Vol 26, No. 1, Spring 2024

University of Tehran Press

Journal of Crops Improvement

Online ISSN: 2345-6957

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

# The Melatonin Effects on Biochemical Parameters and Antioxidant Defense System of the Basil Plant (*Ocimum basilicum* L.) under Copper and Zinc Toxicity

**Hakimeh Oloumi[1]✉ | Ali Zamani[2] | Hosein Mozaffari[3] | Soudabeh Nourzad[4]**

1. Corresponding Author, Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: h.oloumi@kgut.ac.ir
2. Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: alizamani65@gmail.com
3. Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: h.mozafari@kgut.ac.ir
4. Department of Agricultural Science, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, Iran. E-mail: soudabeh.nourzad@srbiau.ac.ir

**Article Info**

**Article type:**
Research Article

**Article history:**
Received 12 November 2022
Received in revised form
27 September 2023
Accepted 25 October 2023
Published online 13 March 2024

**Keywords:**
*Anthocyanin*
*Basil*
*Glutathione*
*Membrane stability index*

**ABSTRACT**

**Objective:** The present research was conducted with the aim of evaluating the effect of melatonin treatment on the tolerance of basil plants to the excess of copper and zinc mineral elements.

**Methods:** The effect of melatonin treatment (at two levels of 0 and 100 µM) on the tolerance of basil plants to the excess of copper (50 and 150 µM) and zinc (50 and 100 µM) mineral elements was evaluated using a factorial layout based on a completely randomized design with 3 replications under greenhouse conditions at the Graduate University of Advanced Technology of Kerman in 2017.

**Results:** The triple effect of melatonin, zinc, and copper and the double effect of melatonin and zinc on the relative water content of leaves, total chlorophyll, carotenoid, protein, soluble and reduced sugar, anthocyanin and flavonoid, as well as the double effect of melatonin and copper and of zinc and copper on the parameters of leaf relative water content, membrane stability index, total chlorophyll content, protein content and soluble and reducing sugar content, anthocyanin, flavonoid, total glutathione, and redox were significant at the 1% probability level. Membrane stability indices and relative water content of leaves were improved by applying melatonin to the basil plant separately and together with copper and zinc metals. The amount of reducing sugars, chlorophyll, and carotenoids decreased under the influence of zinc and copper toxicity, although the use of melatonin enhanced these parameters. Copper toxicity caused a greater increase in the synthesis of plant biochemical compounds compared to zinc, indicating the more significant negative effect of copper toxicity as compared to excess zinc.

**Conclusion:** Melatonin, through improving physiological characteristics—especially membrane stability, as well as flavonoid compounds, anthocyanin, and glutathione—led to the reduction of the negative effects of excessive amounts of copper and zinc on growth parameters, especially at the 50 µM metals concentration.

**Cite this article:** Oloumi, H., Zamani, A., Mozaffari, H., & Nourzad, S. (2024). The Melatonin Effects on Biochemical Parameters and Antioxidant Defense System of the Basil Plant (*Ocimum basilicum* L.) under Copper and Zinc Toxicity. *Journal of Crops Improvement*, 26 (1), 179-196.
DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2023.351060.2761

© The Authors.
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2023.351060.2761

دوره بیست و ششم، شماره اول، بهار ۱۴۰۳

انتشارات دانشگاه تهران

به زراعی کشاورزی

شاپا الکترونیکی: ۶۹۵۷-۲۳۴۵

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

# تأثیر ملاتونین بر پارامترهای بیوشیمیایی و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت سمیت مس و روی

حکیمه علومی[1]✉ | علی زمانی[2] | حسین مظفری[3] | سودابه نورزاد[4]

۱. نویسنده مسئول، گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: h.oloumi@kgut.ac.ir

۲. گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: alizamani65@gmail.com

۳. گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: h.mozafari@kgut.ac.ir

۴. گروه کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، ایران. رایانامه: soudabeh.nourzad@srbiau.ac.ir

## اطلاعات مقاله

**نوع مقاله:** مقالهٔ پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۸/۲۱
**تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۷/۰۵
**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۸/۰۳
**تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۱۲/۲۳

**کلیدواژه‌ها:**
*آنتوسیانین*
*ریحان*
*شاخص پایداری غشا*
*گلوتاتیون*

## چکیده

**هدف:** پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر تیمار ملاتونین در تحمل گیاه ریحان نسبت به بیش‌بود عناصر معدنی مس و روی انجام شد.

**روش پژوهش:** اثر تیمار ملاتونین (در دو سطح صفر و ۱۰۰ میکرومولار) در تحمل گیاه ریحان نسبت به بیش‌بود عناصر معدنی مس (۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار) و روی (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان در سال ۱۳۹۶ بررسی شد.

**یافته‌ها:** اثر سه‌گانه ملاتونین، روی، مس و اثر دوگانه ملاتونین و روی بر محتوای آب نسبی برگ، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پروتئین، قند محلول و احیاشده، آنتوسیانین و فلاونوئید و نیز اثرات دوگانه ملاتونین و مس و روی و مس در پارامترهای محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشا، میزان کلروفیل کل، میزان پروتئین و میزان قند محلول و احیا، آنتوسیانین، فلاونوئید، گلوتاتیون کل و اکسید و احیا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. شاخص‌های پایداری غشا و محتوای نسبی آب برگ با کاربرد ملاتونین در گیاه ریحان به‌صورت جداگانه و همزمان با فلزات مس و روی بهبود یافت. میزان قندهای احیای کلروفیل و کاروتنوئید تحت تأثیر سمیت روی و مس کاهش یافتند، اگرچه استفاده از ملاتونین موجب افزایش آن‌ها گردید. سمیت مس، بیش از روی موجب افزایش سنتز ترکیبات بیوشیمیایی گیاه شد که گویای اثر منفی بیش‌تر سمیت مس نسبت به روی مازاد بود.

**نتیجه‌گیری:** ملاتونین با بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی به‌ویژه پایداری غشا و هم‌چنین ترکیبات فلاونوئیدی، آنتوسیانین و گلوتاتیون منجر به کاهش اثرات منفی ناشی از بیش‌بود مقادیر مس و روی به‌ویژه در غلظت ۵۰ میکرومولار این دو فلز بر پارامترهای رشدی شد.

**استناد:** علومی، حکیمه؛ زمانی، علی؛ مظفری، حسین و نورزاد، سودابه (۱۴۰۳). تأثیر ملاتونین بر پارامترهای بیوشیمیایی و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت سمیت مس و روی. *به‌زراعی کشاورزی*، ۲۶ (۱)، ۱۷۹-۱۹۶.

DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2023.351060.2761

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

## ۱. مقدمه

ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* گیاهی یک‌ساله و علفی از خانواده نعناییان است که اندام قابل استفاده آن برگ‌ها، سرشاخه‌های گلدار و بذر است (سستیلی[1] و همکاران، ۲۰۱۸). گیاهان برای فرایندهای رشدونموی و متابولیسمی خود نیازمند عناصر غذایی می‌باشند و کمبود عناصر میکرو و ماکرو در خاک موجب کاهش رشد گیاه می‌شود. با این‌حال، حضور غلظت‌های بالاتر عناصر در محیط رشد گیاه می‌تواند موجب مسمومیت شده و بر رشد گیاه تأثیر منفی بگذارد. مقدار فلزات سنگین در خاک به‌طور طبیعی کم است، اما در انواع خاصی از خاک‌ها که از فرسایش سنگ‌های آلوده به فلزات سنگین حاصل شده‌اند، مقادیر زیادی از این عناصر در خاک وجود دارد و موجب مسمومیت می‌شود (حاجی‌بلند[2] و بنیادی[3]، ۲۰۰۷). پژوهش‌ها نشان داده که تغذیه بهینه عناصر کم‌مصرف نقش مهمی در تشکیل ترکیبات شیمیایی فعال موجود در گیاهان دارد. مس و روی عناصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان هستند که در غلظت‌های پایین رشد گیاه را افزایش داده اما در غلظت‌های بالا برای گیاه سمی است (شِنگ[4]، ۲۰۰۷).

## ۲. پیشینه پژوهش

یکی از نشانه‌های سمیت در گیاهان، برهم‌خوردن تعادل تغذیه گیاهی است. غلظت عناصر $Ca^{2+}$ و $Mn^{2+}$ در اندام‌های هوایی با افزایش غلظت Cu در محلول غذایی کاهش می‌یابد (که[5] و همکاران، ۲۰۰۷). مس به‌طور بالقوه در سطوح بالاتر از حد بهینه عامل بروز سمیت است، زیرا توانایی ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن را دارد. بنابراین ممکن است که پایداری غشا، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی را در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن تغییر دهد (هاکیسِفکی[6] و بابا[7]، ۲۰۱۸). در بررسی اثر مس بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی a و b گزارش شده که در تیمار ۱۰۰ میکرومولار سولفات‌مس محتوای کلروفیل a و b کاهش می‌یابد (انصاری[8] و همکاران، ۲۰۰۴). فلز روی در مقدار کم به‌عنوان ریزمغذی ضروری برای گیاهان محسوب می‌شود. درحالی‌که مقدار اضافی آن در خاک موجب اختلالات متابولیکی و در نهایت بازدارندگی رشد در بیش‌تر گونه‌های گیاهی می‌شود (لین[9] و همکاران، ۲۰۱۲). هنگامی‌که فلز روی در خاک و در نهایت در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابد، با توجه به گونه گیاهی موجب اختلال در برخی فرایندهای متابولیکی گیاه می‌شود. با وجود نقش حیاتی روی در ساختار و راه‌اندازی بسیاری از فرایندهای متابولیکی گیاه، تجمع بالای این فلز در سیتوزول سلول‌ها از طریق اختلال در عملکرد طبیعی سلول‌ها و مهار فرایند تنفس و واکنش‌های انرژی‌خواه مرتبط با رشد سلول، می‌تواند سبب کاهش رشدونمو ایده‌آل گیاهان شود. فلز روی از طریق تأثیر بر میزان جذب و جابه‌جایی عناصر ضروری و نیز اثر بر میزان فعالیت برخی از آنزیم‌ها در جایگاه عملکردشان موجب اختلال در متابولیسم گیاه می‌شود (حفیظ[10] و همکاران، ۲۰۱۳).

