

بررسی تغییرات ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه کالوس‌ها و گیاهچه‌های بادرنجبویه (*Mellissa officinal* L.) تحت تنش فلز سنگین کادمیوم

نسیم سادات موسوی و رویا رضوی‌زاده*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲)

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و تغییرات متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Mellissa officinal* L.) در شرایط کشت درون شیشه طراحی و اجرا شد. بدین منظور ابتدا بذور بادرنجبویه استریل و سپس در محیط‌های کشت پایه MS کشت گردید. سپس جداکشت‌ها از گیاهچه‌های چهار هفته‌ای حاصل از کشت بذر به محیط MS حاوی غلظت‌های متفاوت نیترات کادمیوم (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) منتقل و در اتاق کشت تحت شرایط کنترل‌شده نگهداری شدند. همچنین کالوس‌های حاصل از جدا کشت‌های ساقه به محیط هورمونی (2, 4-D با غلظت 0.25 mg.L^{-1} و BAP با غلظت 5 mg.L^{-1}) حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) انتقال یافتند. چهار هفته پس از کشت میزان رنگیزه‌های فتوستزی و مقادیر آنتوسیانین، فنل و فلاونوئیدها در گیاهچه‌ها بررسی شد. همچنین تغییرات مواد مؤثره دارویی از طریق آنالیزهای GC-mass در کالوس‌ها و گیاهچه‌های بادرنجبویه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش غلظت نیترات کادمیوم در محیط موجب کاهش میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها و میزان آنتوسیانین در گیاهچه‌ها گردید. با افزایش میزان نیترات کادمیوم در محیط، محتوای فنول و فلاونوئید به میزان معنی‌داری افزایش یافت. نتایج GC-mass نشان داد که میزان متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی در گیاهچه‌ها و کالوس‌های بادرنجبویه تحت تنش فلز کادمیوم دچار تغییرات عمده‌ای گردید که بیشترین این تغییرات در ترکیبات گاما-۳-کارن، ترانس کارونل، سیترونال، سیترونلول، سیترال و بتا- کاریوفیلین مشاهده شد. به‌طور کلی تیمار کادمیوم با القای پاسخ‌های فیزیولوژیکی، از جمله تولید ترکیبات فنلی و تغییرات در متابولیت‌های ثانویه باعث افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه گردید که می‌تواند در سازگاری به تنش کادمیوم اهمیت داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، رنگیزه‌های فتوستزی، فلاونوئید، کالوس، کشت درون شیشه‌ای، مواد مؤثره دارویی

مقدمه

نتوانسته ترکیب مصنوعی با ویژگی و کارایی منحصر به فرد این ترکیبات را تولید کند (Namdeo, 2007). به علاوه تولید بسیاری از گیاهان دارای این ترکیبات با ارزش در شرایط محیطی سخت بوده و همچنین بسیاری از این گیاهان به علت

گیاهان دارویی منبعی غنی جهت تولید داروهای گیاهی در صنعت داروسازی محسوب می‌شوند. هنوز هم بسیاری از این تولیدات گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند و بشر تاکنون

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: razavi.roya@gmail.com

برداشت بی‌رویه در معرض خطر انقراض قرار دارند (Namdeo, 2007). گیاهان دارویی به دلیل وجود ترکیباتی به نام متابولیت‌های ثانویه در برخی از گونه‌ها و خانواده‌های خاص، از گیاهان غیردارویی متمایز شده‌اند. متابولیت‌های ثانویه معمولاً براساس منشأ زیست‌شناختی به سه گروه مهم شامل ترپن‌ها، فنول‌ها و ترکیبات نیتروژن‌دار تقسیم می‌شوند (Bourgau et al., 2001). ترپن‌ها یا ترپنوئیدها بزرگترین گروه متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند که عموماً غیرقابل حل در آب هستند. نکته مشترک موجود در ساختار کلیه ترپن‌ها وجود واحدهای پنج‌کربنی مشابه در تمام آنهاست که به واحدهای ایزوپرن مشهورند (Silvestre and Gandini, 2008). از متابولیت‌های ثانویه نیتروژن‌دار می‌توان به آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای سیانوزنی و از ترکیبات فنولی می‌توان اسیدهای فنولی، آنتوسیانین‌ها، آنتوسیانیدین‌ها و لیگنین‌ها را نام برد (اسماعیل‌زاده و شریفی، ۱۳۹۲).

