

Original article

Effects of zone, drought and copper stresses and their interactions on some biochemical traits and grain yield of *Fumaria parviflora* Lam.

Mansoureh Tashakorizadeh¹, Pooran Golkar^{2*}, Mohammad Reza Vahabi²

1. Assistant Professor of Forests and Rangelands Research Department, Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran

2. Associate Professor, Department Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received 21 November 2023; Revised 28 January 2024; Accepted 10 February 2024

Extended abstract

Introduction

Copper (Cu^{2+}) is an essential element for the plant's metabolic processes, which is required by the plant for many enzymatic activities and playing a vital role in various physiological processes, growth, and development in small amounts. On the other hand, high concentrations of copper can be toxic to plants and high accumulation of this element in the soil prevents the elements needed for growth from reaching the aerial organs and prevents the normal growth of the plant. Drought stress also disrupts the growth and water relations in the plant and leads to a decrease in the efficiency of water consumption in the plant and causes a variety of physiological responses along with yield reduction. Soil contamination with heavy metals adversely affects plants growth, its development and metabolism in many parts of the world including arid and semi-arid regions. Multiple stresses caused a wide range of changes in plant physiology and metabolisms in plants. *Fumaria parviflora* Lam (Fumariaceae) is an annual herbaceous medicinal plant with branched stems that is cultivated in arid and semi-arid regions of Iran.

Materials and methods

This study was conducted as a factorial experiment based in a completely randomized design in greenhouse conditions with three replications. In this study, the independent and combined effects of different concentrations of copper element (control, 50, 150, 300 and 400 mg kg^{-1}) and different levels of drought stress (control, 50% and 75% based on soil moisture percentage discharge) was investigated on seed yield, malondialdehyde, soluble carbohydrates, proline, total anthocyanin content, total phenolics content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Fumaria Parviflora* Lam. The seeds of the plant were collected from two mining areas (Askari ravar and Rabor) from four zones (Z_1 , Z_2 , Z_3 and Z_4) in Kerman province.

Results and discussion

The results of this study showed that the lowest amount of total phenolics (89.3 mg GAE g^{-1} DW) and total flavonoids (8.1 mg QE g^{-1} DW) content was observed in the control treatment and the highest amounts for total phenolics (123.2 mg GAE g^{-1} DW) and total flavonoids (14.7 mgQE g^{-1} DW) were observed in severe drought stress. Here, the independent and combined effects of different concentrations of copper element and drought stress showed an increasing effect the biochemical traits. The interaction effect of 50 mg kg^{-1} of copper on drought stress was decreasing in grain yield, proline and anthocyanin content. At a concentration of 150 mg kg^{-1} , the copper element had an increasing effect on the drought stress for proline content, amount of soluble carbohydrates and

* Corresponding author: Poorandokht Golkar; E-Mail: golkar@iut.ac.ir



anthocyanin content. The interaction effects of copper and drought stress showed that in concentrations of 300 and 400 mg kg⁻¹, copper has an increasing effect in the presence of drought stress for proline, anthocyanin, total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity and malondialdehyde content, but had a reducing effect on soluble carbohydrates.

Conclusion

This study was studied by the first time on the combined effects of a heavy metal and drought stress on *F. parviflora*. Under moderate drought stress, *F. parviflora* Lam. was able to withstand the stress up to the concentration of 150 mg kg⁻¹ of copper by using defense mechanisms. Also, the areas with high concentration of copper (Z3 and Z4) in the studied mining areas were more tolerant to high copper stress and showed higher grain yield than the areas with lower concentration of copper (Z1 and Z2). The findings confirmed the use of *F. parviflora* as a suitable species for soils contaminated with low to moderate copper (50-150 mg kg⁻¹) under moderate drought stress. Based on these findings, it can be concluded that *F. parviflora* can deal with copper stress due to its active antioxidant defense system. It is possible to collect the seeds of this plant from areas with high concentration of copper (300 and 400 mg kg⁻¹) for the cultivation of *F. parviflora* under contaminated areas with copper stress.

Keywords: Anthocyanin, Flavonoid, Medicinal plants, Proline, Soil pollution

اثرات منطقه، تنش‌های خشکی، مس و اثرات متقابل آن‌ها بر برخی صفات بیوشیمیایی و عملکرد دانه گیاه شاه‌تره (*Fumaria parviflora* Lam.)

منصوره تشکری‌زاده^۱، پوران‌دخت گلکار^{۲*}، محمدرضا وهابی^۲

۱. استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان

۲. دانشیار گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک آنتوسیانین پرولین فلاونوئید گیاهان دارویی	مس یک عنصر ضروری برای فرایندهای متابولیکی گیاه است و فقط در مقادیر کم، مورد نیاز گیاه بوده و در مقادیر بالا سمی است. تنش خشکی نیز رشد طبیعی و روابط آبی در گیاه را مختل کرده و کارایی مصرف آب در گیاه را کاهش می‌دهد و سبب بروز انواع پاسخ‌های فیزیولوژیکی در گیاه می‌شود. در این مطالعه اثرات مستقل و ترکیبی غلظت‌های مختلف عنصر مس (شاهد، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سطوح مختلف تنش خشکی (شاهد، ۵۰٪ و ۷۵٪ بر اساس تخلیه درصد رطوبت خاک) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در این مطالعه صفات عملکرد دانه، میزان مالون‌دی‌آلدهید، میزان کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، محتوای آنتوسیانین، محتوای کل فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه شاه‌تره (<i>Fumaria parviflora</i> Lam.) اندازه‌گیری شد. بذر گیاه از چهار ناحیه با غلظت‌های مختلف مس واقع در دو منطقه معدنی مس عسکری راور و مس رابر در استان کرمان برداشت شد. بروز تنش خشکی بر گیاهان تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس باعث کاهش عملکرد دانه، محتوای آنتوسیانین و پرولین و در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم باعث افزایش محتوای پرولین، کربوهیدرات‌های محلول و آنتوسیانین و در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم باعث افزایش محتوای پرولین، آنتوسیانین، فنل و فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان مالون‌دی‌آلدهید و کاهش میزان کربوهیدرات‌های محلول شد. حضور توأم تنش خشکی متوسط و غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس برای گیاه شاه‌تره با استفاده از مکانیسم‌های دفاعی قابل‌تحمل بودند. از بین نواحی مورد مطالعه، نواحی ۳ و ۴ نسبت به غلظت‌های بالای مس تحمل بیشتری داشتند و عملکرد دانه بهتری را نسبت به سایر نواحی نشان دادند. پیشنهاد می‌شود، برای کشت گیاه دارویی شاه‌تره در مناطق تحت تنش، بذر این گیاه از نواحی با غلظت بالای مس (۳ و ۴) جمع‌آوری شود.

مقدمه

غلظت‌های بالا می‌توانند باعث کاهش عملکرد گیاه می‌شوند (Hassan et al., 2017). عنصر مس (Cu) یک فلز سنگین ریزمغذی است (Yadav, 2010) که به عنوان یک عنصر مؤثر در آنزیم‌های شرکت‌کننده در فتوسنتز و تنفس در گیاه شرکت می‌کند (Bost, 2016) و در غلظت‌های ۱۰-۱۶۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ گرم تر گیاه به عنوان یک عنصر ساختاری در پروتئین‌های گیاهی بوده و در فعالیت‌های

وجود فلزات سنگین در خاک و تأثیر آن‌ها بر گیاهان، یک نگرانی جدی در سراسر جهان است که چالش‌های مهمی را برای امنیت غذایی و پایداری محیط‌زیست ایجاد می‌کند (Bost, 2016). گیاهان دارویی نیز با خطر آلودگی با فلزات سنگین سمی که از طریق فعالیت‌های انسانی در محیط‌زیست آزاد می‌شوند، مواجه هستند. فلزات سنگین در خاک و اکوسیستم‌های آبی، به شدت پراکنده هستند و در فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیک و مولکولی گیاهان دخالت کرده و در

(2022). از آنجاکه در طبیعت، ترکیبی از تنش‌ها اتفاق می‌افتد، در این مطالعه اثر سمیت مس بر عملکرد دانه، میزان مالون دی آلدئید، میزان کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، محتوای آنتوسیانین، محتوای کل فنل و فلاونوئید و فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاه شاه‌تره (*Fumaria Parviflora* Lam.) تحت شرایط تنش خشکی در شرایط گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گیاه دارویی شاه‌تره، از دو منطقه معدنی مس عسکری راور (R1: طول جغرافیایی $30^{\circ}54'56''$ و عرض $61^{\circ}18'31''$ ، ارتفاع متوسط ۲۱۱۱ متر از سطح دریا) و مس رابر (R2: طول جغرافیایی $59^{\circ}17'56''$ و عرض $33^{\circ}51'32''$ ، ارتفاع متوسط ۲۱۷۶ متر از سطح دریا) در استان کرمان جمع‌آوری شد. غلظت عنصر مس در خاک برداشت‌شده از عمق ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری از ناحیه اطراف ریشه گیاهان شاه‌تره اندازه‌گیری شد و بر این اساس مناطق معدنی مورد مطالعه به چهار ناحیه (۱، ۲، ۳ و ۴) با غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مس تقسیم شدند. با روش نمونه‌برداری تصادفی طبقه‌بندی‌شده، بذر گیاه شاه‌تره از چهار ناحیه جمع‌آوری شد. قبل از کاشت، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفت تا از کم بودن عنصر مس در خاک اطمینان حاصل شود (جدول ۱).