بررسی منابع نشان داد که ملاتونین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی شناخته شده است و در بسیاری از

1. Sestili
2. Haji boland
3. Bonyadi
4. Sheng
5. Ke
6. Hacışevki
7. Baba
8. Ansari
9. Lin
10. Hafeez

جنبه‌های رشدونمو گیاه عملکرد متفاوتی دارد. براساس شواهد، تنش زیست‌محیطی می‌تواند سطح ملاتونین درون گیاه را افزایش دهد (مارچ[1] و همکاران، ۲۰۰۰). ملاتونین ممکن است نقش مهمی در تنظیم رشد گیاه در غلظت‌های کم و زیاد در یک گونه متفاوت داشته باشد (جان[2] و همکاران، ۲۰۱۲). گیاهان دستگاه‌های آنزیمی لازم برای بیوسنتز ملاتونین دارند. علاوه بر سنتز، گیاهان می‌توانند ملاتونین را از محیط زیست فراهم آورده و آن را در اندام خود انباشته کنند (چن[3] و همکاران، ۲۰۰۹). ملاتونین باعث محافظت از بافت گیاه در برابر استرس اکسیداتیو ایجادشده توسط تنش‌های شیمیایی و آلودگی می‌شود (آرنائو[4] و هرناندز–روئیز[5]، ۲۰۱۷). افزایش تولید ملاتونین تحت تنش ممکن است واکنش مقاومت گیاهان برای تحمل شرایط نامطلوب باشد (شی[6] و همکاران، ۲۰۱۶). گیاهانی که در نور خورشید رشد می‌کنند، دارای سه برابر ملاتونین بیش‌تر در ریشه‌ها و ۲/۵ برابر در برگ‌ها نسبت به گیاهانی که در نور مصنوعی رشد می‌کنند، هستند (وانگ[7] و همکاران، ۲۰۱۳). براساس گزارش‌های اخیر گیاهانی که با ملاتونین تیمار می‌شوند، مقاومت بیش‌تری نسبت به تنش‌های سنگین فلزات دارند. گیاهان نخود[8] تیمارشده با ملاتونین در تنش ۱۰۰ میکرومولار فلز مس زنده مانده‌اند، اما گیاهان کنترل از بین رفتند. این نتیجه نشان داد که ملاتونین می‌تواند تحمل مس را در گیاهان افزایش دهد (شَفرانسکا[9] و همکاران، ۲۰۱۶). هم‌چنین در پژوهش دیگری نشان داده شد که ملاتونین افزوده‌شده به خاک باعث افزایش تحمل و بقای گیاهان نخود در برابر آلودگی مس می‌شود، که بیانگر این است که وجود ملاتونین در گیاهان می‌تواند در گیاه‌پالایی استفاده شود (تان[10] و همکاران، ۲۰۰۷). شواهد زیادی وجود دارد که تأیید می‌کند یون‌های فلزات سنگین تأثیر عمده‌ای بر محتوای ترکیبات با عملکرد هورمونی دارند. از جمله، یون روی در ریشه باقلای مصری[11] باعث افزایش مقادیر درون‌زای ملاتونین (۱۲ برابر بیش‌تر از شاهد) می‌شود (آرنائو و هرناندز–لوئیز، ۲۰۱۳).

گزارش‌هایی در زمینه نقش ملاتونین در بهبود پاسخ‌های نخود فرنگی (یودا[12] و همکاران، ۲۰۱۸) و کلم قرمز (پوسمیک[13] و همکاران، ۲۰۰۸) به سمیت یونی ارائه شده است. در پژوهشی مشاهده شد که ملاتونین به‌دلیل افزایش کارایی حمل و نقل انرژی فتوسنتز و بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی منجر به افزایش مقاومت گیاه ریحان در مقابل تنش فلزات سنگین مس و روی گردید. هم‌چنین ملاتونین با کاهش میزان انباشت فلزات سنگین مس و روی در گیاه ریحان باعث کاهش اثرات مخرب این فلزات و بهبود وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه شد (زمانی‌بابگهری و همکاران، ۱۳۹۷).

طی سال‌های اخیر ملاتونین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی در مطالعات گیاهی شناخته شده است. این ترکیب در بسیاری از جنبه‌های رشدونمو گیاه عملکرد متفاوتی دارد. در مطالعات تجربی مشخص شده که ملاتونین در کاهش اثرات مخرب تنش‌ها نقش به‌سزایی دارد. با توجه به اهمیت غذایی و دارویی گیاه ریحان و هم‌چنین نظر به افزایش روز افزون آلاینده های فلزی، در کنار نقش ملاتونین در مقاومت به تنش‌های محیطی در گیاهان، در پژوهش حاضر نقش ملاتونین به‌عنوان یک محرک رشد با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بر گیاه ریحان تحت تنش مس و روی موردبررسی قرار گرفت.

1. Murch
2. John
3. Chen
4. Arnao
5. Hernández-Ruiz
6. Shi
7. Wang
8. *Pisum sativum* L.
9. Szafrańska
10. Tan
11. *Lupinus albus* L.
12. Yadu
13. Posmyk

## ۳. روش‌شناسی پژوهش

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۶ در گلخانه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل و با سه تکرار انجام شد. بذر ریحان (تهیه‌شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) در ماسه‌های بکر و بدون مواد اضافه با اسیدیته ۶/۵ الی ۷ و هم‌چنین هدایت الکتریکی[1] کم‌تر از ۳۰۰ میکرو زیمنس بر سانتی‌متر کاشته شد. در هر گلدان (به اندازه ارتفاع ۱۵/۵ سانتی‌متر، قطر دهانه ۱۷/۵ و قطر کف ۱۱/۵ سانتی‌متر) در حدود ۱۰ بذر در عمق ۲ سانتی‌متری در شرایط استاندارد (شدت روشنایی ۱۵۰۰ لوکس، دوره روشنایی ۱۶ ساعت با تناوب دمایی ۲۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد) کاشته و به‌مدت یک هفته آبیاری روزانه با آب مقطر انجام شد. پس از سبزشدن تعداد سه گیاه در هر گلدان نگه داشته و بقیه حذف شد. آبیاری با محلول غذایی هوگلند و به‌صورت یک روز در میان آغاز شد. گیاهان جهت رشد بهینه به‌مدت ۲۱ روز در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در این مرحله که همراه با پیدایش و گسترش برگ ردیف سوم گیاهان بود، تیماردهی مس و روی (سه سطح) و ملاتونین (دو سطح) به‌صورت یک‌روز در میان با اعمال تیمارها در محلول آب آبیاری روز صورت گرفت. تیماردهی با غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار سولفات‌مس ($CuSo_4$) به‌عنوان منبع مس و غلظت‌های صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سولفات‌روی ($ZnSo_4$) به‌عنوان منبع روی و ملاتونین (صفر و ۱۰۰ میکرومولار) افزوده شده به آب آبیاری انجام شد. پس از مدت ۱۴ روز گیاهان برای انجام بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برداشت شد و پس از تثبیت نمونه‌ها در ازت مایع تا زمان انجام مطالعه در فریزر ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. جهت تعیین مقدار کلروفیل، محتوای قند محلول و کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین و بررسی چرخه گلوتاتیون از برگ ردیف سوم و چهارم استفاده شد. جهت بررسی محتوای آب برگ و شاخص پایداری غشا، از بافت تازه برگ سوم گسترش یافته استفاده شد.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ در آزمایشگاه وزن تر نمونه‌های گیاهی با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد. سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر قرار داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری و سپس برگ‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. وزن خشک نمونه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد (ریچی[2] و همکاران، ۱۹۹۰). با قراردادن اعداد حاصل در رابطه (۱) محتوای نسبی آب برگ به‌دست آمد.

$$RWC = \frac{FW+DW}{SW-DW} \times 100$$ رابطه ۱)

در این رابطه، $F_w$: وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، $D_w$: وزن خشک برگ بعد از قراردادن نمونه در آون، $S_w$: وزن اشباع برگ بعد از قراردادن نمونه در آب مقطر است.

شاخص پایداری غشا از طریق اندازه‌گیری میزان نشت الکتریکی تعیین شد. ابتدا نمونه‌های برگ درون لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر با حجم ۲۰ میلی‌لیتر منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس میزان هدایت الکتریکی آب مقطر همراه نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. نشت ثانویه از طریق اندازه‌گیری میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها پس از حرارت‌دیدن آن‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و شاخص پایداری غشا با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد (سایرام[3] و همکاران، ۲۰۰۲).

$$PMI = (1 - \frac{EC1}{EC2}) \times 100$$ رابطه ۲)

که در این رابطه، PMI: شاخص پایداری غشا، EC1: نشت اولیه و EC2: نشت ثانویه است.