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاه علفی، پایا، پرشاخه و پر پشت از خانواده نعنائیان (Labiatae) است که به عنوان گیاه دارویی کشت می‌شود. ترکیبات فنولیک موجود در بادرنجبویه دارای اثرات بیولوژیکی متعدد مانند جلوگیری از اکسیداسیون، محافظت از DNA در برابر آسیب اکسیداتیو، ضد موتاسیون و ضد ترومبوز است. به علاوه ترکیبات فنولیک دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی زیادی می‌باشند. گیاه بادرنجبویه دارای اسانس به رنگ زرد کم‌رنگ و با بوی لیموی تازه است که از گل و شاخه‌های تازه یا خشک و برگ‌های آن، با تقطیر بخار آب یا استخراج شیمیایی تهیه می‌شود (Zargari, 1990).

امروزه یکی از مسائل زیست‌محیطی آلوده‌شدن خاک زیر کشت گیاهان مختلف به فلزات سنگین می‌باشد. تعدادی از آنها (مس، روی، نیکل، مولیبدین، منگنز و آهن) عناصر کم‌مصرف طبیعی هستند که در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی شرکت می‌کنند. تعداد دیگری از آنها مانند سرب، کادمیوم، کروم و جیوه غیرضروری بوده و حتی در غلظت‌های کم نیز برای گیاهان سمی هستند (Rubio et al., 2012; Sebastiani et al., 2004). کادمیوم از جمله عناصر سنگین و غیرضروری برای گیاه است که بر رشد و نمو گیاه اثر منفی دارد. این عنصر به علت تحرک و سمیت زیاد، یک آلاینده اساسی به شمار می‌رود (Benavides et al., 2005). کادمیوم میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاندهای حاوی نیتروژن دارد. در نتیجه این عنصر بسیاری از آنزیم‌های مهم را غیرفعال کرده که منجر به اختلال در فتوسنتز، تنفس و سایر فرآیندهای متابولیک در گیاه می‌گردد (Souza et al., 2005). کادمیوم بر تقسیم و رشد سلول‌ها، رشد کلی گیاه، تقسیم سلولی منطقه مریستمی و تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد و موجب کلروز و نکروز برگ‌ها، کاهش کلروفیل a و b، کاهش مقدار کلروفیل کل و کارتنوئیدها در گیاهان عالی می‌شود (Singh and Narwall, 1999). کادمیوم در بین فلزات سنگین یکی از سمی‌ترین عناصر برای اندام‌های زنده محسوب می‌گردد. کادمیوم در خاک دوام بسیار بالایی دارد و وجود این فلز در خاک‌های کشاورزی رشد و نمو گیاهان زراعی، بالاخص گیاهان دارویی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و سبب کاهش رشد، عملکرد و کیفیت این گیاهان می‌شود (Amin, 2008). تمام متابولیت‌های ثانویه گیاهی اگر چه اساساً با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما ساخت آن به‌طور آشکاری تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی قرار می‌گیرد (نقدی بادی و همکاران، ۱۳۹۰). در تحقیقی که تأثیر فلزات کادمیوم، سرب و کروم بر روی ریحان را بررسی کرده است، مشخص شد که میزان لینالول در گیاه کاهش و میزان متیل‌کاوایکول افزایش یافت (Prasad et al., 2011). در تحقیق دیگری مشخص شد که با افزایش مس در محیط کشت گیاه عشقه میزان ترکیبات فنولی و لیگنین در گیاه افزایش پیدا کرد (Ali et al., 2006). عوامل محیطی که تأثیر بسیار عمده‌ای بر رشد گیاهان دارویی و کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه آنها می‌گذارد، می‌توان به شرایط رشدی، اقلیم، عناصر غذایی و فلزات سنگین اشاره نمود (Heywood, 2002; Figuerido et al., 2008). نشان می‌دهد که در شرایط تنش فلزات سنگین برخی از این متابولیت‌های ثانویه به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Rai