فیزیولوژیک مؤثر است (Viera et al., 2019) اما در غلظت-های بالا اثرات نامطلوبی بر صفات فیزیولوژیک گیاه دارد (Chrysargyris et al., 2019). تنش خشکی یکی از مخرب‌ترین تنش‌های محیطی محسوب می‌شود که با تولید گونه‌های اکسیژن فعال، فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه را تحت تأثیر قرار داده و تولید گیاهان را بیش از هر تنش محیطی دیگری کاهش می‌دهد (Yang et al., 2018). جهت حفظ رشد بهینه گیاهان دارویی در معرض تنش‌هایی نظیر خشکی و فلزات سنگین، مکانیسم‌های تنظیم سلولی و مولکولی ویژه‌ای در این گیاهان تعبیه شده است (Takahashi and Shinozaki, 2019). گیاه دارویی شاه‌تره گل ریز (خانواده شاه‌تره Fumariaceae) گیاهی است علفی با ارتفاع ۴۰-۱۰ سانتی‌متر با ساقه‌های منشعب و افراشته و برگ‌های پنجه‌ای با طعم تلخ، سبز رنگ و بدون بو که تمام اندام‌های آن، به‌ویژه سرشاخه گل‌دار، به‌صورت تازه یا خشک با اهداف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Orhan et al., 2015). عکس‌العمل گیاهان در محیط‌هایی با چندین تنش مختلف، نسبت به محیط با تنش منفرد، متفاوت است (Mittler, 2006). اثرات غلظت‌های مختلف فلزات سنگین بر رشد و صفات فیزیولوژیک گیاهان به‌طور وسیعی مطالعه شده است (Chen et al., 2015; Muhammad et al., 2015) و همچنین مطالعاتی در مورد اثرات تنش‌های ترکیبی فلزات سنگین و سایر تنش‌ها مانند خشکی انجام شده است (Akhzari et al., 2022, Tashakorizadeh et al.,)

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در گلدان‌ها

Table 1. Physical and chemical properties of soil used in pots

خصوصیات شیمیایی Chemical properties							خصوصیات فیزیکی Physical properties			
مس Cu	پتاسیم K	فسفر P	نیتروژن N	pH	هدایت الکتریکی EC	کربن آلی OM	کلاس بافت Soil texture	رس Clay	سیلت Silt	شن Sand
-----mg.kg ⁻¹ -----							%			
0.65	176.11	6.73	0.18	7.4	1.24	0.86	Sandy loam	15.72	17	67.28

آبه در مقدار مشخصی آب مقطر حل و به‌طور یکنواخت به سطح خاک گلدان‌ها اسپری و به مدت دو ماه انکوباسیون شدند تا فرایند تعادل بین خاک و محلول بهتر صورت گیرد (Talukder et al., 2011). سطوح تنش خشکی نیز با آبیاری تا حد ظرفیت زراعی (D1: شاهد)، آبیاری تا ۵۰٪ ظرفیت زراعی (D2: تنش متوسط) و آبیاری تا ۲۵٪ ظرفیت زراعی (D3: تنش شدید) اعمال شد. این مطالعه در شرایط گلخانه

کشت، با ۵ بذر در هر گلدان پلی‌اتیلنی با قطر دهانه ۱۷ و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر و وزن خالی 270 ± 10 گرم در شرایط دمایی مناسب (۲۶ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در شب) با ۳ تکرار در شرایط گلخانه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. نمک محلول سولفات مس (در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم خاک) از منبع سولفات مس پنج

اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین محاسبه شد (Bates et al., 1973).

به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

عملکرد دانه

در خاتمه گلدهی، زمانی که دانه‌ها رسیده بودند، بوته‌ها کف‌بر شدند و وزن دانه در واحد سطح برحسب گرم در مترمربع محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین عصاره حاصل از بافت تر برگ به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و جذب محلول رویی (۵۵۰ نانومتر) با دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50) خوانده شد (Wagner, 1979).

اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی

غلظت مالون‌دی‌آلدهید

به ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراج‌شده از گیاه، ۴ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد (حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم حرارت داده شد و سپس بلافاصله در یخ قرار داده و شدت جذب (طول موج ۵۳۲ نانومتر) با دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50) اندازه‌گیری شد (Heath and Packer, 1968).

کربوهیدرات‌های محلول

جهت اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی استخراج‌شده را با ۵۰ میکرولیتر فنل ۸۰ درصد وزنی (حل‌شده در آب مقطر) مخلوط کرده و سپس ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به صورت عمود بر سطح مایع، به آن اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس در طول موج ۴۹۰ نانومتر با روش رنگ‌سنجی قرائت شد (Dubois et al., 1956).

اندازه‌گیری پرولین

عصاره استخراج‌شده از بافت تر گیاه، با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین-هیدرین مخلوط شد و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد به حمام آب یخ منتقل شد. به محلول حاصله، ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و ۲۰ ثانیه هم زده شد. لوله‌های آزمایش ثابت نگه داشته شدند تا دو فاز محلول از هم جدا شوند. فاز صورتی‌رنگ جدا و جذب آن (طول موج ۵۲۰ نانومتر) با دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50)

اندازه‌گیری محتوای کل فنول و فلاونوئید

از روش فولین سیوکالتیو با اعمال اندکی تغییرات برای اندازه‌گیری محتوای کل فنل استفاده شد (Singleton et al., 1999). بدین منظور ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج‌شده از گیاه به لوله‌آزمایشی حاوی ۲/۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد. از معرف فولین سیوکالتیو به میزان ۰/۴ میلی‌لیتر به مخلوط اضافه و به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و در نهایت ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن اضافه شد. بعد از گذشت یک ساعت جذب (۷۶۵ نانومتر) از اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50) خوانده شد.

روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم با اندکی تغییر برای تعیین غلظت فلاونوئید استفاده شد (Chang et al., 2002). بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول استخراج‌شده از گیاه، رقیق شد و با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از اتمام واکنش جذب مخلوط (۴۱۵ نانومتر) با استفاده از اسپکتروفتومتر (Varian Cary 50) اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی شاه‌تره، ۲ میلی‌لیتر DPPH 100 میکرومولار محلول در متانول با ۲ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف عصاره گیاه مخلوط شدند. مخلوط به دست آمده ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و در نهایت جذب نمونه‌ها (۵۱۷ نانومتر) توسط اسپکتروفتومتر (varian cary 50) اندازه‌گیری شد (Brand-Williams, 1995).

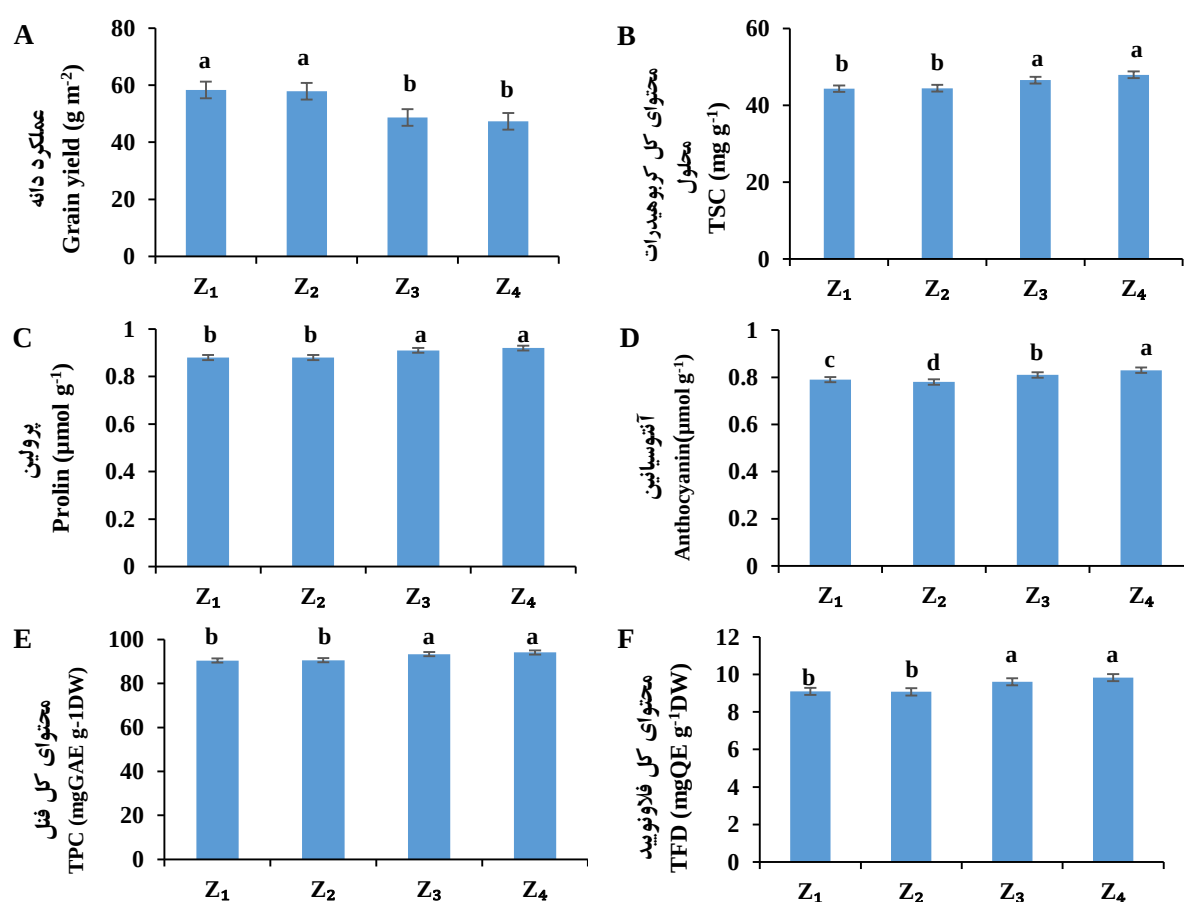
بیوشیمیایی را نشان دادند. عملکرد دانه در نواحی ۳ و ۴ به‌طور متوسط ۱۱۷٪ نسبت به نواحی ۱ و ۲ کاهش یافت. صفات بیوشیمیایی به‌طور متوسط ۱۱۷٪ برای پرولین، ۱۱۸٪ برای کربوهیدرات محلول، ۱۲۰٪ برای آنتوسیانین، ۱۱۴٪ برای محتوای کل فنل و ۱۱۵٪ برای محتوای کل فلاونوئید در نواحی ۳ و ۴ نسبت به نواحی ۱ و ۲ افزایش نشان دادند (شکل ۱)؛ که این می‌تواند به دلیل غلظت زیاد مس در نواحی ۳ و ۴ و تأثیر آن در طول زمان بر روی عملکرد دانه و صفات فیزیولوژیکی گیاه شاه‌تره باشد.

از نسخه ۹/۱ نرم‌افزار SAS و آزمون حداقل معنی‌داری ($p < 0.01$) به ترتیب برای تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها استفاده شد و در نهایت داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (SE) ارائه شدند.