1. Electrical conductivity: EC
2. Ritchie
3. Sairam

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی به روش لیچتنهلر[1] (۱۹۷۸) انجام شد. بافت تازه برگ در هاون چینی که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد بود به‌خوبی ساییده و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۵۵۰۰×g جذب آن‌ها در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) قرائت و غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از رابطه‌های (۳) تا (۶) و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

رابطه ۳) $Chl.a=12.5\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$

رابطه ۴) $Chl.b=21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$

رابطه ۵) $Chl.total=chla + chlb$

رابطه ۶) $Cart= (1000\ A_{470} - 1.8\ Chl\ a - 85.02\ Chl\ b)/ 198$

برای تعیین محتوای قندهای محلول، بافت گیاه در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد ساییده و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از فیلترکردن عصاره حاصل با کاغذ صافی و تبخیر الکل محلول، رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. مقدار ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون به ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در لوله آزمایش اضافه و به‌مدت ۱۷ دقیقه در بن‌ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب نمونه‌ها پس از سردشدن، در ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) قرائت و غلظت قند از طریق معادله خط و منحنی استاندارد گلوکز به‌دست آمد (سوموگی[2]، ۱۹۵۲).

برای سنجش میزان قندهای احیاکننده، عصاره بافت تر گیاهچه تهیه شد. مقدار دو میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌های تهیه‌شده به لوله آزمایش منتقل و پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر از محلول سولفات‌مس به آن‌ها، سر لوله‌ها با پنبه بسته شد. لوله‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و بعد از سردشدن لوله‌های آزمایش، ۲ میلی‌لیتر از محلول فسفومولیبدیک اسید به آن‌ها اضافه شد. وقتی رنگ آبی پدیدار گردید، لوله‌های آزمایش به‌شدت تکان داده شد تا این رنگ به‌طور یکنواخت درون لوله آزمایش منتشر شود. در نهایت شدت جذب محلول‌ها در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) خوانده و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت قندهای احیاکننده برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (سوموگی، ۱۹۵۲).

برای ارزیابی میزان آنتوسیانین‌ها ۰/۱ گرم برگ خشک وزن و در هاونی که حاوی پنج میلی‌لیتر متانول اسیدی بود خوب ساییدهشد. سپس پنج میلی‌لیتر متانول اسیدی دیگر به آن اضافه و عصاره به‌دست‌آمده به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. عصاره حاصل پس از ۲۴ ساعت، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. مقدار ۳ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و شدت جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) قرائت شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها با استفاده از ضریب خاموشی معادل $۳۳۰۰۰M^{-1}Cm^{-1}$ و فرمول $A = \varepsilon bc$ استفاده شد (واگنر[3]، ۱۹۷۹).

جهت سنجش مقدار فلاونوئیدها بافت برگ گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل، آب مقطر اضافه و حجم ۵ میلی‌لیتر به‌دست آمد. سپس به محلول حاصل ۳ میلی‌لیتر $NaNO_2$ ۵ درصد و پس از ۵ دقیقه، ۰/۶ میلی‌لیتر $AlCl_3$، ۱۰ درصد اضافه گردید. در نهایت ۲ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) اندازه‌گیری شد. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به‌دست آمد (تور[4] و ساواج[5]، ۲۰۰۵).

1. Lichtenthaler
2. Somogyi
3. Wagner
4. Toor
5. Savage

برای تهیه عصاره جهت ارزیابی محتوای پروتئین کل، بافت تازه گیاه در ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵) که حاوی پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) یک درصد و EDTA، ۱ میلی‌مولار بود ساییده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. عصاره‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰×g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول شفاف رویی برای سنجش مقدار پروتئین کل استفاده شد. برای سنجش غلظت پروتئین، به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و بلافاصله مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین محاسبه گردید (بردفورد[1]، ۱۹۷۶).

برای محاسبه گلوتاتیون کل ابتدا اندام هوایی گیاه در یک هاون چینی محتوی ۲ میلی‌لیتر متافسفریک‌اسید ۲ درصد به‌طور کامل ساییده شد. محلول همگن به‌دست‌آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۵۵۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول رویی به لوله آزمایش حاوی ۷۰۰ میکرولیتر NADPH ۰/۳ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر DTNB ۶ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و بعد از ۴-۳ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر آنزیم گلوتاتیون رداکتاز افزوده و جذب در ۴۱۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) خوانده شد. محاسبه گوتاتیون کل از طریق منحنی استاندارد انجام و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید (گریفیث[2]، ۱۹۸۰).

برای اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون اکسید شده، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره سانتریفیوژشده در مرحله قبل، به لوله آزمایش حاوی ۲ میکرولیتر ۲- وینیل پیریدین اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس ۷۰۰ میکرولیتر NADPH ۰/۳ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر دی تیوبیس DTNB ۶ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر آنزیم گلوتاتیون رداکتاز افزوده و جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-160، ژاپن) در طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت شد. محاسبه گلوتاتیون اکسیدشده از طریق منحنی استاندارد انجام و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید. میزان گلوتاتیون احیاشده از تفاضل گلوتاتیون اکسیدشده و گلوتاتیون کل به‌دست آمد (گریفیث، ۱۹۸۰).

آنالیز واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به‌کمک آزمون چنددامنه‌ای دانکن[3] در سطح احتمال ۵ درصد (ضریب اطمینان ۹۵ درصد) با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) و رسم نمودارها از طریق نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۶) نجام شد.

## ۴. یافته‌های پژوهش

### ۴. ۱. ویژگی‌های فیزیولوژیکی- بیوشیمیایی

اثر سه‌گانه ملاتونین و روی و مس و اثر دوگانه ملاتونین و روی بر تمامی پارامترهای موردمطالعه گیاه ریحان به‌جز شاخص پایداری غشا در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر دوگانه ملاتونین و مس، روی و مس در پارامترهای محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشا، میزان کلروفیل کل، میزان پروتئین و میزان قند محلول و احیا در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. اما اثر متقابل مس و روی در میزان کاروتنوئیدهای گیاه ریحان معنی‌دار نبود (جدول ۱).

### ۴. ۲. شاخص پایداری غشا

نتایج حاکی از این است که ملاتونین همراه با غلظت‌های مختلف مس باعث افزایش معنی‌دار شاخص پایداری غشا

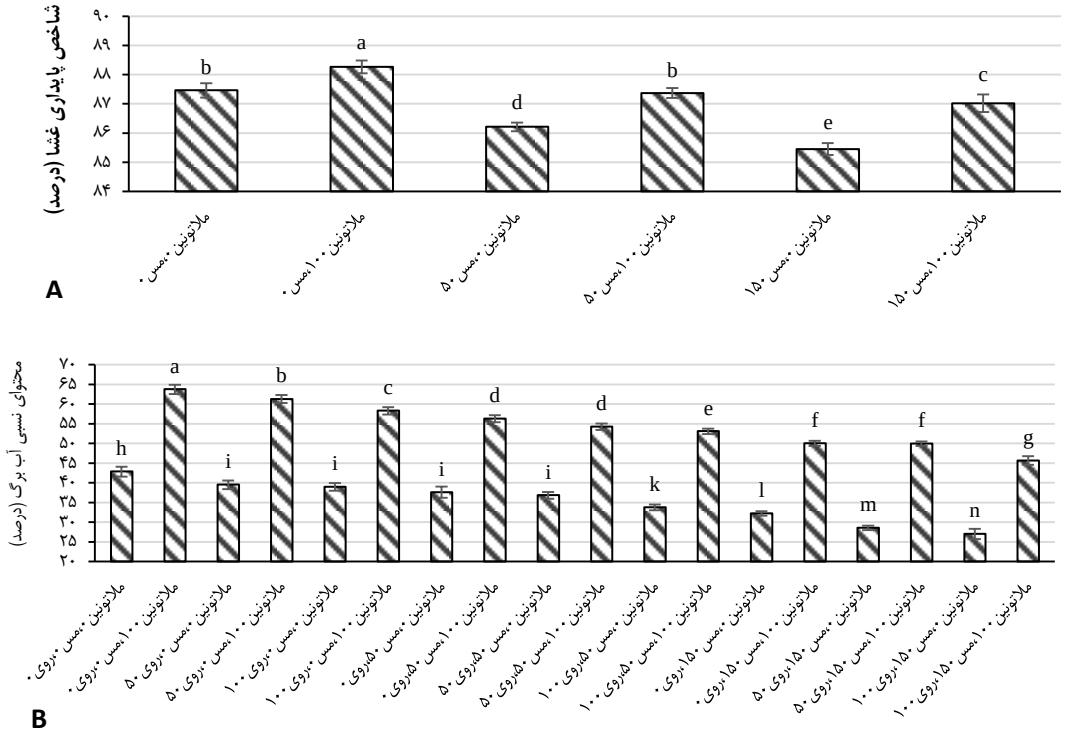
1. Bradford
2. Griffith
3. Duncan's multiple range test

نسبت به غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار مس به‌تنهایی در گیاه ریحان شد. بررسی‌های آماری مربوط به نتایج محتوای نسبی آب برگ در گیاه ریحان نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار مس باعث کاهش معنی‌دار ۲۷ و ۵۷ درصدی و استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار روی باعث کاهش ۲۰ درصدی این پارامتر نسبت به گیاه شاهد شد. ملاتونین باعث افزایش معنی‌دار محتوای نسبی آب برگ گیاه ریحان در حضور غلظت‌های مختلف مس و روی در مقایسه با گیاهان تیمارشده با این غلظت‌ها به‌تنهایی گردید (شکل ۱).