2004). کادمیوم از جمله عناصر سنگین و غیرضروری برای گیاه است که بر رشد و نمو گیاه اثر منفی دارد. این عنصر به علت تحرک و سمیت زیاد، یک آلاینده اساسی به شمار می‌رود (Benavides et al., 2005). کادمیوم میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاندهای حاوی نیتروژن دارد. در نتیجه این عنصر بسیاری از آنزیم‌های مهم را غیرفعال کرده که منجر به اختلال در فتوسنتز، تنفس و سایر فرآیندهای متابولیک در گیاه می‌گردد (Souza et al., 2005). کادمیوم بر تقسیم و رشد سلول‌ها، رشد کلی گیاه، تقسیم سلولی منطقه مریستمی و تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد و موجب کلروز و نکروز برگ‌ها، کاهش کلروفیل a و b، کاهش مقدار کلروفیل کل و کارتنوئیدها در گیاهان عالی می‌شود (Singh and Narwall, 1999). کادمیوم در بین فلزات سنگین یکی از سمی‌ترین عناصر برای اندام‌های زنده محسوب می‌گردد. کادمیوم در خاک دوام بسیار بالایی دارد و وجود این فلز در خاک‌های کشاورزی رشد و نمو گیاهان زراعی، بالاخص گیاهان دارویی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و سبب کاهش رشد، عملکرد و کیفیت این گیاهان می‌شود (Amin, 2008). تمام متابولیت‌های ثانویه گیاهی اگر چه اساساً با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما ساخت آن به‌طور آشکاری تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی قرار می‌گیرد (نقدی بادی و همکاران، ۱۳۹۰). در تحقیقی که تأثیر فلزات کادمیوم، سرب و کروم بر روی ریحان را بررسی کرده است، مشخص شد که میزان لینالول در گیاه کاهش و میزان متیل‌کاوایکول افزایش یافت (Prasad et al., 2011). در تحقیق دیگری مشخص شد که با افزایش مس در محیط کشت گیاه عشقه میزان ترکیبات فنولی و لیگنین در گیاه افزایش پیدا کرد (Ali et al., 2006). عوامل محیطی که تأثیر بسیار عمده‌ای بر رشد گیاهان دارویی و کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه آنها می‌گذارد، می‌توان به شرایط رشدی، اقلیم، عناصر غذایی و فلزات سنگین اشاره نمود (Heywood, 2002; Figuerido et al., 2008). نشان می‌دهد که در شرایط تنش فلزات سنگین برخی از این متابولیت‌های ثانویه به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Rai