نتایج و بحث

اثرات منطقه بر صفات مورد مطالعه

در تیمارهای بدون تنش، گیاهان حاصل از بذور جمع‌آوری شده از نواحی ۳ و ۴ نسبت به نواحی ۱ و ۲ سطح پایین‌تری از عملکرد دانه و سطوح بالاتری از صفات



شکل ۱. تأثیر نواحی بر عملکرد دانه (A)، محتوای کل کربوهیدرات محلول (B)، پرولین (C) آنتوسیانین (D)، محتوای کل فنل (E) و محتوای کل فلاونوئید در گیاه *F. parviflora*. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین نواحی مختلف (میانگین $\pm$ SE) هستند. Z₁: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، Z₂: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، Z₃: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم و Z₄: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم.

Fig. 1. The effect of zones on grain yield (A), total soluble carbohydrates (B), proline (C) anthocyanin (D), total phenolics content (E) and total flavonoids content (F) of *F. parviflora*. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between different zones (means $\pm$ SE). Z₁: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z₂: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z₃: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z₄: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu.

اثرات متقابل منطقه، مس و تنش خشکی بر صفات

مورد مطالعه

عملکرد دانه

بیشترین عملکرد دانه (گرم در مترمربع) در غلظت های صفر و ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و (۵۹/۱ در ناحیه ۱) مشاهده شد در حالی که گیاهان در خاک با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم کمترین عملکرد دانه را در همه نواحی نشان دادند (۳۴/۱ در ناحیه ۲؛ شکل ۲). غلظت های ۰ و ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم برای عملکرد دانه مناسب بود، اما با افزایش غلظت مس، کاهش معنی داری ($P \leq 0.01$) در عملکرد دانه مشاهده شد (جدول ۲). این کاهش در غلظت ۱۵۰ میلی گرم

مس بر کیلوگرم (۱۱۱٪)، کمتر از غلظت های ۳۰۰ (۱۳۸٪) در نواحی ۱ و ۲ و ۱۲۶٪ در نواحی ۳ و ۴ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم (۱۴۰٪) در نواحی ۱ و ۲ و ۱۲۹٪ در نواحی ۳ و ۴ نسبت به شاهد بود. نواحی ۳ و ۴ عملکرد دانه بهتری را تحت غلظت های بالای مس نشان دادند (شکل ۲). این یافته می تواند ناشی از سازگاری ژنتیکی و یا ادافیکی بالاتر دانه های منشأ گرفته از نواحی ۳ و ۴ برای مبارزه با سمیت مس باشد (Tashakorizadeh et al., 2022). نواحی ۳ و ۴ به عنوان بهترین مناطق برای جمع آوری بذر *F. parviflora* و کشت در خاک های آلوده به مس برای دستیابی به عملکرد دانه مورد انتظار، شناسایی شدند.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثرات منطقه، تنش های مس و خشکی و اثرات متقابل آن ها بر صفات بیوشیمیایی گیاه شاه تره

Table 2. Analysis of variance for effects of zones, Cu and drought stresses and their interactions on biochemical traits of *F. parviflora* under greenhouse condition.

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی dF	عملکرد دانه Grain yield	مالون دی آلدئید Malon dialdehyde	محتوای کل کربوهیدرات های محلول Total soluble carbohydrates	پرولین Proline
Drought	2	103.9**	0.087**	5674.8**	2.96**
Copper	4	518.8**	0.011**	12657.1**	5.76**
Zone	3	10.05**	0.01	230.6**	0.053**
Copper × Drought	8	13.6**	0.02**	1342.6**	0.43**
Zone × Copper	12	9.01**	0.001	35.001	0.011**
Zone × Drought	6	1.86	0.0004	2.61	0.005
Zone × Copper × Drought	24	1.18	0.0001	1.23	0.002
Residual	120	1.09	0.0005	4.03	0.006

Table 2. Continued

جدول ۲. ادامه

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی dF	آنتوسیانین Anthocyanin	محتوای کل فنل Total phenolics content	محتوای کل فلاونوئید Total flavonoids content	فعالیت انتی اکسیدانی Antioxidant activity
Drought	2	3.24**	47636.9**	396.48**	1633.4**
Copper	4	4.81**	16163.1**	113.7**	1186.2**
Zone	3	0.15**	23.08**	10.06**	45.67
Copper × Drought	8	0.79**	562.6**	138.73**	144.4**
Zone × Copper	12	0.004	335.7**	50.93**	15.92
Zone × Drought	6	0.003	27.12	2.96	6.4
Zone × Copper × Drought	24	0.0007	31.17*	6.39**	3.6
Residual	120	0.007	18.15	0.064	5.7

and $P < 0.01$, respective and ** are significant at $P < 0.05$ *

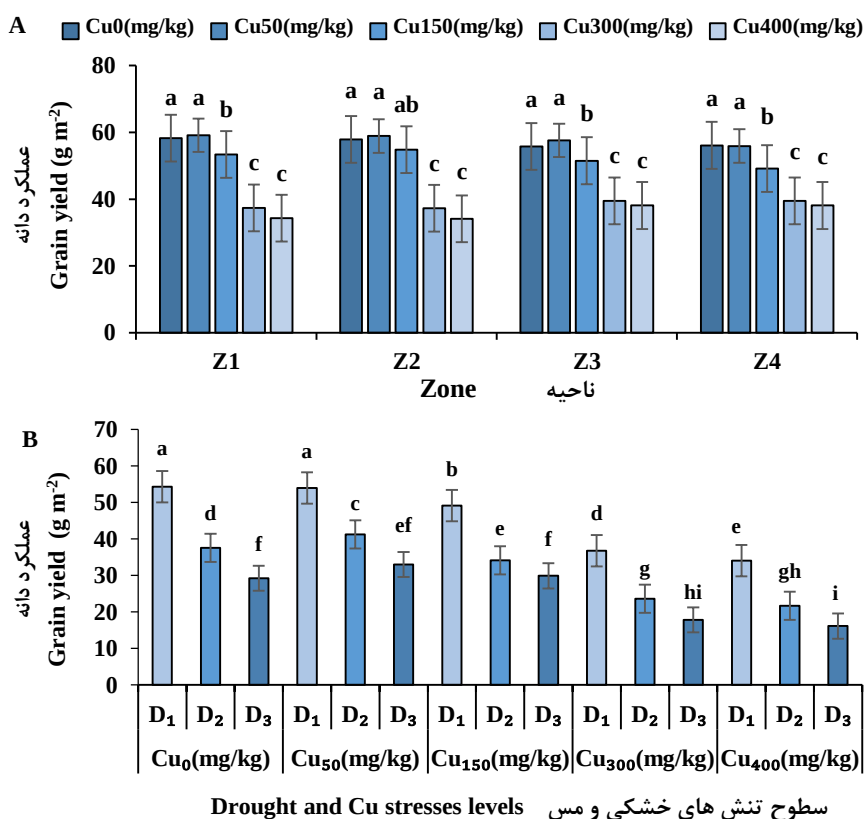
* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

دانه در پاسخ به تنش خشکی (خشکی متوسط و خشکی شدید) کاهش کمتری پیدا کرد. میانگین کاهش عملکرد دانه در خشکی متوسط و خشکی شدید در چهار ناحیه به ترتیب ۱۱۶٪ و ۱۳۳٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۲۶٪ و

در غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم مقاومت *F. parviflora* در برابر تنش خشکی بهتر بود. در این غلظت (۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) نسبت به سایر غلظت های مس (۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم)، عملکرد

مثبت ریز عناصر روی و آهن بر افزایش عملکرد دانه در گیاهان *Thymus vulgaris* (Pande et al., 2007) و *Ocimum basilicum* (Nasim and Dhir, 2010) بود. اثرات ترکیبی خشکی شدید و غلظت‌های بالای مس (۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) بر جذب و تخصیص مواد مغذی در بافت‌های گیاه به دلیل اختلال در هموستاز آب، تخصیص یونی و موانع نفوذپذیری سلول تأثیر گذاشته و منجر به کاهش قابل توجه در عملکرد دانه می‌شوند. همچنین، در چنین شرایطی، مکانیسم‌های دفاعی فقط می‌توانند گیاه را تا پایان فصل رشد حفظ کنند و عملکرد دانه در این سطوح تنش به شدت کاهش می‌یابد (Giannakoula et al., 2021).

۱۴۶٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۴۴٪ و ۱۵۴٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم نسبت به تیمار بدون تنش بود (شکل B۲). عملکرد دانه (گرم در مترمربع) در ترکیب مس (میلی گرم در کیلوگرم) و تنش خشکی در غلظت‌های صفر و ۵۰ مس و تحت تیمار شاهد خشکی (۵۹/۱) و کمترین مقدار در غلظت ۴۰۰ مس تحت تیمار خشکی شدید به‌طور متوسط در چهار ناحیه مشاهده شد (۱۵/۸، شکل B۲). می‌توان نتیجه گرفت که در غلظت‌های کم، مس به‌عنوان یک ریزمغذی عمل می‌کند و از طریق افزایش ظرفیت نگهداری آب و تجمع در زیست‌توده باعث افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شود (Hasanuzzaman et al., 2017). این یافته‌ها مشابه اثرات