**جدول ۱.** جدول تجزیه واریانس ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه ریحان تحت تأثیر تیمارهای مختلف

| منابع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | شاخص پایداری غشا | محتوای آب نسبی | کلروفیل کل | کاروتنوئید | پروتئین | قند م حلول | قند احیاشده |
| مس | ۲ | ۱۲/۱۸** | ۲۴۷۵/۷۲** | ۹۳/۳۲** | ۰/۰۵** | ۳/۳۰** | ۵۵۱/۰۶** | ۲۹۸۳/۸۹** |
| روی | ۲ | ۶/۱۹** | ۱۳۷/۶۴** | ۶/۶۶** | ۰/۰۰۵** | ۰/۲۴** | ۳۳/۱۵** | ۱۴۶/۸۴** |
| ملاتونین | ۱ | ۱۸/۷۱** | ۱۲۸۲/۶۶** | ۵۶/۷۳** | ۰/۰۳** | ۱/۸۵** | ۴۵۳/۴۰** | ۲۰۴۰/۴۰** |
| مس × روی | ۴ | ۱/۹۶** | ۲۴/۷۴** | ۲/۷۳** | ۰/۰۰۰۳ns | ۰/۱۰** | ۱۲/۰۳** | ۱۴۶/۸۴** |
| مس × ملاتونین | ۲ | ۰/۶۶** | ۲۲/۳۰** | ۱/۱۹** | ۰/۰۰۱* | ۰/۰۷** | ۱۱/۱۹** | ۶۸/۹۴** |
| روی × ملاتونین | ۲ | ۰/۱۶ns | ۴۱/۲۳** | ۰/۵۴** | ۰/۰۰۲** | ۰/۰۶** | ۵/۹۹** | ۳۷/۶۸** |
| مس× روی× ملاتونین | ۴ | ۰/۲۳ns | ۲/۰۴** | ۰/۵۴** | ۰/۰۰۱** | ۰/۰۲** | ۲/۳۰** | ۲۴/۱۳** |
| خطا | ۳۶ | ۰/۱۰ | ۰/۵۱ | ۰/۰۶ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۷ | ۰/۶۶ |
| ضریب تغییرات (درصد) | – | ۰/۳۶ | ۱/۵۹ | ۲/۸۶ | ۹/۸۲ | ۱/۰۴ | ۰/۸۲ | ۱/۷۶ |

**، * و ns: به‌ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.




**شکل ۱.** مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای مس و ملاتونین بر شاخص پایداری غشا (A) و تیمارهای ملاتونین و مس و روی بر محتوای نسبی آب برگ (B) گیاه ریحان

### ۴. ۳. رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج نشان داد که استفاده از ملاتونین به‌طور جداگانه باعث افزایش ۱۷ درصدی کلروفیل کل در گیاه ریحان در مقایسه با گیاه شاهد شد. استفاده از ملاتونین در حضور غلظت ۵۰ میکرومولار مس و روی منجر به افزایش ۲۷ درصدی و در حضور غلظت‌های ۱۰۰ میکرومولار روی و ۱۵۰ میکرومولار مس موجب افزایش ۳۵ درصدی کلروفیل در مقایسه با گیاهان تحت تیمار همین غلظت‌ها در شرایط عدم حضور ملاتونین گردید (جدول ۲).

**جدول ۲.** مقایسه میانگین اثر هم‌زمان تیمارهای مس و روی و ملاتونین بر صفات فیزیولوژیکی گیاه ریحان

| ملاتونین (میکرو مول) | مس (میکرو مول) | روی (میکرو مول) | کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر) | کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) | پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر) | آنتوسیانین (میلی گرم بر گرم) | فلاونوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) | گلوتاتیون کل (میلی گرم بر گرم وزن تر) | گلوتاتیون اکسید (میلی گرم بر گرم وزن تر) | گلوتاتیون احیا (میلی گرم بر گرم وزن تر) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۰ | ۰ | ۹/۹۵e | ۰/۱۹efg | ۱/۷۳i | ۰/۱۵e | ۰/۱۹c | ۱/۵۲j | ۱/۲۸a | ۰/۲۴n |
| ۰ | ۰ | ۵۰ | ۹/۰۲bc | ۰/۱۸bc | ۱/۸۲b | ۰/۱۵e | ۰/۲۰b | ۱/۷۱i | ۱/۲۵ b | ۰/۴۷m |
| ۰ | ۰ | ۱۰۰ | ۷/۶۵fg | ۰/۱۴fgh | ۱/۵۷h | ۰/۲۰b | ۰/۲۰b | ۲/۳۴b | ۱/۱۲d | ۱/۲۲d |
| ۰ | ۵۰ | ۰ | ۶/۳۱g | ۰/۱۱gh | ۱/۱۴j | ۰/۲۲a | ۰/۲۱ab | ۲/۴۲b | ۰/۸۹b | ۱/۵۳l |
| ۰ | ۵۰ | ۵۰ | ۵/۴۳i | ۰/۰۹ijk | ۱/۰۲k | ۰/۲۳a | ۰/۲۲a | ۲/۴۴b | ۰/۸۱f | ۱/۶۳d |
| ۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۱۱/۸۴kl | ۰/۲۴kl | ۲/۳۵o | ۰/۱۶e | ۰/۲۰b | ۱/۵۸j | ۱/۲۵b | ۰/۳۳h |
| ۰ | ۱۵۰ | ۰ | ۸/۶۳l | ۰/۱۶lm | ۱/۶۳q | ۰/۱۸c | ۰/۲۰b | ۱/۷۲i | ۱/۲۴b | ۰/۴۸f |
| ۰ | ۱۵۰ | ۵۰ | ۶/۶۲m | ۰/۱۲jk | ۱/۲۷p | ۰/۲۱b | ۰/۲۰b | ۲/۳۲c | ۱/۱۰e | ۱/۲۲d |
| ۰ | ۱۵۰ | ۱۰۰ | ۵/۵۳m | ۰/۱۳m | ۱/۲۳r | ۰/۲۳a | ۰/۲۱ab | ۲/۵۲b | ۰/۸۲e | ۱/۷۰e |
| ۱۰۰ | ۰ | ۰ | ۱۲/۵۶b | ۰/۲۵a | ۲/۴۱d | ۰/۱۵e | ۰/۱۹c | ۲/۰۰g | ۱/۲۱c | ۰/۷۹k |
| ۱۰۰ | ۰ | ۵۰ | ۱۰/۷۸a | ۰/۲۱b | ۲/۰۷a | ۰/۱۸c | ۰/۲۱ab | ۲/۰۲f | ۱/۲۰c | ۰/۸۲j |
| ۱۰۰ | ۰ | ۱۰۰ | ۹/۳۵c | ۰/۱۸bcd | ۱/۹۵c | ۰/۱۸c | ۰/۲۲a | ۲/۴۹b | ۱/۱۰e | ۱/۳۹d |
| ۱۰۰ | ۵۰ | ۰ | ۶/۹۹d | ۰/۱۳cde | ۱/۴۷e | ۰/۱۹c | ۰/۲۲a | ۲/۸۲a | ۰/۶۵j | ۲/۱۶b |
| ۱۰۰ | ۵۰ | ۵۰ | ۱۲/۰۸d | ۰/۲۹def | ۲/۱۷f | ۰/۱۷d | ۰/۱۹c | ۱/۸۶h | ۱/۲۰c | ۰/۶۶j |
| ۱۰۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۱۱/۵۷f | ۰/۲۳e..h | ۲/۲۷g | ۰/۱۷d | ۰/۱۹c | ۲/۰۷c | ۱/۰۵e | ۱/۰۲g |
| ۱۰۰ | ۱۵۰ | ۰ | ۱۰/۵۶h | ۰/۲۱hij | ۲/۰۱m | ۰/۱۸c | ۰/۲۲a | ۲/۷۲b | ۰/۶۸i | ۲/۰۴c |
| ۱۰۰ | ۱۵۰ | ۵۰ | ۸/۱۲jk | ۰/۱۵kl | ۱/۴۲l | ۰/۲۱b | ۰/۲۲a | ۲/۷۳b | ۰/۶۷i | ۲/۰۶c |
| ۱۰۰ | ۱۵۰ | ۱۰۰ | ۹/۹۵e | ۰/۱۹efg | ۱/۷۳i | ۰/۱۵e | ۰/۱۹c | ۱/۵۲j | ۱/۲۸a | ۰/۲۴n |

حروف لاتین مشترک در هر ستون بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