مواد و روش‌ها

تولید گیاهچه و کالوس بادرنجبویه در شرایط درون شیشه و اعمال تیمار: بذرهای گیاه بعد از شستشو با آب مقطر، با الکل ۷۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه ضدعفونی شد و سپس به مدت ۶ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد قرار گرفت، سپس بعد از چند بار شستشو با آب مقطر به محیط‌کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962)، حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۷ گرم در لیتر آگار با اسیدیته معادل ۵/۸ به منظور جوانه‌زنی قرار گرفتند. محیط‌کشت پایه حاوی عناصر ماکرو (Ca, Mg, S, N, P, K)، عناصر میکرو (Co, I, Mo, Fe, Mn, Zn, Cu, B)، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها (اسید نیکوتینیک (B3)، تیامین (B1)، پیرووکسین (B6)، اسیدهای آمینه همچون گلايسین و ترکیبات پیچیده مثل پیتون بود. عناصر معدنی ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها به صورت استوک ساخته و در یخچال نگهداری شدند. به دلیل نور کم در محیط درون شیشه‌ای، فتوسنتز چندانی صورت نمی‌گیرد، لذا افزودن قند در محیط‌کشت کاملاً ضروری است. در این تحقیق از قند ساکاروز استفاده شد. سپس محیط‌های کشت حاوی بذور به مدت چهار هفته در اتاق کشت با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند تا بذرها جوانه زده و رشد کنند. چهار هفته بعد از کشت، قطعات جدا کشت از گیاهچه‌ها به محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) منتقل شدند. لازم به ذکر است غلظت تیمارهای اعمال‌شده براساس کشت بذرهای گیاه بادرنجبویه در محیط‌کشت حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم) و براساس تأثیر بر درصد جوانه‌زنی و ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاهان رشد یافته بعد از چهار هفته انتخاب شد. ۲۸ روز پس از واكشت در محیط‌های تحت تیمار کادمیوم، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات فنلی، آنتوسیانین و میزان متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی در گیاهچه‌های بادرنجبویه اندازه‌گیری شد. به منظور تولید کالوس، از گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی و رشد بذرهای اولیه، جداکشت‌های ساقه تهیه شد و به

et al., 2005; Ali et al., 2006; Sinha and Saxena, 2006; Tirillini et al., 2006). در تضاد با این گزارشات، آلودگی فلزات سنگین در هوا و خاک در فاصله ۴۰۰ متری از منبع آلودگی (کارخانه ذوب فلزات غیرآهنی) عملکرد اسانس گیاهان نعنای فلفلی و نعنای صحرایی را بیشتر از ۱۴ درصد نسبت به شاهد کاهش داد، در مقابل در همان فاصله از منبع آلودگی هیچ کاهش عملکردی در اسطوخودوس ثبت نشد. همچنین در این فاصله مقدار و کیفیت اسانس کاهش نیافت (Zheljazkov et al., 1996). با توجه به مطالب ارائه‌شده مشاهده می‌شود که تولید برخی متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، تنش فلزات سنگین با فعال‌سازی و القای پاسخ‌های دفاعی، موجب تحریک مسیر بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌گردد. کشت‌بافت گیاهی در شرایط کنترل‌شده و خارج از دسترس عوامل محیطی است که با استفاده از آن می‌توان گیاهان خاص را که در فصول خاصی از سال می‌رویند، در هر زمان با رشد سریع و بازدهی بیشتر در شرایط کشت درون شیشه کشت داد. به علاوه با استفاده از این روش بررسی مسیرهای بیوشیمیایی، بیوسنتزی و آنزیمی، همچنین تولید مواد مؤثره دارویی و متابولیت‌های ثانویه گیاهی دقیق‌تر صورت می‌گیرد و بررسی عوامل تنش‌زای زیستی و غیرزیستی بر گیاهان مختلف با سهولت و دقت بیشتری قابل انجام است. بادرنجبویه یکی از گیاهان دارویی پرکاربرد است که به دلیل داشتن ترکیبات مؤثره دارویی مانند سیترال و سایر مواد مؤثره دارویی از اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی و دارویی برخوردار است. با توجه به متأثر شدن گیاهان دارویی از تنش فلزات سنگین و تأثیر آن بر رشد و فیزیولوژی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها، هدف از تحقیق حاضر بررسی تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات فنولی و متابولیت‌های ثانویه در گیاهچه‌ها و کالوس‌های بادرنجبویه، از گیاهان دارویی پرکاربرد در طب سنتی، تحت تنش فلز سنگین کادمیوم در شرایط کشت درون شیشه می‌باشد. بررسی واکنش‌های فیزیولوژیک گیاهان دارویی تحت تنش کادمیوم در شناسایی مکانیسم‌های مؤثر در مقاومت به فلزات سنگین دارای اهمیت است.