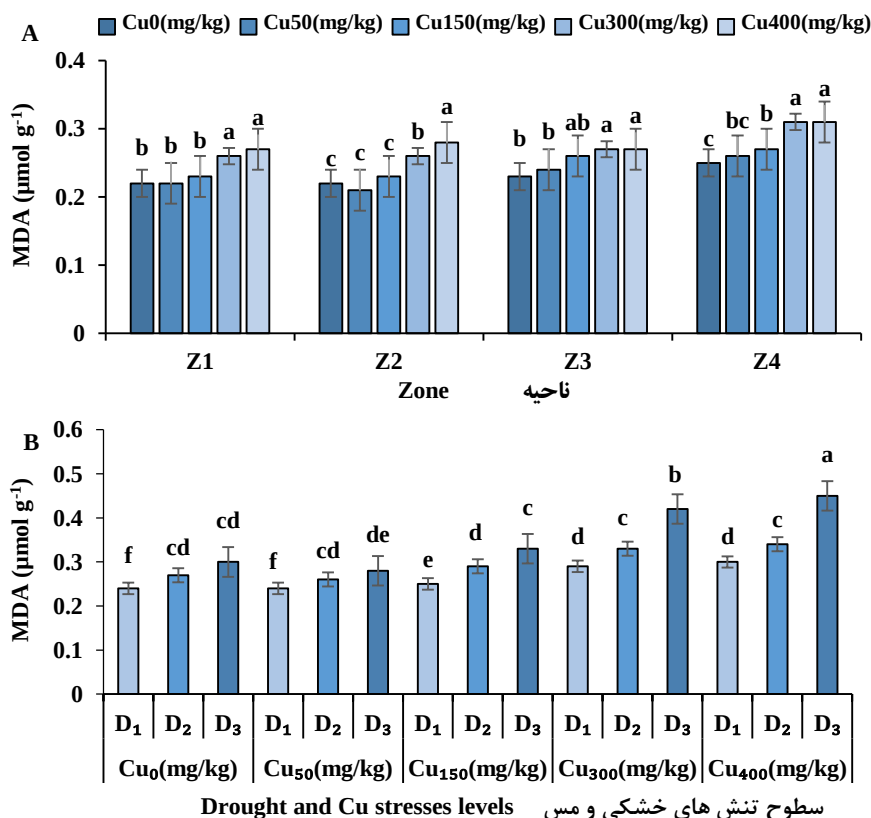
شکل ۲. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر عملکرد دانه در *F. parviflora* (A). میانگین اثرات متقابل مس و تنش خشکی بر عملکرد دانه در *F. parviflora* (B). D₁: شاهد، D₂: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D₃: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم. گروه‌های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

Fig. 2. The means for the interaction effects of Cu and zone on grain yield of *F. parviflora* (A). The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on grain yield (B). D₁: Control, D₂: moderate drought stress; D₃: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

مالون‌دی‌آلدهید

بر کیلوگرم و ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم (۰/۳) در ناحیه ۴، (شکل ۳A) و حداقل محتوای آن در ۰ و ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم (۰/۲۱) در نواحی ۱ و ۲، (شکل ۳A) بود. غلظت-های بالای فلزات سنگین نظیر مس، باعث تحریک غشای کلروپلاستی (در نتیجه افزایش پراکسیداسیون و تجزیه لیپید-های غشایی) شده و تولید MDA را بالا می‌برند (Orcutt and Nilsen, 2000). مشابه نتایج ما، غلظت بالای مس باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید و به دنبال آن تولید MDA در گیاه *Withania somnifera* شد (Khatun et al., 2008).

غلظت بالای مس در خاک به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.01$) باعث افزایش محتوای MDA در برگ‌های *F. parviflora* در مقایسه با شاهد شد (جدول ۲). محتوای MDA به‌طور متوسط ۱۰۴٪ در ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۸٪ در ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۲۱٪ در ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم و ۱۲۴٪ در ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم در تمام مناطق در برگ‌ها افزایش یافت. حداکثر محتوای MDA (میکرومول در گرم) در برگ‌ها در ۳۰۰ میلی‌گرم مس



شکل ۳. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر محتوای مالون‌دی‌آلدهید *F. parviflora* (A). میانگین اثرات متقابل تنش خشکی بر محتوای مالون‌دی‌آلدهید *F. parviflora* (B). D1: شاهد، D2: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم. گروه‌های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

Fig. 3. The means for the interaction effects of Cu and zone on malondialdehyde content of *F. parviflora* (A). The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on malondialdehyde (B). D1: Control, D2: moderate drought stress; D3: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

۱۰۹٪ در ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۵٪ در ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۷٪ در ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر

افزایش مس منجر به افزایش قابل‌توجهی در محتوای MDA به میزان ۱۱۳٪ در صفر میلی‌گرم مس بر کیلوگرم،

محلول تحت غلظت‌های بالای مس در *Trigonella foenum graecum* (Dowidar et al., 2013) و *Kandelia obovate* (Zhao et al., 2016) گزارش شده است.

اثر متقابل تنش‌های مس و خشکی باعث افزایش محتوای کربوهیدرات محلول به میزان ۱۴۲٪ درصفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۵۵٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۵۷٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۹٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۱۲٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در خشکی متوسط و ۱۶۰٪ درصفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۶۸٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۷۴٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۹۴٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۹۲٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در خشکی شدید (به‌طور متوسط در چهار ناحیه؛ شکل B۴) شد. غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم تحت خشکی شدید بیشترین مقدار کربوهیدرات محلول برحسب میلی گرم در گرم وزن خشک (۱۱۲/۸۳) و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در شرایط خشکی شدید کمترین مقدار را در چهار ناحیه نشان داد (۳۸/۶۲، شکل B۴). با تجمع مس در سلول‌های گیاه، انتقال آب به سلول‌های برگ کاهش می‌یابد و گیاه به‌عنوان یک روش سازگاری به تنش، اقدام به تولید کربوهیدرات‌های محلول کرده و باعث تنظیم پتانسیل آب در بخش سیتوزول و شرایط اسمزی سلول می‌شود (Allowey, 2010).

بررسی منابع نشان می‌دهد که مطالعه‌ای که اثرات متقابل تنش‌های مس و خشکی بر روی میزان کربوهیدرات‌های محلول در گیاه را نشان بدهد انجام نشده است اما نتایج تحقیقات انجام شده بیانگر افزایش کربوهیدرات‌های محلول در اثر وقوع تنش خشکی در گیاهان داروئی نظیر *Ocimum basilicum* (Khalid 2006) و همین‌طور تنش عنصر مس در گیاه *Cucumis sativus* (Alaoui-Sossé et al., 2004) بود که نشان‌دهنده تشدید هیدرولیز نشاسته در شرایط تنش و افزایش غلظت‌های غیرعادی در کربوهیدرات‌ها بود (Khalid 2006).

پرولین

بیشترین مقدار پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) تحت غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم (۱/۳۳ در ناحیه ۱) و کمترین مقدار درصفر میلی گرم مس بر کیلوگرم در همه مناطق بود (۰/۷۹ در ناحیه ۴؛ شکل A۵). با افزایش سطح

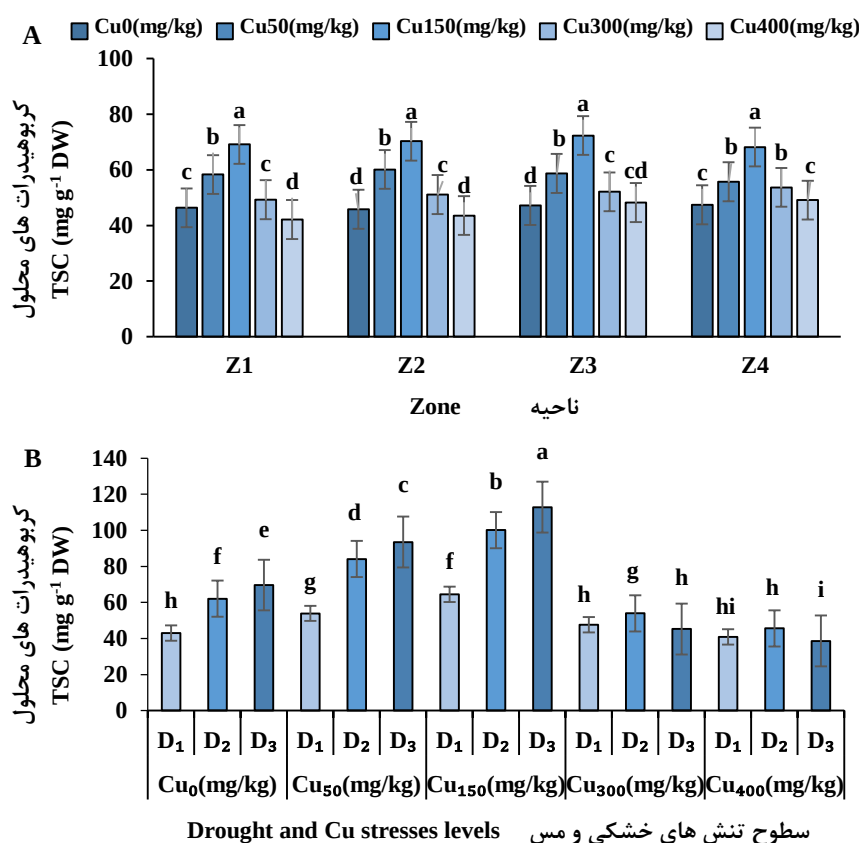
کیلوگرم و ۱۱۹٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در خشکی متوسط و ۱۲۱٪ در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۸٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۳۰٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۴۷٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۵۳٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در خشکی شدید (به‌طور متوسط در چهار ناحیه، شکل B۳) شد. غلظت ۴۰۰ مس و خشکی شدید بیشترین مقدار MDA برحسب میکرومول بر گرم (۰/۴۵) و صفر و ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم تحت تیمار شاهد خشکی کمترین مقدار (۰/۲۱، شکل B۳) را نشان دادند. تنش‌های حاصل از خشکی و غلظت‌های بالای مس، باعث تولید انواع مختلف اکسیژن فعال نظیر H_2O_2 می‌شوند و این امر باعث بالا رفتن میزان MDA با افزایش تنش می‌شود و میزان MDA بیشتر، سبب جدی‌تر شدن آسیب اکسیداتیو می‌شود. این وضعیت در نتایج ما دیده شد چراکه در غلظت‌های بالای مس (۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) نسبت به غلظت‌های پایین (۵۰ و ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) میزان MDA بیشتری دیده شد که نشان می‌دهد گیاه شاه‌تره تا غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، تنش‌های وارده را تحمل کرد، ولی غلظت‌های بالا باعث آسیب بیشتر به گیاه شدند. مشابه نتایج ما، بروز تنش‌های غیر زیستی در گیاهان *Olive sp* و *Populus sp* باعث افزایش MDA شدند (Petridis et al., 2012).