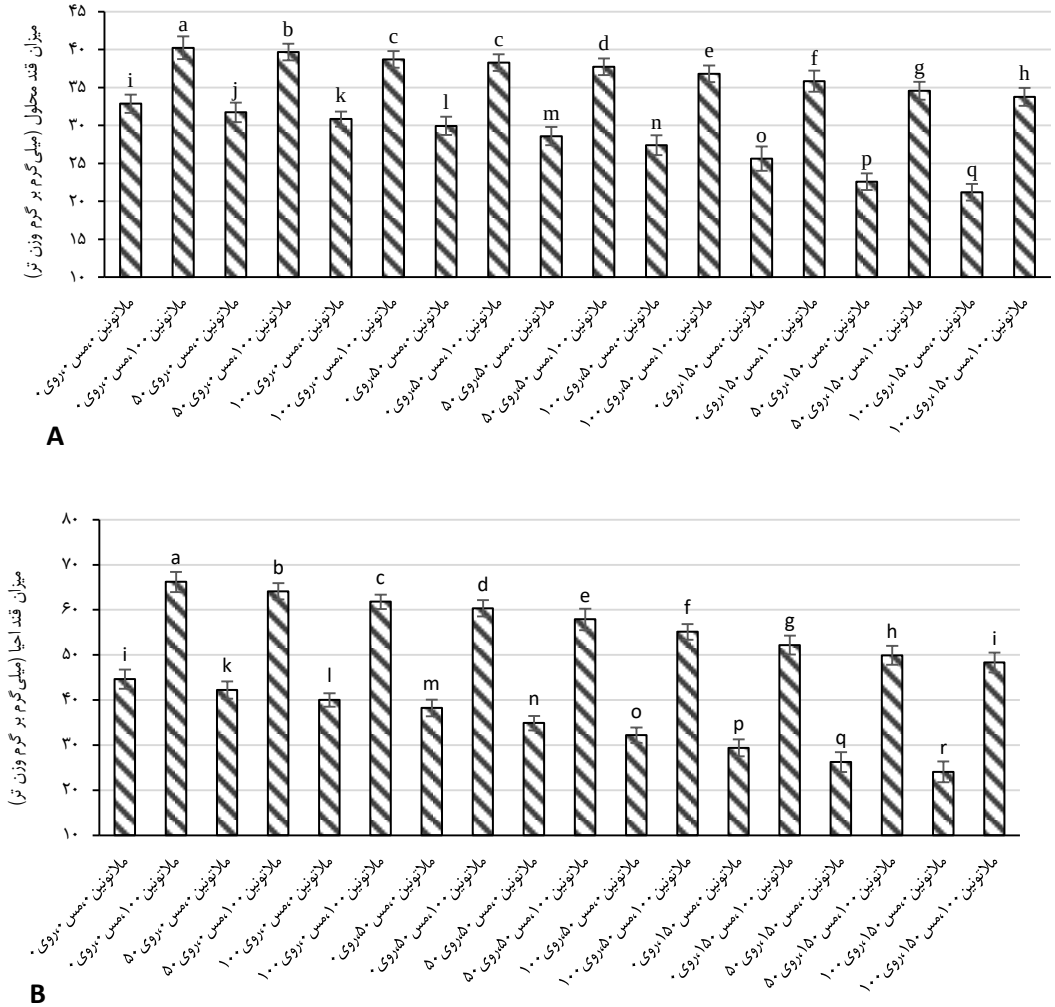
### ۴. ۴. میزان پروتئین

استفاده از غلظت‌های مختلف مس در گیاه ریحان موجب کاهش معنی‌دار میزان پروتئین نسبت به گیاه شاهد در سطح احتمال یک درصد شد (جدول ۱). استفاده از ملاتونین در حضور غلظت‌های مختلف مس و روی موجب افزایش معنی‌دار میزان پروتئین کل برگ گیاه ریحان نسبت به گیاهان تحت تیمار مس و روی در شرایط عدم حضور ملاتونین در سطح یک درصد شد. برای نمونه ملاتونین باعث افزایش ۳۴ درصدی این پارامتر در حضور غلظت‌های ۵۰ میکرومولار مس و ۱۰۰ میکرومولار روی در مقایسه با همین غلظت‌ها به‌تنهایی گردید (جدول ۲).

### ۴. ۵. قندهای محلول و احیا

استفاده از غلظت‌های مختلف مس سبب کاهش معنی‌دار میزان قند محلول گیاه ریحان در مقایسه با گیاه شاهد در سطح یک درصد شد. از طرفی با توجه به نتایج آماری تیمار با غلظت‌های مختلف روی موجب افزایش معنی‌دار این پارامتر در مقایسه با گیاه شاهد در سطح یک درصد گردید (جدول ۱). نتایج حاکی از این است که ملاتونین قند محلول گیاه ریحان در شرایط تیمار با غلظت ۵۰ میکرومولار مس و ۵۰ میکرومولار روی را نسبت به شرایط عدم حضور ملاتونین به‌ترتیب به میزان ۱۳ و ۵ درصد افزایش داد. هم‌چنین تیمار گیاه ریحان با ملاتونین در شرایط حضور غلظت ۱۵۰ میکرومولار مس و ۱۰۰ میکرومولار روی موجب افزایش ۲۶ درصد این پارامتر در مقایسه با گیاهان تیمارشده با غلظت‌های ذکرشده به‌تنهایی گردید (شکل ۲).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، استفاده از ملاتونین با غلظت‌های مختلف مس و روی به‌طور هم‌زمان موجب کاهش معنی‌دار پارامتر ذکرشده نسبت به گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف مس و روی به‌تنهایی شد. برای نمونه، ملاتونین سبب کاهش ۱۴ درصدی قند احیا گیاه ریحان در حضور غلظت‌های ۱۵۰ میکرومولار مس و ۱۰۰ میکرومولار روی در مقایسه با گیاهان تحت تیمار غلظت‌های ذکرشده به‌تنهایی گردید (شکل ۲).




**شکل ۲.** مقایسه میانگین اثر هم‌زمان تیمارهای مس و روی و ملاتونین بر میزان قند محلول (A) و میزان قند احیا (B) در گیاه ریحان

### ۴. ۶. شاخصه‌های اکسیداتیو و گلوتاتیون گیاه ریحان

نتایج مربوط به اثر متقابل هم‌زمان ملاتونین و مس و روی بر میزان آنتوسیانین و میزان فلاونوئیدها، هم‌چنین اثر متقابل مس و روی و اثر متقابل مس و ملاتونین در تمام صفات ذکرشده و اثر متقابل روی و ملاتونین فقط در پارامتر آنتوسیانین گیاه ریحان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳).

**جدول ۳.** میانگین مربعات شاخصه‌های آنتی‌اکسیدان و گلوتاتیون گیاه ریحان در شرایط تیمار مس، روی و ملاتونین و اثرات متقابل آن‌ها

| منابع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | آنتوسیانین | فلاونوئید | گلوتاتیون کل | گلوتاتیون اکسید | گلوتاتیون احیا |
| مس | ۲ | ۰/۰۱۶** | ۰/۰۰۲۷** | ۳/۱۷** | ۱/۰۰** | ۷/۵۶** |
| روی | ۲ | ۰/۰۰۱** | ۰/۰۰۰۲** | ۰/۴۶** | ۰/۰۸** | ۰/۸۹** |
| ملاتونین | ۱ | ۰/۰۰۲** | ۰/۰۰۰۵** | ۱/۵۰** | ۰/۳۰** | ۳/۱۲** |
| مس × روی | ۴ | ۰/۰۰۰۱** | ۰/۰۰۰۱** | ۰/۱۷** | ۰/۰۵** | ۰/۳۸** |
| مس × ملاتونین | ۲ | ۰/۰۰۱** | ۰/۰۰۰۳** | ۰/۰۱** | ۰/۰۱** | ۰/۰۱** |
| روی × ملاتونین | ۲ | ۰/۰۰۱** | ۰/۰۰۰۰۱ns | ۰/۰۱** | ۰/۰۱** | ۰/۰۳** |
| مس× روی× ملاتونین | ۴ | ۰/۰۰۱** | ۰/۰۰۰۱** | ۰/۰۱** | ۰/۰۴** | ۰/۰۷** |
| خطا | ۳۶ | ۰/۰۰۰۰۱ | ۰/۰۰۰۰۱ | ۰/۰۰۰۴ | ۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۰۰۱ |
| ضریب تغییرات (درصد) | – | ۱/۲۴ | ۰/۶۱ | ۰/۹۳ | ۰/۹۷ | ۱/۵۲ |

**، * و ns: به‌ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

نتایج نشان داد که استفاده از ملاتونین همراه با غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار مس هم‌زمان با غلظت ۵۰ میکرومولار روی به‌ترتیب باعث کاهش ۱۵ درصدی و ۱۷ درصدی این پارامتر در مقایسه با گیاهان تیمارشده با همین غلظت‌ها به‌تنهایی شد. هم‌چنین ملاتونین در حضور غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار مس توام با غلظت ۱۰۰ میکرومولار روی به‌ترتیب موجب کاهش معنی‌دار ۱۷ درصدی و ۶ درصدی میزان آنتوسیانین گیاه ریحان نسبت به غلظت‌های نامبرده در شرایط عدم حضور ملاتونین شد (جدول ۲).

کاربرد ملاتونین هم‌زمان با غلظت‌های مختلف مس و روی باعث افزایش میزان فلاونوئیدهای این گیاه در مقایسه با گیاهان تحت تیمار با غلظت‌های ذکرشده به‌تنهایی گردید. برای نمونه ملاتونین در حضور مس ۵۰ و روی ۱۰۰ میکرومولار موجب افزایش ۷/۷ درصدی این پارامتر در مقایسه با غلظت‌های ذکرشده در شرایط عدم حضور ملاتونین شد (جدول ۲).