محیط‌های پایه هورمونی (شامل 2, 4-D با غلظت 0.25 mg.L^{-1} و BAP با غلظت 5 mg.L^{-1}) منتقل و در اتاق کشت نگهداری شدند. پس از چهار هفته، کالوس‌های حاصل به محیط‌های هورمونی حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (150 و 300 میکرومولار) منتقل شدند. ۲۸ روز پس از واکنش کالوس‌ها در محیط‌های تیمار کادمیوم، کالوس‌های حاصل جهت اندازه‌گیری میزان متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی مورد بررسی قرار گرفتند.

محیط‌های پایه هورمونی (شامل 2, 4-D با غلظت 0.25 mg.L^{-1} و BAP با غلظت 5 mg.L^{-1}) منتقل و در اتاق کشت نگهداری شدند. پس از چهار هفته، کالوس‌های حاصل به محیط‌های هورمونی حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (150 و 300 میکرومولار) منتقل شدند. ۲۸ روز پس از واکنش کالوس‌ها در محیط‌های تیمار کادمیوم، کالوس‌های حاصل جهت اندازه‌گیری میزان متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: سنجش میزان ترکیبات فنلی بر طبق روش Sonald و Iaima (۱۹۹۹) انجام شد. مقدار 0.1 گرم از برگ و ریشه گیاه جداگانه در 5 میلی‌لیتر اتانول 95 درصد سائیده و به مدت 24 ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس 1 میلی‌لیتر از محلول روئی به 1 میلی‌لیتر اتانول 95 درصد اضافه و با آب دو بار تقطیر، حجم محلول به 5 میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار 0.5 میلی‌لیتر معرف فولین 50 درصد و 1 میلی‌لیتر کربنات سدیم 5 درصد به آن اضافه و مخلوط حاصل به مدت 1 ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب هر نمونه در طول موج 725 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 خوانده شد. غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید: برای سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. 0.2 گرم برگ تر در هاون چینی که حاوی 5 میلی‌لیتر استن 80 درصد بود سائیده شد. محتوای هاون با کاغذ صافی صاف گردید. حجم محلول با استن 80 درصد به 15 میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار 3 میلی‌لیتر از این محلول، جهت خواندن شدت جذب در طول موج‌های $663/2$ ، $646/8$ و 470 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 استفاده شد. برای تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر از استن 80 درصد به‌عنوان شاهد استفاده گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید: سنجش میزان فلاونوئیدهای برگ و ریشه بادرنجبویه به روش اسپکتروفتومتری بر طبق روش Krizek و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. مقدار 0.5 گرم برگ تر در 10 میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک 95 درصد و اسید استیک گلاسیال به نسبت 99 به 1) سائیده شد و عصاره حاصل به مدت 10 دقیقه در 4000 g سانتریفوژ در دمای محیط (دمای 25 درجه سانتی‌گراد) گردید. محلول رویی جدا شد و به مدت 10 دقیقه به آرامی در حمام آب گرم با دمای 80 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس شدت جذب، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 در سه طول موج 270 ، 300 و 330 نانومتر خوانده شد. برای تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر از اتانول اسیدی به‌عنوان شاهد استفاده گردید. مقایسه میزان این ترکیبات براساس شدت جذب خوانده‌شده در این طول‌موج‌ها انجام گرفت.