محتوای کل کربوهیدرات‌های محلول

بالا رفتن غلظت مس تا ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$) در محتویات کربوهیدرات محلول برگ‌های شاه تره مشاهده شد (جدول ۲). در مقایسه با شاهد، حداکثر محتوای کربوهیدرات محلول (میلی گرم در گرم وزن خشک) در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم (۶۸/۰۳) در ناحیه ۳ و حداقل آن در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم (۳۶/۵۵) در ناحیه ۱؛ شکل A۴) در تمام مناطق بود. در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم مس، محتوای کربوهیدرات محلول به‌طور متوسط ۱۵۳٪ نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل A۴). تولید اسمولیت‌هایی مانند کربوهیدرات‌های محلول یک راهکار تدافعی برای گیاهانی که در معرض غلظت‌های بالای مس قرار گرفته‌اند است اما غلظت‌های بیشتر از حد مس باعث القای تنش اکسیداتیو در بافت‌های گیاهی شده و تولید کربوهیدرات‌های محلول را در گیاه کاهش می‌دهند (Allowey, 2010). به‌طور مشابه، کاهش کربوهیدرات

(2013). در غلظت های بالای مس، پرولین به عنوان یک ترکیب دفاعی عمل کرده و سمیت فلز را توسط نقش کلاتور فلزی و به عنوان متعادل کننده پروتئین کاهش می دهد (Sharma et al., 2016). مشابه این نتایج، افزایش محتوای پرولین تحت تنش مس در گیاهان *Cinnamomum camphora* (Zhou et al., 2019) و *Astragalus tragacantha* (et al., 2019) گزارش شده است.

مس تا ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، محتوای پرولین در برگ *F. parviflora* به طور معنی داری ($p < 0.01$) افزایش یافت (جدول ۲). میانگین محتوای پرولین تحت تیمارهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در نواحی ۳ و ۴ کمتر از (۱۱۸٪) مقادیر متوسط پرولین در نواحی ۱ و ۲ بود (شکل ۴A). پرولین با عملکرد مستقیم یا توسط بیوسنتز پپتیدهای کلات کننده باعث سم زدایی مس در برگ های شاه تره در غلظت های بالای مس می شود (Alfadul and Al-fredan.,).



شکل ۴. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر محتوای کربوهیدرات محلول در *F. parviflora* (A). میانگین اثرات متقابل مس و تنش خشکی بر محتوای کربوهیدرات محلول در *F. parviflora* (B). D1: شاهد، D2: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم. گروه های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

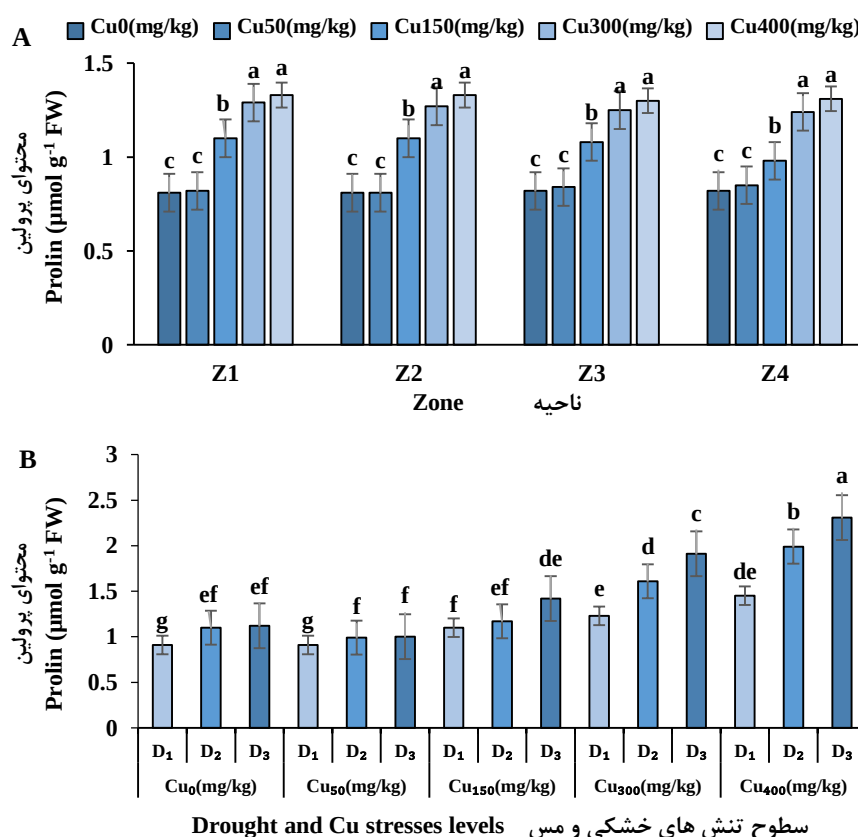
Fig. 4. The means for the interaction effects of Cu and zone on total soluble carbohydrates of *F. parviflora* (A). The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on total soluble carbohydrates (B). D1: Control, D2: moderate drought stress; D3: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

پرولین در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۵٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۲۰٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر

هر دو تیمار خشکی و مس اثر افزایشی بر محتوای پرولین داشتند (شکل ۴B). خشکی متوسط باعث افزایش ۱۲۰٪

صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم تحت تیمار شاهد خشکی در چهار منطقه (۰/۷۹، شکل B۵) مشاهده شد. تنش حاصل از خشکی و غلظت بالای مس باعث تولید پرولین توسط گیاهان دارویی نظیر شاه‌تره به‌عنوان یک پاسخ غیر آنزیمی به تنش‌ها می‌شود (Szabados and Savoure, 2010) و درواقع، پرولین نقش‌های مختلفی نظیر سازگاری، بازیابی و سیگنال دهی را در هنگام مبارزه با تنش‌های مس و خشکی در گیاهان دارویی نظیر شاه‌تره ایفا می‌کند (Fidalgo et al., 2013). اثرات متقابل تنش‌های مس و خشکی در گیاه *Zea mays* نیز گزارش شده است و نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار

کیلوگرم، ۱۳۴٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۳۸٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و خشکی شدید باعث افزایش پرولین به مقدار ۱۲۲٪ در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۷٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۴۶٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۵۹٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۶۰٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در مقایسه با شاهد (به‌طور متوسط در چهار ناحیه؛ شکل B۵) شد. بالاترین مقدار محتوای پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)، در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم تحت تیمار خشکی شدید در همه نواحی (۲/۳۱) ثبت شد، اما کمترین آن در



شکل ۵. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر محتوای پرولین در *F. parviflora* (A). میانگین اثرات متقابل مس و تنش خشکی بر محتوای پرولین در *F. parviflora* (B). D1: شاهد، D2: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم. گروه‌های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

Fig. 5. The means for the interaction effects of Cu and zone on proline content of *F. parviflora* (A). The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on proline (B). D1: Control, D2: moderate drought stress; D3: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

(۰/۷۸، شکل ۶B) به‌طور متوسط در همه نواحی ثبت شد. در اثر متقابل غلظت ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم مس با تنش‌های متوسط و شدید خشکی، مس باعث افزایش اثر تنش خشکی بر تولید آنتوسیانین نشد. در اینجا مس به‌عنوان یک ریزمغذی عمل کرد و با بهبود فرایندهای مورفوفیزیولوژیک در گیاه باعث مقاومت شاه‌تره به خشکی شد (Hasanuzzaman et al., 2017). و عنصر مس در غلظت‌های کم اثرات منفی تنش خشکی را بر گیاه شاه‌تره به حداقل رساند (Waraich et al., 2011). ولی در غلظت‌های بالای مس و تنش خشکی، آنتوسیانین‌ها در اندام‌های رویشی تجمع می‌یابند (Landi et al., 2015). و این مشابه نتایج ما در این تحقیق است زیرا در غلظت‌های بالای مس (۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم)، گیاهان رشد یافته تحت تیمارهای خشکی متوسط و خشکی شدید اثر مس و تنش خشکی را با هم نشان دادند و اثر افزایشی بین دو تنش مشاهده شد.

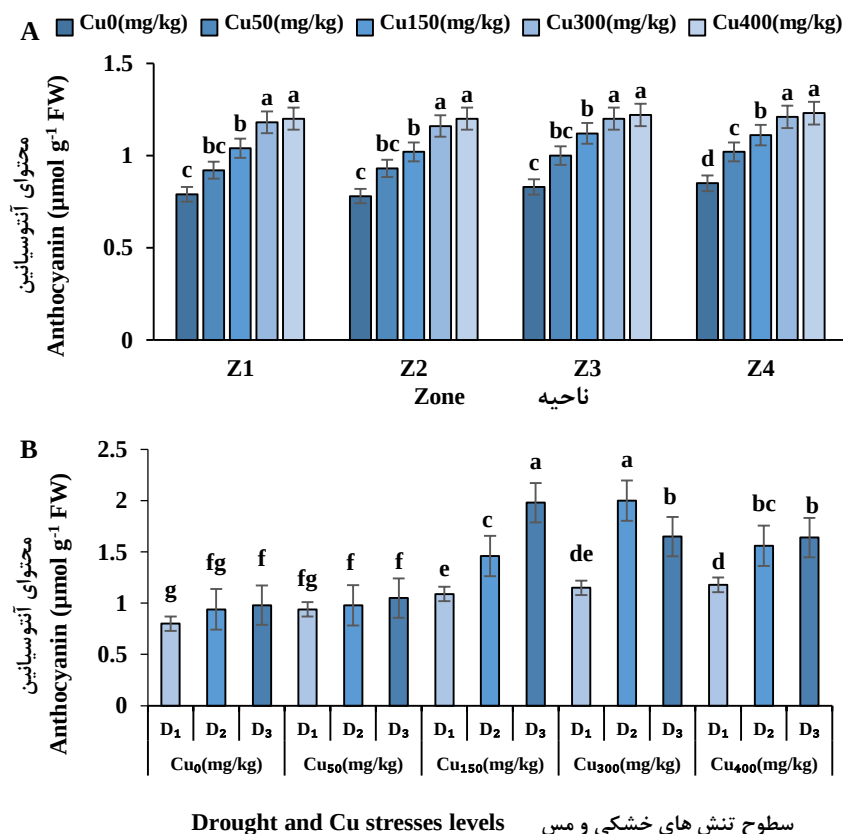
محتوای کل فنل و فلاونوئید

محتوای کل فنل و فلاونوئید در نواحی ۱ و ۲ به ترتیب ۱۱۲٪ و ۱۱۵٪ بیشتر از نواحی ۳ و ۴ تحت غلظت‌های بالای مس (۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) بودند. حداقل محتوای کل فنل (میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک) و فلاونوئید (میلی گرم کوئرستین در گرم وزن خشک) در گیاهانی که بدون غلظت مس در خاک رشد کردند مشاهده شد (۸۹/۳ در ناحیه ۲ برای فنل و ۹/۱ در ناحیه ۱ برای فلاونوئید، شکل ۷A، B). اما این مقادیر به‌طور مداوم با افزایش سطح مس در خاک افزایش یافت و حداکثر محتوای آن‌ها در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم (۱۲۵/۱) در ناحیه ۲ برای فنل و ۱۱/۸ در ناحیه ۱ برای فلاونوئید، شکل ۷A، B) مشاهده شد. در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم محتوای کل فنل، ۱۳۵٪ و فلاونوئید ۱۲۸٪، در مقایسه با شاهد افزایش یافت. در غلظت‌های بالای مس، آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر فنل و فلاونوئید به‌عنوان واسطه‌هایی برای از بین بردن گونه‌های مضر ROS در گیاهان عمل کرده (Bistgani et al., 2019; Chen et al., 2019) و باعث افزایش تحمل گیاه به عوامل تنش‌زا می‌شوند (Wang et al., 2019). این یافته‌ها مشابه گزارش‌های قبلی روی گیاهان *Mentha spicata* (Chrysargyris et al., 2019) و *Withania somnifera* L. (Singh et al., 2018) و *Gymnema sylvestre* (Chung et al., 2019) بود.