### ۴. ۷. اثر ملاتونین بر گلوتاتیون

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تمامی اثرات متقابل موردبررسی در گیاه ریحان بر میزان گلوتاتیون کل، گلوتاتیون اکسید و احیا در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۳). نتایج مربوط به گلوتاتیون کل گیاه ریحان نشان می‌دهد ملاتونین در حضور غلظت‌های مختلف مس همراه با غلظت‌های مختلف روی باعث افزایش میزان گلوتاتیون کل در گیاه ریحان شده است. به‌عنوان مثال، می‌توان به افزایش ۱۴ درصدی گلوتاتیون کل تحت تیمار ملاتونین به‌همراه غلظت ۱۵۰ میکرومولار مس و ۱۰۰ میکرومولار روی در مقایسه با گیاهان تیمارشده با غلظت‌های ذکرشده به در شرایط عدم حضور ملاتونین اشاره نمود (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین‌ها حاکی از این است که کاربرد ملاتونین در حضور غلظت‌های مختلف مس و روی به‌طور جداگانه باعث کاهش میزان گلوتاتیون اکسید در مقایسه با شرایط عدم حضور ملاتونین شد. تنظیم‌کننده ملاتونین در

حضور غلظت۵۰ میکرومولار مس همراه با ۱۰۰ میکرومولار روی تأثیر معنی‌داری بر میزان گلوتاتیون اکسید در مقایسه با غلظت‌های ذکرشده به‌تنهایی نداشت. ملاتونین در حضور غلظت ۱۵۰ میکرومولار مس و ۱۰۰ میکرومولار روی باعث کاهش معنی‌دار گلوتاتیون اکسید گیاه ریحان به میزان ۲۵ درصد در مقایسه با غلظت‌های مذکور به‌تنهایی شد (جدول ۲). براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها کاربرد هم‌زمان غلظت‌های ۱۵۰ میکرومولار مس و ۱۰۰ میکرومولار روی، میزان گلوتاتیون احیا را هفت برابر نسبت به گیاه شاهد افزایش داد. نتایج آماری حاکی از این است که استفاده از ملاتونین به‌تنهایی، میزان گلوتاتیون احیا را در مقایسه با گیاه شاهد ۲/۸ برابر افزایش داده است. هم‌چنین کاربرد این تنظیم‌کننده در حضور غلظت‌های مختلف مس هم‌زمان با غلظت‌های مختلف روی باعث افزایش معنی‌دار میزان این پارامتر گردید (جدول ۲).

## ۵. بحث

شاخص پایداری غشا به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی تحمل گونه‌های مختلف گیاهی که در معرض تنش قرار دارند به‌کار می‌رود و برآوردی از نشت الکترولیت است (داوود[1] و همکاران، ۲۰۲۰). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، غلظت‌هایی از سولفات‌مس به میزان ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار و غلظت‌های از سولفات‌روی به میزان ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به‌طور جداگانه و هم‌چنین هم‌زمان با یکدیگر موجب آسیب به ساختار غشای برگ ریحان شد و در نتیجه شاخص پایداری غشا و محتوای نسبی آب برگ نسبت به شاهد کاهش نشان داد. استفاده از ملاتونین باعث افزایش شاخص پایداری غشا و محتوای نسبی آب برگ در گیاهان ریحان تحت تنش فلزات مس و روی شد. افزایش پایداری غشا به این دلیل است که ملاتونین با پشتیبانی از کارکرد غشا از طریق القای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی، محافظت گیاه را در برابر صدمات اکسیداتیو امکان‌پذیر می‌کنند (حسن[2] و همکاران، ۲۰۲۲)، این فرایند منجر به کاهش نشت یونی و در نتیجه افزایش محتوای نسبی آب برگ درخت سیب شد (وانگ[3] و همکاران، ۲۰۱۲).

یافته‌های پژوهش‌گران نشان می‌دهد که کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش فلزات سنگین به‌دلیل تخریب ساختار کلروپلاست‌ها و دستگاه فتوسنتزی می‌باشد (ریان[4] و همکاران، ۲۰۱۳؛ علی[5] و همکاران، ۲۰۲۲؛ پیروز[6] و همکاران، ۲۰۲۱). ملاتونین تأثیر به‌سزایی در افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش‌های زیستی (زِنگ[7] و همکاران، ۲۰۲۲) و غیرزیستی (سمیت عناصر) (ژانگ[8] و همکاران، ۲۰۲۱) دارد. این تنظیم‌کننده موجب حفظ و افزایش محتوای کلروفیل تحت شرایط تنش می‌گردد (بارمان[9] و همکاران، ۲۰۱۹). ملاتونین نقش مهمی در حفاظت از کلروفیل و انجام فتوسنتز به‌دلیل بالابردن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (فان[10] و همکاران، ۲۰۱۸) و در نتیجه مهار تولید گونه‌های فعال اکسیژن ایفا می‌کند (ژانگ[11] و همکاران، ۲۰۱۴). بنابراین شاید یکی از دلایل افزایش محتوای کلروفیل پس از کاربرد ملاتونین در شرایط تنش به‌دلیل نقش مؤثر ملاتونین در حفاظت از دستگاه فتوسنتزی و ساختار کلروپلاست با از بین‌بردن گونه‌های فعال اکسیژن باشد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

1. Dawood
2. Hassan
3. Wang
4. Ryan
5. Ali
6. Pirooz
7. Zeng
8. Zhang
9. Barman
10. Fan
11. Zhang

کاهش مقدار پروتئین یک پدیده متداول در تنش فلزات سنگین می‌باشد که موجب سرکوب برخی پروتئین‌ها و القای سنتز پروتئین‌های جدید می‌گردد (موراریو[1] و همکاران، ۲۰۱۱). ملاتونین مقاومت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان در معرض تنش‌های مختلف را افزایش می‌دهد و می‌تواند گونه‌های فعال اکسیژن را جذب کند (تانگ[2] و همکاران، ۲۰۲۰). بنابراین یکی از دلایل افزایش میزان محتوای پروتئین پس از کاربرد ملاتونین در شرایط تنش، به‌دلیل نقش مؤثر ملاتونین در بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و جلوگیری از واردشدن آسیب‌های اکسیداتیو به پروتئین‌ها و تخریب آن‌ها می‌باشد (وانگ[3] و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش غلظت‌های مختلف مس باعث کاهش میزان پروتئین گیاه ریحان گردید. از طرفی ملاتونین از این کاهش جلوگیری کرده و باعث افزایش آن شد. غلظت‌های مختلف روی در ریحان، میزان پروتئین‌ها را افزایش داد که ملاتونین این افزایش را تشدید کرد.

قندهای محلول جزو اسمولیت‌هایی هستند که در پاسخ به تنش‌ها از جمله سمیت فلزات سنگین برای تنظیم اسمزی در گیاهان تجمع می‌یابند (هوجیک[4] و همکاران، ۲۰۲۱) و نقش آن‌ها در حفظ ساختار ماکرومولکول‌های سلول و از جمله ثبات‌بخشیدن به ساختار DNA گزارش شده است (حسن[5] و همکاران، ۲۰۲۱). به‌طوری که برخی دانشمندان مقدار قندها را به‌عنوان شاخص خوبی برای بیان مقاومت به تنش ذکر نموده‌اند. قندهای محلول به‌عنوان محافظ اسمزی باعث پایداری غشاهای سلولی و حفظ فشار اسمزی سلول می‌شوند. قندهای محلول، از جمله مواد تعدیل‌کننده سلولی محسوب شده و افزایش مقدار قند محلول در نگهداری آب بافتی مؤثر می‌باشد و باعث ممانعت از دست‌رفتن آب بافت‌ها می‌گردد (بالِن[6] و همکاران، ۲۰۱۳). غلظت بالای فلزات سنگین قادر به اختلال در متابولیسم قندها در گیاهان می‌باشند. در واقع، میزان قندهای کل در گیاهان، بیانگر اثر سمی فلزات سنگین بر روی متابولیسم کربن می‌باشد. در بسیاری از گیاهان نقش کربوهیدرات‌ها به‌عنوان یک عامل تنظیم‌کننده اسمزی در تنش‌های محیطی پذیرفته شده است (موراریو و همکاران، ۲۰۱۱). استفاده از غلظت‌های مختلف مس (۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار) در ریحان موجب افزایش قندهای احیا و کاهش قندهای محلول در مقایسه با گیاهان شاهد شد. استفاده از ملاتونین در این گیاه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش میزان قندهای محلول و کاهش قندهای احیا شد. تجمع قندهای محلول، می‌تواند به حفظ تورژسانس در بافت‌های تنش‌دیده به‌واسطه تنظیم اسمزی کمک کند و عناصر ریزمغذی با شرکت در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و نیتروژن به افزایش قندهای محلول، در گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند (لاسکانو[7] و همکاران، ۲۰۰۱). افزایش معنی‌دار کربوهیدرات‌های کل توسط ملاتونین، به‌دلیل اثر مثبت آن در افزایش فتوسنتز و افزایش بیوسنتز کربوهیدرات‌ها می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده ملاتونین با افزایش مقدار کلروفیل، کاهش تنش اکسیداتیو و حفاظت از غشای کلروپلاستی و غشای سلول و حفاظت از ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها توانسته موجب افزایش قند در گیاه گردد (جان[8] و همکاران، ۲۰۲۱).