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین: سنجش میزان آنتوسیانین بر طبق روش Wagner (۱۹۷۹) انجام گردید. در این روش 0.5 گرم بافت تر (برگ و ریشه) در هاونی که حاوی $2/5$ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت 99 به 1) بود، هموژنیز گردید. سپس $2/5$ میلی‌لیتر دیگر متانول اسیدی به آن اضافه شد. عصاره حاصل به لوله آزمایش در پیچ‌دار منتقل و به مدت 24 ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس عصاره به مدت 10 دقیقه در 4000 g سانتریفوژ گردید در دمای محیط (دمای 25 درجه سانتی‌گراد) و 3 میلی‌لیتر از محلول رویی برای خواندن شدت جذب آن در طول موج 550 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 استفاده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی معادل

غلظت فلز کادمیوم در محیط‌کشت MS باعث کاهش معنی‌داری در میزان کارتنوئید گیاهچه‌های بادرنجبویه نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۱ D)، به طوریکه میزان کارتنوئید گیاهچه‌ها در غلظت ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم به کمترین میزان خود رسید.

تأثیر کادمیوم بر ترکیبات فنلی: شکل ۲ (A و B) میزان ترکیبات فنلی در گیاهچه‌های بادرنجبویه ۲۸ روز پس از کشت در محیط MS حاوی فلز کادمیوم را نشان می‌دهد. بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان فنل گیاهچه‌های بادرنجبویه حاکی از آن است که افزایش میزان فلز کادمیوم در محیط‌کشت باعث افزایش معنی‌داری در غلظت ترکیبات فنلی در غلظت ۱۵۰ میکرومولار کادمیوم در اندام هوایی (شکل ۲ A) و ریشه گیاه (شکل ۲ B) گردید و میزان ترکیبات فنلی در غلظت ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم به بیشترین میزان خود، هم در اندام هوایی و هم در ریشه گیاه رسید.

تأثیر کادمیوم بر میزان آنتوسیانین: نتایج حاصل از بررسی میزان آنتوسیانین حاصل از کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه در محیط حاوی نیترات کادمیوم در شکل ۳ (A و B) نشان داد افزایش میزان فلز کادمیوم در محیط‌کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه موجب کاهش میزان آنتوسیانین تولیدشده در گیاه گردید. فلز کادمیوم در هر دو غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار باعث کاهش معنی‌داری در میزان آنتوسیانین گیاهچه‌های بادرنجبویه نسبت به گیاهچه‌های شاهد، هم در اندام هوایی (شکل ۳ A) و هم در ریشه (شکل ۳ B) شد.

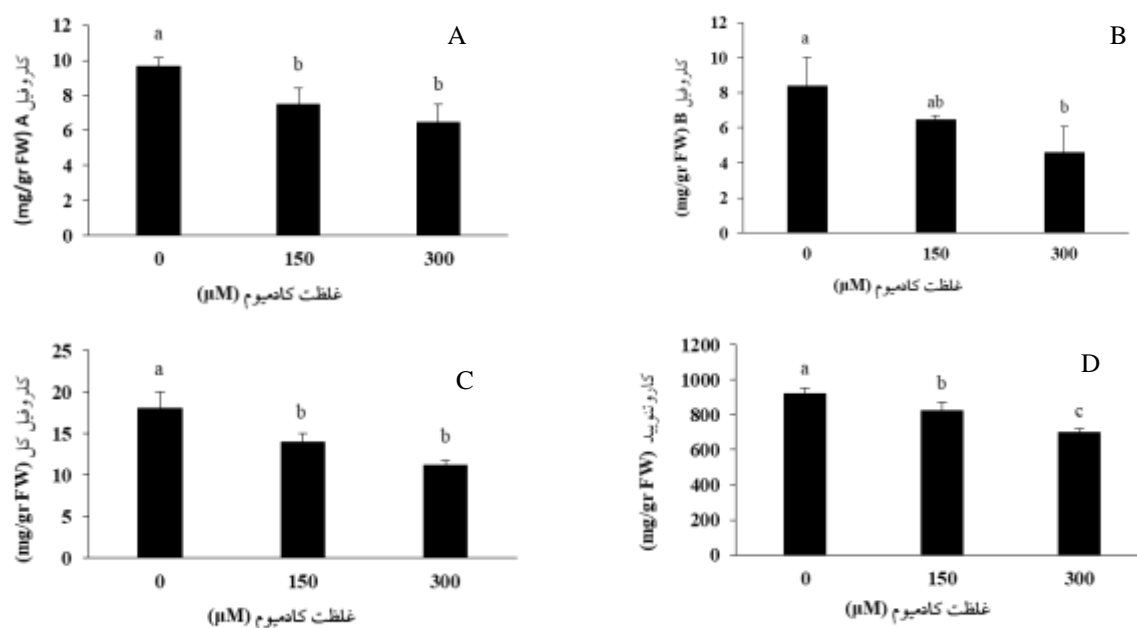
تأثیر تنش کادمیوم بر میزان فلاونوئید گیاه: شکل ۴ (A و B) نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌داری در میزان فلاونوئیدهای گیاهچه‌های بادرنجبویه کشت‌شده در محیط‌کشت حاوی فلز کادمیوم نسبت به گیاهان شاهد است. بررسی داده‌های حاصل از سنجش میزان فلاونوئید، افزایش میزان فلاونوئید را در گیاهچه‌های تحت تیمار فلز سنگین کادمیوم در هر سه طول‌موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر نشان داد. سنتز فلاونوئیدها با افزایش میزان کادمیوم در محیط در هر سه طول‌موج ذکرشده در غلظت ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم بیشترین میزان افزایش را