مس به‌تنهایی سطح پرولین را تغییر نداد، درحالی‌که تیمار ترکیبی مس و خشکی محتوای پرولین را در گیاه ذرت افزایش داد (Cetinkaya et al., 2014). در مطالعه‌ای دیگر که روی گیاه *Nicotiana benthamiana* صورت گرفت، کمبود آب در سطوح بالای غلظت مس، محتوای پرولین را به‌طور چشمگیری افزایش داد (Ku et al., 2012) که نشان می‌دهد عنصر مس با افزایش آمینواسیدهایی نظیر پرولین از گیاه در برابر کم‌آبی و تنش خشکی محافظت می‌کند (Ku et al., 2012).

آنتوسیانین

در مطالعه حاضر، افزایش سطح غلظت مس در خاک تا ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، محتوای آنتوسیانین را در برگ‌ها افزایش داد (شکل ۸A). در مقایسه با شاهد، بیشترین محتوای آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن تر) در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم (۱/۲۳ در ناحیه ۳) و کمترین آن در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم در تمام نواحی بود (۰/۷۸ در ناحیه ۲، شکل ۸A). با بالا رفتن غلظت مس، فنیل‌آلانین آمونیوم-لیاز تحریک شده و تولید آنتوسیانین در گیاه شاه‌تره افزایش می‌یابد و در نتیجه آنتوسیانین به فلز مس باند شده و باعث کاهش سمیت ناشی از مس می‌شود (Kumar et al., 2012). در اینجا آنتوسیانین‌ها به‌عنوان سیستم‌های غیر آنزیمی دفاعی عمل کرده و در معرض غلظت‌های زیاد مس فعال و باعث حفظ گیاه در مقابل سمیت می‌شوند (Posmyk et al., 2009). این نتایج مشابه اثرات مس بر گیاهان *Arabidopsis* (Baek et al., 2012) و *Capsicum annum* L. (Stavreva Veselinovska et al., 2010) است. محتوای آنتوسیانین، ۱۱۸٪ در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۶٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۳۶٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۶۶٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۳۱٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در خشکی متوسط و ۱۲۷٪ در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۳٪ در ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۷۳٪ در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، ۱۴۲٪ در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و ۱۳۶٪ در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در خشکی شدید (به‌طور متوسط در چهار ناحیه؛ شکل ۶B) افزایش یافت. بیشترین مقدار آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن تر) در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و خشکی متوسط (۲/۱) و کمترین مقدار در صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم و شاهد خشکی

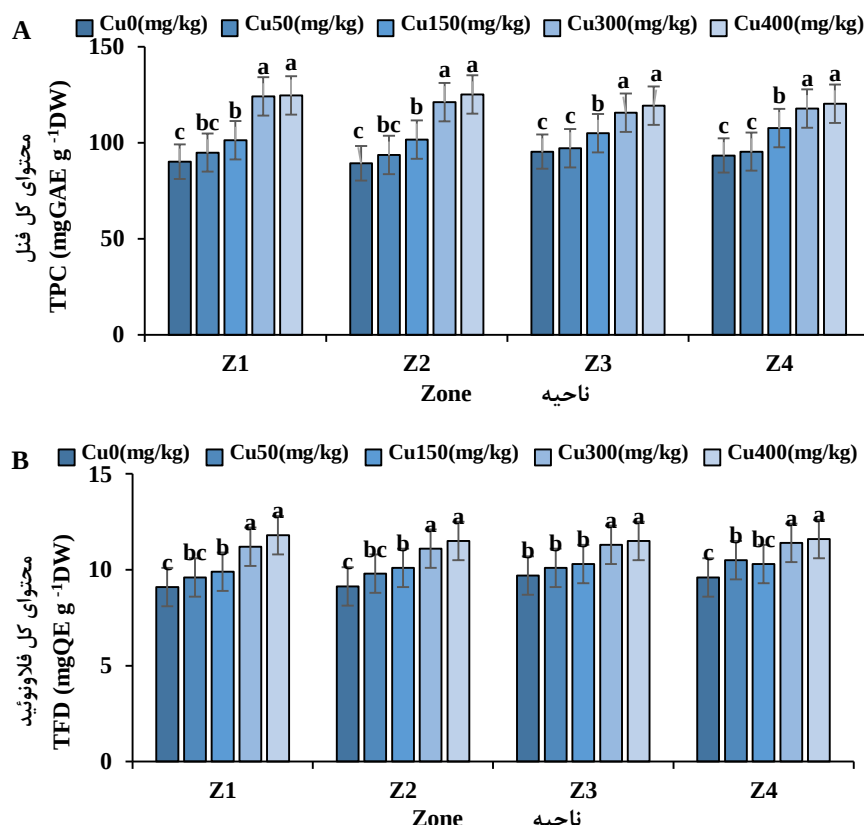


شکل ۶. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر محتوای آنتوسیانین در *F. parviflora* (A). میانگین اثرات متقابل تنش خشکی بر محتوای آنتوسیانین در *F. parviflora* (B). D1: شاهد، D2: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم. گروه‌های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

Fig. 6. The means for the interaction effects of Cu and zone on anthocyanin content of *F. parviflora* (A). The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on anthocyanin (B). D1: Control, D2: moderate drought stress; D3: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

۱۳۰٪ و در نواحی بالا (نواحی ۳ و ۴) ۱۱۷٪ نسبت به شاهد افزایش داشت و در تنش شدید خشکی در نواحی پایین (نواحی ۱ و ۲) ۱۳۹٪ و در نواحی بالا (نواحی ۳ و ۴) ۱۲۴٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد. حداقل مقادیر کل فنل (میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک) در یک محیط بدون تنش (۹۰/۲ در ناحیه ۱) و حداکثر آن در ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم تحت خشکی شدید در تمام نواحی مشاهده شد (۱۹۴ در ناحیه ۲، جدول ۳).

تأثیر متقابل مس و خشکی بر محتوای کل فنل معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). محتوای کل فنل در غلظت‌های ۵۰ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم مس در شرایط تنش خشکی متوسط و شدید به ترتیب ۱۲۰٪ و ۱۲۷٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد. تأثیر متقابل مس و خشکی و ناحیه در غلظت‌های زیاد مس (۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$) (جدول ۲). در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم مس و در شرایط تنش متوسط خشکی، محتوای کل فنل در نواحی پایین (نواحی ۱ و ۲)



شکل ۷. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر محتوای فنل (A)؛ و فلاونوئید در *F. parviflora* (B). D1: شاهد، D2: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم. گروه های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

Fig. 7. The means for the interaction effects of Cu and zone on total phenolics (A) and total flavonoids (B) of *F. parviflora*. The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on total flavonoids (B) D1: Control, D2: moderate drought stress; D3: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

(نواحی ۱ و ۲) ۱۵۹٪ و در نواحی بالا (نواحی ۳ و ۴) ۱۵۰٪ نسبت به شاهد افزایش نشان دادند و در تنش شدید خشکی در نواحی پایین (نواحی ۱ و ۲) ۱۶۱٪ و در نواحی بالا (نواحی ۳ و ۴) ۱۷۲٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۳). در اینجا، محتوای کل فنل و فلاونوئید تحت اثر متقابل تنش های مس و خشکی نسبت به اثرات مستقل تنش ها، روند صعودی نشان دادند؛ بنابراین، بروز تنش های ترکیبی مس و خشکی لزوماً اثرات نامطلوبی بر متابولیسم متابولیت های ثانویه ندارد، زیرا گیاه *F. parviflora* قادر به فعال کردن تولید متابولیت های ثانویه برای دفاع از آسیب استرس اکسیداتیو از طریق مهار ROS بود (Sharma et al., 2019).

تأثیر متقابل مس و خشکی بر محتوای کل فلاونوئید معنی دار ($P \leq 0.01$) بود (جدول ۲). محتوای کل فلاونوئید در غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم مس در شرایط تنش خشکی متوسط و شدید به ترتیب ۱۲۹٪ و ۱۴۳٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم در شرایط تنش خشکی متوسط و شدید محتوای کل فلاونوئید به طور متوسط در چهار ناحیه به ترتیب ۱۲۹٪ و ۱۴۷٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد. تأثیر متقابل مس و خشکی و محیط در غلظت های زیاد مس (۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم) معنی دار ($P \leq 0.01$) بود. در غلظت های ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و در شرایط تنش متوسط خشکی محتوای کل فلاونوئید در نواحی پایین

جدول ۳. مقایسه میانگین محتوای کل فنل و فلاونوئید در *F. parviflora* تحت تأثیر اثرات متقابل منطقه و تنش‌های خشکی و مس
 Table 3. Comparison of the average content of total phenolics and total flavonoids in *F. parviflora* under the combined effect of zone, drought and copper stresses.