مس و روی در سطوح کم تأثیر مثبت بر میزان رشد و عملکرد گیاه دارد. استفاده از این عناصر به‌دلیل فراهم‌نمودن عناصر غذایی موردنیاز رشد، ایجاد تعادل در تغذیه گیاه و اثر مثبت این عناصر بر جذب و انتقال سایر عناصر غذایی کم‌مصرف و پرمصرف باعث افزایش صفات مورفوفیزیولوژیک و افزایش فتوسنتز و تنفس و فعال‌سازی آنزیم‌های دخیل

1. Murariu
2. Tang
3. Wang
4. Hodzic
5. Hassan
6. Balen
7. Lascano
8. Jahan

در متابولیسم گیاه می‌گردد (سلجوقی[1] و رنجبر[2]، ۲۰۱۸). در رابطه با اثر منفی این عناصر در سطوح زیاد نیز باید عنوان کرد که این عناصر در سطوح زیاد به‌عنوان یک فلز سنگین سمی شناخته می‌شوند. در گزارش‌های متعدد اثرهای منفی سطوح زیاد این عناصر بر گیاهان مختلف بررسی و گزارش گردیده است (عسگری‌لجایر و همکاران، ۱۳۹۴). برخی از پژوهش‌گران معتقدند که فلز روی در غلظت‌های محدوده کفایت از طریق محافظت پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی در برابر رادیکال‌های آزاد و سایر محصولات حاصل از واکنش‌های احیایی درون سلولی سبب حفظ تمامیت غشای سلول‌ها می‌شود. به‌علاوه، این فلز به‌همراه مس بخش اصلی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به‌عنوان جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد تشکیل می‌دهند (جایانتی[3] و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهش حاضر با کاربرد مس و روی بیش از محدوده قابل‌تحمل گیاه ریحان، مقادیر صفات موردمطالعه تفاوت معنی‌دار نشان داد که بیانگر نقش سمیت عناصر موردمطالعه می‌باشد.

معمولاً ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شوند. آنتوسیانین در آخرین نقطه مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها ساخته می‌شود، این متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، خاموش‌کننده و یا جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان عمل کنند (دوگرو[4]، ۲۰۲۱؛ گو[5] و همکاران، ۲۰۲۲). فلاونوئیدها جزء فعالی از گیاهان دارویی بوده و خواص دارویی دارند؛ آن‌ها به‌طور مستقیم با واردشدن در واکنش‌های احیایی مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (سِیوم[6] و همکاران، ۲۰۰۶؛ عمران[7] و همکاران، ۲۰۲۱). یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در ریحان تحت تنش فلز سنگین افزایش می‌یابد که همسو با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات گذشته است (هو[8] و همکاران، ۲۰۰۷).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین موجب بهبود و افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی ریحان می‌گردد که با نتایج حاصل از سمیت بُر بر گیاه فلفل مطابقت دارد (صرافی[9] و همکاران، ۲۰۱۷). در پژوهشی ملاتونین سطوح گلوتاتیون را در گیاه خیار افزایش داد تا $Cu^{2+}$ اضافی را کلات کند، بنابراین $Cu^{2+}$ بیش‌تری را در دیواره سلولی و واکوئل حفظ کرد (کائو[10] و همکاران، ۲۰۱۹).

## ۶. نتیجه‌گیری و پیشنهادها

با بررسی‌های تأثیر ملاتونین برون‌زا بر پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ریحان تحت مقادیر بیش‌بود فلزات مس و روی مشخص شد که تنش این فلزات سبب آسیب اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه خواهد شد. طبق تحلیل داده‌های آماری مشاهده شد که مقادیر اضافی مس با غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار و هم‌چنین غلظت ۱۰۰ میکرومولار روی باعث ایجاد تنش در گیاه ریحان شد. این تیمارها موجب کاهش چشم‌گیر رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پروتئین، شاخص پایداری غشا و محتوای قندهای محلول در ریحان نسبت به گیاهان شاهد گردید. مس اثر سمیت بیش‌تری بر گیاه داشت و ترکیبات بیوشیمیایی (فلاونوئید، آنتوسیانین، گلوتاتیون) بیش‌تری در گیاه در مقایسه با روی مازاد ساخته شد. استفاده از ملاتونین ۱۰۰ میکرومولار با افزایش مهار آسیب به غشای گیاه

1. Saljougi
2. Ranjbar
3. Jayanthi
4. Do˘gru
5. Gu
6. Seyoum
7. Imran
8. Hu
9. Sarafi
10. Cao

ریحان، موجب افزایش محتوای نسبی آب برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای پروتئین در مقایسه با گیاهانی که ملاتونین دریافت نکرده بودند، شد. به‌نظر می‌رسد این تنظیم‌کننده رشد، تنش فلزات سنگین را به‌طور عمده از طریق فعال‌کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی کاهش می‌دهد. ملاتونین تأثیر معنی‌داری بر میزان قندهای احیا و تجمع فلزات مس و روی در گیاه ریحان داشت و با کاهش میزان جذب این عناصر، از اثرات مخرب آن‌ها کاست. با توجه به اثرات مؤثر ملاتونین بر افزایش تحمل گیاه به تنش فلزات سنگین، انتظار می‌رود که استفاده از ملاتونین در کشاورزی باعث افزایش کیفیت و کمیت محصول و افزایش رشد گیاه شود. ازآنجایی‌که ملاتونین یک ماده ارزان و سازگار با محیط زیست است، کاربرد آن به‌عنوان یک محرک زیستی و تنظیم‌کننده رشد گیاهی می‌تواند یک روش مفید و مقرون‌به‌صرفه برای اهداف کشاورزی، کاهش اثرات نامطلوب تنش‌ها و رشد و تکثیر گیاه در شرایط مختلف باشد. علاوه بر این، سیگنال ملاتونین خارجی می‌تواند از طریق اندام‌های گیاه منتقل شود. در این مولکول بسیار فعال، پتانسیل عظیمی برای پژوهش، درک عملکردهای اساسی و فرصت‌هایی برای بهبود فرایندهای متنوع در کشت گیاهان و کشاورزی وجود دارد.

## ۷. تشکر و قدردانی

از قطب آنتی‌اکسیدان دانشگاه اصفهان بابت حمایت از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## ۸. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

## ۹. منابع

زمانی بابگهری، علی؛ علومی، حکیمه؛ مظفری، حسین و آروین، محمد جواد (۱۳۹۷، بهمن). بهبود پاسخ‌های رشدی و فیزیولوژیکی گیاه ریحان سبز (*Ocimum basilicum*) بر تیماردهی هم‌زمان ملاتونین با مقادیر بیش‌بود فلزات روی و مس. *ششمین کنگره ملی زیست‌شناسی و علوم طبیعی ایران*. تهران، https://civilica.com/doc/848890

عسگری‌لجایر، حمایت؛ متشرع‌زاده، بابک؛ ثواقبی‌فیروزآبادی غلامرضا و هادیان، جواد (۱۳۹۴). تأثیر مس و روی بر ویژگی‌های رشدی، غلظت برخی عناصر معدنی و ظرفیت انتقال عناصر به دمکرده و جوشانده گیاه دارویی بالنگوی شهری (*Lallemantia iberica* F. & C.M) کشت شده در شرایط گلخانه‌ای. *روابط خاک و گیاه (علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای)*. ۶(۲۲)، ۱۴۵-۱۶۰.

**References**

Ali, M., Parveen, A., Malik, Z., Kamran, M., Saleem, M. H., & Abbasi, G. H. (2022). Zn alleviated salt toxicity in *Solanum lycopersicum* L. seedlings by reducing Na+ transfer, improving gas exchange, defense system and Zn contents. *Plant Physiology Biochemistry, 186,* 52-63.

Ansari, T., Ikram, N., Najam-ul-Haq, M., Fayyaz, I., Fayyaz, Q., Ghafoor, I., & Khalid, N. (2004). Essential trace metal (Zinc, Manganese, Copper and Iron) levels in plants of medicinal importance. *Journal of Biological Sciences, 4*, 95-99.

Arnao, M. B., & Hernandez-Ruiz, J. (2013). Growth conditions determine different melatonin levels in *Lupinus albus* L. *Journal of Pineal Research*, *55*, 149-155.

Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2017). Melatonin and its relationship to plant hormones. *Annals of Botany, 121*, 195-207.

Asgari, H., Motesharezadeh, B., Savaghebi, G. R., & Hadiyan, J. (2015). Effect of copper and zinc on growth characteristics, concentration of some mineral elements and translocation capacities of elements into infusion and decoction of dragon's head (*Lallemantia iberica* F. & C.M) under greenhouse conditions. *Soil and Plant Interactions, 6(2),* 145-161. (In Persian).

Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Štefanić, P. P., Rončević, S., & Svedružić, L. P. (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 49*, 421-432.

Barman, D., Ghimire, O., Chinnusamy, V., Kumar, R., & Arora, A. (2019). Amelioration of heat stress during reproductive stage in rice by melatonin. *Indian Journal of Agricultural Sciences, 89*, 1151-1156.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*, 248-254.

Cao, Y. Y., Qi, C. D., Li, S., Wang, Z., Wang, X., Wang, J., Ren, S., Li, X., Zhang, N., & Guo, Y.D. (2019). Melatonin Alleviates Copper Toxicity via Improving Copper Sequestration and ROS Scavenging in Cucumber. *Plant Cell Physiology*, *60*(3), 562-574.