ارزیابی مواد مؤثره اسانس گیاهچه و کالوس بادرنجبویه با دستگاه گاز کروماتوگراف جرم سنجی GC/MS: بدین منظور از دستگاه گاز کروماتوگراف مدل Hewlett-Packard- 589 دارای سیستم تله یونی استفاده شد که در آن انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، برای تولید منبع یون تنظیم گردید. رقیق‌کردن نمونه‌ها به روش شکافت با نسبت ۱:۱۰۰ انجام گرفت. ستون موئینه به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۰ میلی‌متر، ضخامت فیلم ۲۵ میکرومتر و ذرات از جنس متیل سیلیکون کراس لینک شده، بودند. دتکتور از نوع انتخابگر جرمی (HP-5970 mass-selective detector-USA) بود. برنامه حرارتی از ۱۰۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با تغییرات ۴ درجه در دقیقه استفاده شد. از هلیوم فوق خالص با سرعت عبور ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده گردید. شناسایی هر ترکیب براساس زمان باز داری و جرم ثبت‌شده آنها انجام گرفت (Davies, 1990; Li et al., 2009).

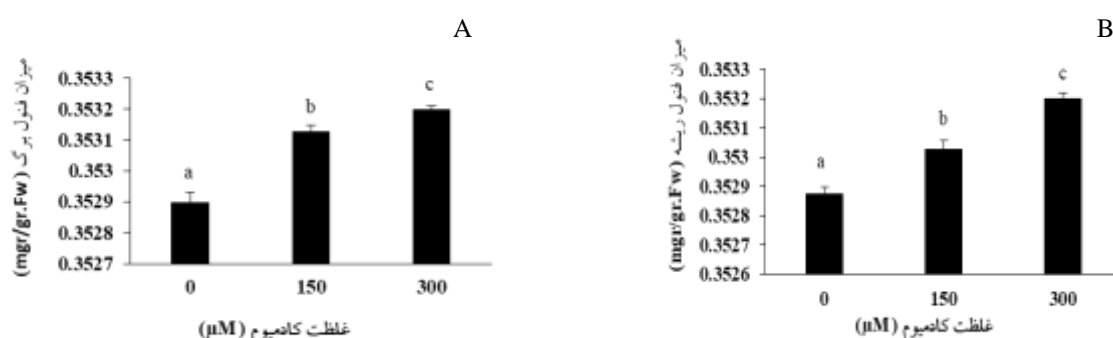
محاسبات آماری: تمام آزمایشات طبق طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و Excel انجام گرفت. مقایسه میانگین براساس آزمون توکی و سطوح معنی‌دار بودن تیمارها در سطح $P \leq 0.05$ انجام گرفت.