ناحیه Zone	مس Copper (mg kg ⁻¹)	محتوای کل فنل (TPC) mg GAE g ⁻¹ DW			محتوای کل فلاونوئید (TFD) mg QE g ⁻¹ DW		
		D1 (شاهد)	D2	D3	D1	D2	D3
Z ₁	0	90.2 ± 1.9	112.76 ± 2.2	118.49 ± 2.7	8.8 ± 0.2	10.6 ± 0.2	12.7 ± 0.1
	50	92.9 ± 2.2	117.9 ± 1.85	122.3 ± 2.3	9.3 ± 0.2	11.7 ± 0.05	12.4 ± 0.1
	150	104.5 ± 1.7	131.9 ± 2.2	134.4 ± 2.7	9.62 ± 0.1	12.5 ± 0.1	13.5 ± 0.3
	300	123.4 ± 2.4	166.1 ± 3.1	186.83 ± 3.6	10.8 ± 0.1	16.3 ± 0.01	17.4 ± 0.1
	400	125.1 ± 2.4	170.6 ± 3.5	188.1 ± 2.9	11.4 ± 0.1	17.8 ± 0.1	17.9 ± 0.8
Z ₂	0	90.35 ± 0.6	113.2 ± 1.5	118.9 ± 2.6	8.8 ± 0.1	10.5 ± 0.1	12.9 ± 0.1
	50	93.7 ± 4	115.42 ± 2.5	125.24 ± 2.2	8.8 ± 0.6	11.9 ± 0.1	12.6 ± 0.1
	150	103.3 ± 0.9	129.9 ± 2.3	141.3 ± 3.5	9.8 ± 0.1	13 ± 0.1	13.7 ± 0.1
	300	121.8 ± 0.8	167.5 ± 3.3	187.8 ± 2.6	11.3 ± 0.1	17.1 ± 0.1	18.2 ± 0.03
	400	123.6 ± 2.9	170.3 ± 2.8	194.6 ± 3.5	11.1 ± 0.1	17.3 ± 0.1	18.8 ± 0.2
Z ₃	0	94.5 ± 2.1	116.6 ± 0.9	122.9 ± 0.8	9.5 ± 0.02	12.8 ± 0.1	13.02 ± 0.2
	50	97.81 ± 2.4	120.8 ± 2.7	127.3 ± 3	9.8 ± 0.2	12.6 ± 0.1	13.5 ± 0.05
	150	106.2 ± 3.1	136.2 ± 3	143.3 ± 2.9	10.1 ± 0.1	13.7 ± 0.1	14.3 ± 0.5
	300	116.5 ± 2.4	148.2 ± 2.5	154.1 ± 1.9	10.6 ± 0.03	15.9 ± 0.02	16.5 ± 0.1
	400	120.3 ± 1.8	151.4 ± 2.4	156.2 ± 2.7	10.8 ± 0.1	16.3 ± 0.1	17.1 ± 0.2
Z ₄	0	100.5 ± 1.9	120.4 ± 1.5	125.7 ± 0.6	9.7 ± 0.1	12.9 ± 0.1	13.1 ± 0.1
	50	102.6 ± 2.1	118 ± 3.3	125.5 ± 3	10.1 ± 0.1	12.9 ± 0.1	13.9 ± 0.1
	150	108.9 ± 2.7	130.8 ± 2.7	139.25 ± 2.4	9.8 ± 0.1	13.3 ± 0.1	13.9 ± 0.1
	300	119.1 ± 2.6	146.9 ± 1.9	158.5 ± 2	10.6 ± 0.02	15.9 ± 0.04	16.4 ± 0.06
	400	122.6 ± 0.9	150.8 ± 2.6	163.1 ± 1.2	10.6 ± 0.1	16.02 ± 0.1	17.5 ± 0.2

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

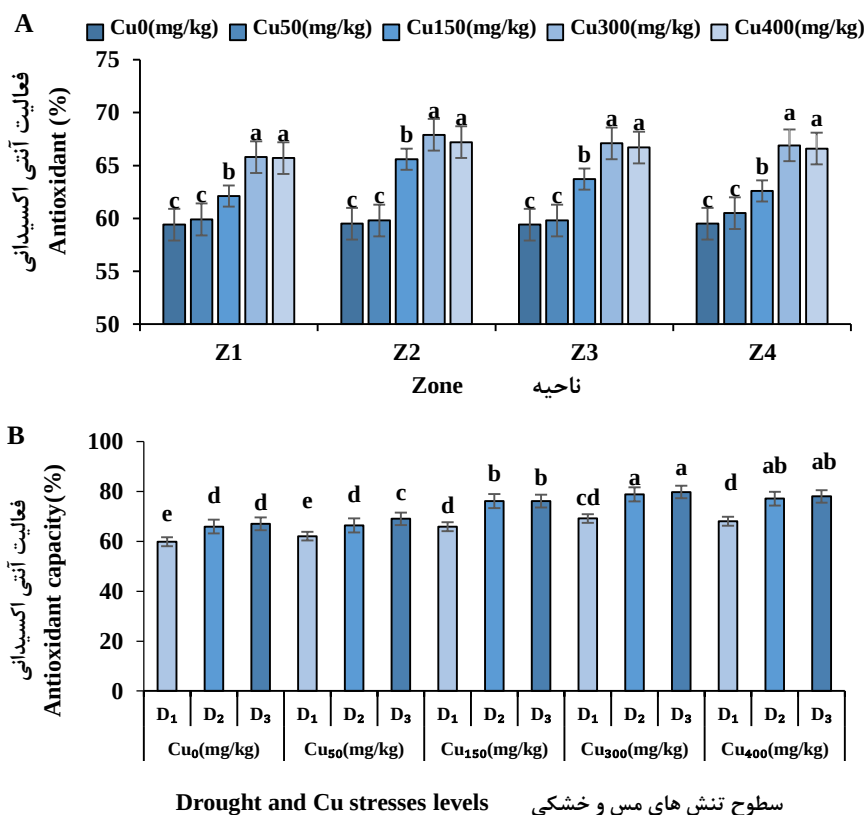
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه شاه‌تره در معرض غلظت‌های بالای مس (۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) افزایش یافت. نتایج ما نشان داد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ‌ها به‌طور متوسط ۱۰۳٪ در ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۹٪ در ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۶٪ در ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم و ۱۱۴٪ در ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم نسبت به شاهد افزایش نشان داد. حداکثر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه کشت‌شده در ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم (۶۷/۹٪ در ناحیه ۲) و حداقل آن، در یک محیط بدون تنش مشاهده شد (۵۹/۴٪ در ناحیه ۱، شکل ۸A). سلول‌های گیاهی راهکارهای دفاعی متعددی را در برابر سمیت فلزات سنگین که در نتیجه تولید ROS ایجاد می‌شوند، تدارک دیده‌اند (Tashakorizadeh et al., 2022).

در اولین مکانیسم دفاعی، با اتصال فلز به دیواره سلولی و لیگاندهای دیگر، از ورود فلز به داخل سلول جلوگیری و آن‌ها را بی‌ضرر می‌کنند (Antosiewicz and Wierzbicka, 2019).

۱۹۹۹) در سیستم دفاعی ثانویه آنتی‌اکسیدان‌هایی برای مبارزه با افزایش ROS ناشی از غلظت بالای فلزات تولید می‌شوند (Mittler, 2006). مشابه این نتایج در گیاه *Salix acmophylla* دیده شده است که در آن با بالا رفتن غلظت فلزات سنگین در خاک میزان آنتی‌اکسیدان در گیاه افزایش یافته است (Ali et al., 2003).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با اثر متقابل خشکی و مس افزایش یافت. برهمکنش بین دو تنش معنی‌دار ($p \leq 0.01$) بود (شکل ۸B). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۱۱۰٪ در صفر میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۰۸٪ در ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۸٪ در ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۹٪ در ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم و ۱۱۸٪ در ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم در خشکی متوسط و ۱۱۱٪ در صفر میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۲٪ در ۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۱۸٪ در ۱۵۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم، ۱۲۰٪ در ۳۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم و ۱۱۹٪ در ۴۰۰ میلی‌گرم مس بر کیلوگرم در خشکی شدید (میانگین چهار ناحیه، شکل ۸B) افزایش

یافت. کمترین مقدار ظرفیت آنتی اکسیدانی در تیمار صفر میلی گرم مس بر کیلوگرم و بیشترین مقدار در ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و خشکی شدید (۰.۷۸/۰.۲؛ شکل ۸A) ثبت شد.



شکل ۸. میانگین اثرات متقابل تنش مس و منطقه بر فعالیت آنتی اکسیدانی *F. parviflora* (A). میانگین اثرات متقابل مس و تنش خشکی بر فعالیت آنتی اکسیدانی در *F. parviflora* (B). D1: شاهد، D2: ۵۰٪ ظرفیت زراعی، D3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی. Z1: ناحیه ۱ با غلظت ۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z2: ناحیه ۲ با غلظت ۱۵۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم، Z3: ناحیه ۳ با غلظت ۳۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم و Z4: ناحیه ۴ با غلظت ۴۰۰ میلی گرم مس بر کیلوگرم. گروه های واجد حروف یکسان، با توجه به آزمون دانکن، تفاوت معنی دار ($P \leq 0.01$) ندارند.

Fig. 8. The means for the interaction effects of Cu and zone on antioxidant activity of *F. parviflora* (A). The means for the interaction effects of Cu and drought stresses on antioxidant activity (B). D1: Control, D2: moderate drought stress; D3: severe drought stress. Seed originated zones: Z1: Zone 1 with a concentration of 50 mg kg⁻¹ Cu, Z2: Zone 2 with a concentration of 150 mg kg⁻¹ Cu, Z3: Zone 3 with a concentration of 300 mg kg⁻¹ Cu and Z4: Zone 4 with a concentration of 400 mg kg⁻¹ Cu. According to Duncan's test, groups with the same letters have no significant difference ($P \leq 0.01$).

نتیجه گیری نهایی

متوسط تأیید کرد. بر اساس این یافته ها می توان نتیجه گرفت که *F. parviflora* به دلیل سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی فعال می تواند با تنش مس مقابله کند. نتایج می تواند معیاری برای انتخاب گونه های متحمل برای سازگاری بهتر در معادن مس و/ یا خاک های آلوده کشاورزی فراهم کند. تحقیقات بیشتری برای ارزیابی استخراج گیاهی مس در گیاهان رشد یافته در خاک های آلوده مناطق خشک مورد نیاز است.