Chen, Q., Qi, W-b., Reiter, R. J., Wei, W., & Wang, B. (2009). Exogenously applied melatonin stimulates root growth and raises endogenous indoleacetic acid in roots of etiolated seedlings of *Brassica juncea*. *Journal of Plant Physiology, 166*, 324-328.

Dawood, M., Moursi, Y., Amro, A., Baenziger, P., & Sallam, A. (2020). Investigation of Heat-Induced Changes in the Grain Yield and Grains Metabolites, with Molecular Insights on the Candidate Genes in Barley. *Agronomy, 10*, 1730.

Do˘gru, A. (2021). Effects of heat stress on photosystem II activity and antioxidant enzymes in two maize cultivars. *Planta, 253*, 1-15.

Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., & Chen, L. (2018). Melatonin: a multifunctional factor in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1528.

Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry, 106*, 207-212.

Gu, Q., Xiao, Q., Chen, Z., & Han, Y. (2022). Crosstalk between melatonin and reactive oxygen species in plant abiotic stress responses: An Update. *International Journal of Molecular Sciences, 23*, 5666.

Hacışevki, A., & Baba, B. (2018). *An overview of melatonin as an antioxidant molecule: a biochemical approach. Melatonin*. London: IntechOpen Limited.

Hafeez, B., Khanif, Y., & Saleem, M. (2013). Role of zinc in plant nutrition-a review. *American Journal of Experimental Agriculture, 3*, 374.

Haji Boland, R., & Bonyadi, H. (2007). Absorption, utilization and recycling of two elements copper and manganese in toxic concentrations in three plants: rice, corn and sunflower. *Tehran University Science Journal, 32*, 11-20.

Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Barbanti, L., Aamer, M., Iqbal, M. M., Nawaz, M., Mahmood, A., & Ali, A. (2021). Heat stress in cultivated plants: Nature, impact, mechanisms, and mitigation strategies-A review. Plant Biosyst. *International Journal of Plant Biology, 155*, 211-234.

Hassan, M. U., Ghareeb, R.Y., Nawaz, M., Mahmood, A., Shah, A. N., Abdel-Megeed, A., Abdelsalam, N. R., Hashem, M., Alamri, S., Thabit, M. A., & Qari, S. H. (2022). Melatonin: A Vital Pro-Tectant for Crops against Heat Stress: Mechanisms and Prospects. *Agronomy, 12*, 1116.

Hodzic, E., Galijasevic, S., Balaban, M., Rekanovic, S., Makic, H., Kukavica, B., & Mihajlovic, D. (2021). The protective role of melatonin under heavy metal-induced stress in *Melissa Officinalis* L. *Turkish Journal of Chemistry*, *45*(3), 737-748.

Hu, J., Shi, G., Xu, Q., Wang, X., Yuan, Q., & Du, K. (2007). Effects of $Pb^{2+}$ on the active oxygen-scavenging enzyme activities and ultrastructure in *Potamogeton crispus* leaves. *Russian Journal of Plant Physiology, 54*, 414-419.

Imran, M., Khan, M. A., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M., Yun, B. W., Khan, A. L., & Lee, I. J. (2021). Melatonin ameliorates thermotolerance in soybean seedling through balancing redox homeostasis and modulating antioxidant defense, phytohormones and polyamines biosynthesis. *Molecules, 26*, 5116.

Jahan, M. S., Guo, S., Sun, J., Shu, S., Wang, Y., El-Yazied, A. A., Alabdallah, N. M., Hikal, M., Mohamed, M. H., Ibrahim, M. F., & Hasan M. M. (2021). Melatonin-mediated photosynthetic performance of tomato seedlings under high-temperature stress. *Plant Physiology and Biochemistry, 167*, 309-320.

Jayanthi, P., Senthilkumar, P., & Sivasankar, S. (2015). Interactive effects of copper and zinc accumulation in *Portulaca olearceastem* cuttings, through hydroponics. *Advances in Applied Science Research, 6*, 54-61.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2012). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, *3*, 65-76.

Ke, W., Xiong, Z. T., Chen, S., & Chen, J. (2007). Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two Rumex japonicus populations from a copper mine and an uncontaminated field site. *Environmental and Experimental Botany*, *59*, 59-67.

Lascano, H. R., Antonicelli, G. E., Luna, C. M., Melchiorre, M. N., Gómez, L. D., Racca, R. W., Trippi, V. S., & Casano, L. M. (2001). Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Functional Plant Biology*, *28*, 1095-1102.

Lin, Y. F., & Aarts, M. G. (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and molecular life sciences*, *69*, 3187-3206.

Murariu, M., Gradinaru, R. V., Mihai, M., Jurcoane, S., & Drochioiu, G. (2011). Unexpected effect of nickel complexes of some histidine-containing peptides on *Escherichia coli*. *Romanian Biotechnological Letters*, *16*, 6242-6246.

Murch, S., KrishnaRaj, S., & Saxena, P. (2000). Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Reports*, *19*, 698-704.

Pirooz, P., Amooaghaie, R., Ahadi, A., & Sharififar, F. (2021). Silicon-induced nitric oxide burst modulates systemic defensive responses of *Salvia officinalis* under copper toxicity. *Plant Physiology Biochemistry*, *162*, 752-761.

Posmyk, M. M., Kuran, H., Marciniak, K., & Janas, K. M. (2008). Presowing seed treatment with melatonin protects red cabbage seedlings against toxic copper ion concentrations. *Journal of pineal research*, *45*, 24-31.

Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop science*, *30*, 105-111.

Ryan, B. M., Kirby, J. K., Degryse, F., Harris, H., McLaughlin, M. J., & Scheiderich, K. (2013). Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. *New Phytologist*, *199*, 367-378.

Sairam, R.K., Rao, K.V., & Srivastava, G. (2002). Differential response of wheat genotypes to long-term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant science*, *163*, 1037-1046.

Saljougi, S., & Ranjbar, M. (2018). An investigating of the interaction of zinc and copper on the accumulation of elements, antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and malon dialdehyde in basil (*Ocimum basilicum*). *Plant process and function*, *8*(3), 339-357.

Sarafi, E., Tsouvaltzis, P., Chatzissavvidis, C., Siomos, A., & Therios, I. (2017). Melatonin and resveratrol reverse the toxic effect of high boron (B) and modulate biochemical parameters in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, *112*, 173-182.

Sestili, P., Ismail, T., Calcabrini, C., Guescini, M., Catanzaro, E., Turrini, E., Layla, A., Akhtar, S., & Fimognari, C. (2018). The potential effects of *Ocimum basilicum* on health: a review of pharmacological and toxicological stuies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *7*, 105-109.

Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, *67*, 2058-2070.

Sheng, K. S. (2007). Effect of copper on the photosynthesis and oxidative metabolism of *Amaranthas tricolor* seedling. *Agricultural Sciences in China*, *10*, 1182-119.

Shi, H., Chen, K., Wei, Y., & He, C. (2016). Fundamental issues of melatonin-mediated stress signaling in plants. *Frontiers in plant science*, *7*, 1124.

Somogyi, M. (1952). Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. *Journal of Biological Chemistry*, *2*, 200, 245.

Szafrańska, K., Reiter, R. J., & Posmyk, M. M. (2016). Melatonin application to *Pisum sativum* L. seeds positively influences the function of the photosynthetic apparatus in growing seedlings during paraquat-induced oxidative stress. *Frontiers in plant science*, *7*, 1663-1678.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Helton, P., & Reiter, R. J. (2007). Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signaling and Behavior*, *2*, 514-516.

Tang, Q., Li, C., Ge, Y., Li, X., Cheng, Y., Hou, J., & Li, J. (2020). Exogenous application of melatonin maintains storage quality of jujubes by enhancing anti-oxidative ability and suppressing the activity of cell wall-degrading enzymes. *Learning with Technologies, 127*, 109431.

Toor, R. K., & Savage, G. P. (2005). Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food research international, 38*, 487-494.

Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology, 64*, 88-93.

Wang, P., Sun, X., Chang, C., Feng, F., Liang, D., Cheng, L., & Ma, F. (2013). Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. *Journal of pineal research, 55*, 424-434.

Wang, P., Yin, L. H., Liang, D., Li, C., Ma, F. W., & Yue, Z. Y. (2012). Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. *Journal of Pineal Research*, *53*, 11-20.

Yadu, B., Chandrakar, V., Meena, R. K., Poddar, A., & Keshavkant, S. (2018). Spermidine and Melatonin Attenuate Fluoride Toxicity by Regulating Gene Expression of Antioxidants in *Cajanus cajan* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*, 1113-1126.

Zamani Babgohari, A., Oloumi, H., Mozafari, H., & Arvin, M. J. (2017, February). *Improvement of the growth and physiological responses of green basil plant (Ocimum basilicum) to the simultaneous treatment of melatonin with excess amounts of zinc and copper metals*. 6th National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran. Tehran. https://civilica.com/doc/848890. (In Persian).

Zeng, W., Mostafa, S., Lu, Z., & Jin, B. (2022). Melatonin-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in plant science, 13*, 847175.

Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., & Guo, Y. D. (2014). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of experimental botany, 66*, 647-656.

Zhang, R., Yue, Z., Chen, X., Wang, Y., Zhou, Y., & Xu, W. (2021). Foliar applications of urea and melatonin to alleviate waterlogging stress on photosynthesis and antioxidant metabolism in sorghum seedlings. *Plant Growth Regulation, 97*, 429-438.