‌آلدئید، میزان نشت یونی و بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز برگ و ریشه شاخص‌های نسبتاً مطمئن جهت معرفی و بکارگیری بهترین غلظت از $\beta\text{-CDNPs}$ ، به‌عنوان اولین گزارش برای گیاه دارویی ریحان باشد.

References

- Akhtar, M.J., Ahamed, M., Kumar, S., Khan, M.A.M., Ahmad, J. and Alrokayan, S.A. (2012).** Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 845.
- Akram, M. S., Athar, H. R. and Ashraf, M. (2007).** Improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by foliar application of potassium hydroxide (KOH) under salt stress. *Pak. J. Bot.* 39(3): 769-776.
- Almagro, L. and Pedreño, M.Á. (2020).** Use of cyclodextrins to improve the production of plant bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews*, 1-20.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. (2002).** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. 53(372): 1331-1341.
- Anjum, S., Anjum, I., Hano, C. and Kousar, S. (2019).** Advances in nanomaterials as novel elicitors of pharmacologically active plant specialized metabolites: current status and future outlooks. *RSC Advances*. 9(69): 40404-40423.
- Annamalai, S., Santhanam, M., Selvaraj, S., Sundaram, M., Pandian, K. and Pazos, M. (2018).** "Green technology": Bio-stimulation by an electric field for textile reactive dye contaminated agricultural soil. *Science of the Total Environment*. 624: 1649-1657.
- Ashraf, M. and Ali, Q. (2008).** Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 63(1-3): 266-273.
- Ben Dkhil, B., Denden, M. and others. (2012).** Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membrane permeability and chlorophyll fluorescence of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*. 7(4): 174-183.
- Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D. and Smetanska, I. (2012).** Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*. 31(3): 461-477.
- Çelikel, F.G. and Reid, M.S. (2002).** Postharvest handling of stock (*Matthiola incana*). *HortScience*. 37(1): 144-147.
- Chance, B. (1995).** Spectrophotometric examination of tissue of small dimension. Google Patents.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T.A. (1981).** Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*. 32(1): 93-101.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(12): 909-930.
- Israr, M. and Sahi, S.V. (2006).** Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44(10): 590-595.
- Jaleel, C.A., Gopi, R., Sankar, B., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sridharan, R. and Panneerselvam, R. (2007).** Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. *South African Journal of Botany*. 73(2): 190-195.
- Kar, S. and Kavdia, M. (2011).** Modeling of biopterin-dependent pathways of eNOS for nitric oxide and superoxide production. *Free Radical Biology and Medicine*. 51(7): 1411-1427.
- Katsuhara, M., Otsuka, T. and Ezaki, B. (2005).** Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science*. 169(2): 369-373.
- Koroi, S.A.A. (1989).** Gelektrophers tissue and spectral photometris chon under change Zomeinflussdr temperature and structure Peroxidase isoenzyme. *Physiology Vegetation*. 20: 15-23.

- Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M. and Sala, F. (2004).** Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Science*. 167(4): 725–731.
- Lata, C., Jha, S., Dixit, V., Sreenivasulu, N. and Prasad, M. (2011).** Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars [*Setaria italica* (L.)]. *Protoplasma*. 248(4): 817–828.
- Li, Z., Li, H., Wang, C., Xu, J., Singh, V., Chen, D. and Zhang, J. (2016).** Sodium dodecyl sulfate/ β -cyclodextrin vesicles embedded in chitosan gel for insulin delivery with pH-selective release. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 6(4): 344–351.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, J. (2003).** Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 49(1): 69–76.
- Montiel, G., Zarei, A., Körbes, A.P. and Memelink, J. (2011).** The jasmonate-responsive element from the ORCA3 promoter from *Catharanthus roseus* is active in *Arabidopsis* and is controlled by the transcription factor AtMYC2. *Plant and Cell Physiology*. 52(3): 578–587.
- Mphahlele, K., Onyango, M.S. and Mhlanga, S.D. (2015).** Kinetics, equilibrium, and thermodynamics of the sorption of bisphenol a onto N-CNTs-[β]-cyclodextrin and FE/N-CNTs-[β]-cyclodextrin nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*. 2015.
- Omidbaigi, R. (1997).** Approaches to production and processing of medicinal plants, vol. 2. Tarrahan Nashr Public, Tehran. 14: 70–78.
- Omidbaigi, R., Hassani, A. and Sefidkon, F. (2003).** Essential oil content and composition of sweet basil (*Ocimum basilicum*) at different irrigation regimes. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 6(2): 104–108.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Cimpeanu, C., Turcu\cs, V., Predoi, G. and Iordache, F. (2018).** Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Reynolds, M., Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Berry, P., Parry, M. A. J., Snape, J. W. and Angus, W. J. (2009). Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 60(7): 1899–1918.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. (2002).** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163(5): 1037–1046.
- Scrinis, G. and Lyons, K. (2007).** The emerging nano-corporate paradigm: nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems. *International Journal of Sociology of Agriculture and Food*. 15(2): 22–44.
- Simon, J.E., Quinn, J., Murray, R.G. and others. (1990).** Basil: a source of essential oils. *Advances in New Crops*. 484–489.
- Szejtli, J., nee Erdosi, M. T. and Tetenyi, P. (1981).** Method for the control of germination of plant seeds and growth of the seedlings. Google Patents.
- Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H. (2005).** Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*. 168(1): 223–231.
- Zeid, I.M. and Shedeed, Z.A. (2006).** Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum*. 50(4): 635.