نتایج این تحقیق می تواند به درک ما از نحوه عملکرد گیاهان دارویی در مناطق آلوده با مس به عنوان یک فلز سنگین در شرایط خشکی کمک کند. یافته ها استفاده از *F. parviflora* را به عنوان گونه ای مناسب برای خاک های آلوده با مس کم تا متوسط (۵۰-۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تحت تنش خشکی

منابع

- Akhzari, D., Pessarakli, M., Mahdavi, S., Ariapour, A., 2022. Impact of drought, salinity, and heavy metal stress on growth, nutrient uptake, and physiological traits of vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides* L.). Communications in Soil Science and Plant Analysis. 53, 1841-1847. <https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2063327>
- Alaoui-Sossé, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M.L., Epron, D., Badot, P.M., 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. Plant Science. 166, 1213-1218. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.032>
- Alfadul, S.M., Al-Fredan, M.A., 2013. Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn combinations on phragmites australis metabolism. Metal accumulation and distribution. Arabian Journal for Science and Engineering. 38, 11-19. <https://doi.org/10.1007/s13369-012-0393-0>
- Ali, M.B., Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Singh, S.N., Singh, S.P., 2003. Phytoremediation of lead, nickel, and copper by *Salix acmophylla* Boiss. Role of antioxidant enzymes and antioxidant substances. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 70, 0462-0469. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0009-1>
- Alloway, B.J., 2010. Heavy Metals in Soil (Third edition). John Wiley and Sons. New Yurk. USA.
- Antosiewicz, D., Wierzbicka, M., 1999: Location of lead in *Allium cepa* L. cell by electron microscope. Journal of Microscopy. 195, 139-146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1999.00492.x>
- Baek, S.A., Han, T., Ahn, S.K., Kang, H., Cho, M. R., Lee, S. C., Im, K.H., 2012. Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana*. Plant Pathology. 28, 446-452. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.01.2012.0006>
- Bates, L.S., Waldren, R.A., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., Morshedloo, M.R., 2019. Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. Industrial Crops and Products. 135, 311-320. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.055>
- Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J.F., Margaritis, I., 2016. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 35, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. Berset, C.L.W.T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology. 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cetinkaya, H., Seckin dinler, B., Tasci, E., 2014. Investigation of comparative regulation on antioxidant enzyme system under copper treatment and drought stress in maize (*Zea mays* L.). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 42, 363-371. <https://doi.org/10.15835/nbha.42.2.9632>
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food and Drug Analysis. 10, 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Chen, J., Shafi, M., Li, S., Wang, Y., Wu, J., Ye, Z., Peng, D., Yan, W., Liu, D., 2015. Copper induced oxidative stresses, antioxidant responses and phytoremediation potential of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). Scientific Reports. 5, 13554. <https://doi.org/10.1038/srep13554>
- Chen, Z., Ma, Y., Yang, R., GU, Z., Wang, P., 2019. Effects of exogenous Ca⁺² on phenolic accumulation and physiological changes in germinated wheat (*Triticum aestivum* L.) under UV-B radiation. Food Chemistry. 288, 368-376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.131>
- Chrysargyris, A., Papakyriakou, E., Petropoulos, S.A., Tzortzakis, N., 2019. The combined and single effect of salinity and copper stress on growth and quality of *Mentha spicata* plants. Hazardous Materials. 368, 584-593. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.058>

- Chung, I.M., Rajakumar, G., Subramanian, U., Venkidasamy, B., Thiruvengadam, M., 2019. Impact of copper oxide nanoparticles on enhancement of bioactive compounds using cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. Applied Sciences. 9, 2165. <https://doi.org/10.3390/app9102165>
- Dowidar, S.M., Khalaf, B.M., Abo-Hamad, S.A., Mohsen, A.A., 2013. Bioremediation of copper stressed *Trigonella foenum graecum*. Journal of Stress Physiology and Biochemistry. 9, 5-24.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fidalgo, F., Azenha, M., Silva, A.F., de Sousa, A., Santiago, A., Ferraz, P., Teixeira, J., 2013. Copper- induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. Food and Energy Security. 2, 70-80. <https://doi.org/10.1002/fes3.20>
- Giannakoula, A., Therios, I., Chatzissavvidis, C., 2021. Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in citrus (*Citrus aurantium* L.) plants. The role of antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress. Plants. 10(1), 155. <https://doi.org/10.3390/plants10010155>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Mahmud, J.A., Hossain, S., Alam, K., Oku, H., Fujita, M., 2017. Actions of biological trace elements in plant abiotic stress tolerance. Essential Plant Nutrients: Uptake, Use Efficiency, and Management. 213-274. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58841-4_10
- Hassan, T.U., Bano, A., Naz, I., 2017. Alleviation of heavy metals toxicity by the application of plant growth promoting rhizobacteria and effects on wheat grown in saline sodic field. International Journal of Phytoremediation. 19, 522-529. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1267696>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125, 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Khatun, S., Ali, M.B., Hahn, E.J., Paek, K.Y., 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany. 64, 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.02.004>
- Khalid, Kh.A., 2006. Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.). International Agrophysics. 20, 289-296.
- Ku, M.H., Tan, C.W., Su, Y.S., Chiu, C.Y., Chen, C.T., Jan, F.J., 2012. The effect of water deficit and excess copper on proline metabolism in *Nicotiana benthamiana*. Biologia Plantarum. 56, 337-343. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0098-3>
- Kumar, A., Prasad, M.N.V., Sytar, O., 2012. Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. Chemosphere. 89, 1056-1065. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.070>
- Landi, M., Tattini, M., Gould, K.S., 2015. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. Environmental and Experimental Botany. 119, 4-17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.012>
- Mittler, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. Journal of Trends in Plant Science. 11, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>
- Muhammad, A., Shafaqat, A., Muhammad, R., Muhammad, I., Farhat, A., Mujahid, F., Saima, A. B., 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. Journal of Environment Science and Pollution Research. 22, 8148-8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>
- Nasim, S. A., Dhir, B., 2010. Heavy metals alter the potency of medicinal plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 139-149. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1352-4_5
- Orcutt, D.M., Nilsen, E.T., 2000. The Physiology of Plant under Stress. Joen WileyPublishing. Soil and Biotic factors. 481-517. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.413915x>
- Orhan, I. E., Ozturk, N., Sener, B., 2015. Antiprotozoal assessment and phenolic acid profiling of five *Fumaria* (fumitory) species. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 8,

- 283-286. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60331-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60331-X)
- Pande, P., Anwar, M., Chand, S., Yadav, V.K., Patra, D.D., 2007. Optimal level of iron and zinc in relation to its influence on herb yield and production of essential oil in menthol mint. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 38, 561-578. <https://doi.org/10.1080/00103620701215627>
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S., Giannakoula, A., 2012. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive *Olea europaea* (L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*. 60, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.014>
- Posmyk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M., 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 596-602. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.024>
- Salducci, M.D., Folzer, H., Issartel, J., Rabier, J., Masotti, V., Prudent, P., Affre, L., Hardion, L., Tatoni, T., Laffont-Schwob, I., 2019. How can a rare protected plant cope with the metal and metalloid soil pollution resulting from past industrial activities? Phytometabolites, antioxidant activities and root symbiosis involved in the metal tolerance of *Astragalus tragacantha*. *Chemosphere*. 217, 887-896.
- Sharma, A., Thakur, S., Kumar, V., Kanwar, M.K., Kesavan, A.K., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Alam, P., Ahmad, P., 2016. Pre-sowing seed treatment with 24-epibrassinolide ameliorates pesticide stress in *Brassica juncea* L. through the modulation of stress markers. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1569. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01569>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B., 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under Abiotic Stress. *Molecules*. 24, 2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Singh, O.S., Pant, N.C., Laishram, L., Tewari, M., Dhoundiyal, R., Joshi, K., Pandey, C.S., 2018. Effect of CuO nanoparticles on polyphenols content and antioxidant activity in Ashwagandha (*Withania somnifera* L. Dunal). *Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7, 3433-3439.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. S., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Stavreva Veselinovska, S., Zivanovic, J., Gokik, M., 2010. Changes of some biochemical and physiological parameters in *Capsicum annuum* L. as a consequence of increased concentrations of copper and zinc. *Ecologia Balkanika*. 2, 7-13.
- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Takahashi, F., Shonozaki, K., 2019. Long-distance signaling in plant stress response. *Current Opinion in Plant Biology*. 47, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.10.006>
- Talukder, K.H., Ahmed, A.U., Islam, M. S., Asaduzzaman, M., Hossain, M.D., 2011. Incubation studies on exchangeable Zn for varying levels of added Zn under aerobic and anaerobic conditions in grey terrace soils, non-calcareous floodplain soils and calcareous floodplain soils. *Science Foundation*. 9, 9-14.
- Tashakorizadeh, M., Vahabi, M.R., Golkar, P., Mahdavian, K., 2022. The singular and combined effects of drought and copper stresses on the morphological traits, photosynthetic pigments, essential oils yield and copper concentration of *Fumaria parviflora* Lam. *Industrial Crops and Products*. 177, 114517. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114517>
- Viera, I., Perez-Galvez, A., Roca, M., 2019. Green natural colorants. *Molecules*. 24(1), 154. <https://doi.org/10.3390/molecules24010154>
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*. 64, 88-93. <https://doi.org/10.1104/pp.64.1.88>
- Wang, L., Shan, T., Xie, B., Ling, C., Shao, S., Jin, P., Zheng, Y., 2019. Glycine betaine reduces chilling injury in peach fruit by enhancing phenolic and sugar metabolisms. *Food Chemistry*. 272, 530-538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.085>

- Waraich, E. A., Rashid, A., Ashraf, M. Y., 2011. Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. Australian Journal of Crop Science. 5, 764-777.
- Yadav, S., 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. South African Journal of Botany. 76, 167-179.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yang, L., Wen, K.S., Ruan, X., Zhao, Y.X., Wei, F., Wang, Q., 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules. 23, E762.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zhao, H., Tang, J., Zheng, W.J., 2016. Growth and physiological characteristics of *Kandelia obovata* seedlings under Cu²⁺ stress. Marine Sciences. 40, 65-72.
- Zhou, J., Cheng, K., Zheng, J., Liu, Z., Shen, W., Fan, H., Jin, Z., 2019. Physiological and biochemical characteristics of *Cinnamomum camphora* in response to Cu- and Cd-contaminated soil. Journal of Water. Air and Soil Pollution. 230, 1-11.
<https://doi.org/10.1007/s11270-018-4048-y>