نتایج

تأثیر فلز کادمیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های بادرنجبویه: نتایج حاصل از تأثیر تیمار غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار فلز سنگین کادمیوم بر میزان کلروفیل‌های a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید در شکل ۱ نشان داده شده است. افزایش میزان فلز کادمیوم در محیط باعث کاهش میزان کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل در گیاهچه‌های بادرنجبویه گردید (شکل ۱ A، B و C). افزایش میزان کادمیوم در هر دو غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل را به شکل معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش داد. همچنین افزایش میزان



شکل ۱- بررسی اثر کادمیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه‌های بادرنجبویه ۴ هفته پس از کشت. (A) کلروفیل a، (B) کلروفیل b، (C) کلروفیل کل گیاه و (D) کارتنوئید. مقادیر میانگین ۳ تکرار و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار براساس آزمون توکی در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

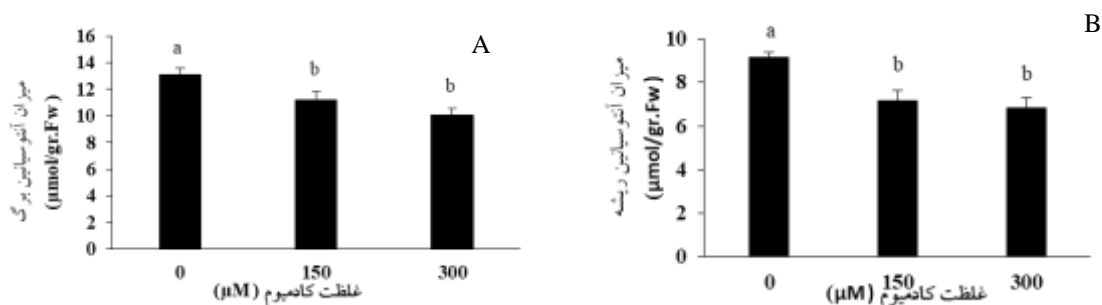


شکل ۲- بررسی اثر کادمیوم بر میزان محتوای فنول گیاهچه‌های بادرنجبویه، ۴ هفته پس از کشت. (A) برگ و (B) ریشه. مقادیر میانگین ۳ تکرار و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار براساس آزمون توکی در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

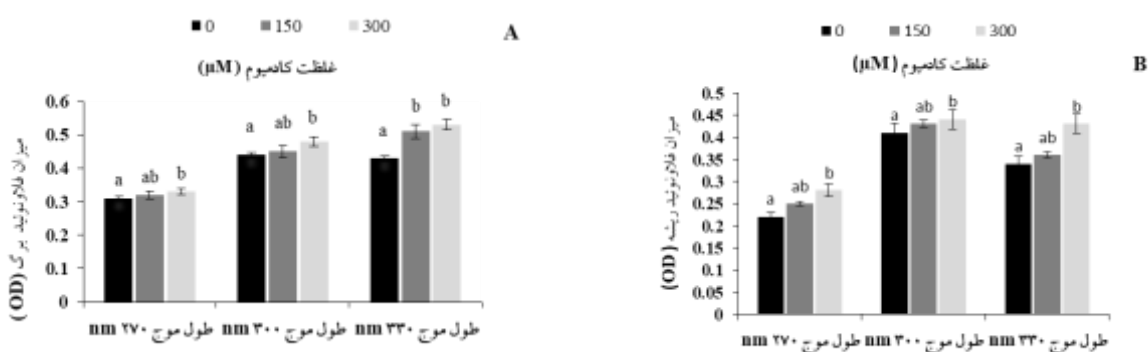
نشان داد.

است که در بین این ترکیبات ۷-۳-کرن، لینالول، ترانس کارونل، سیترونلال، سیترونلول، سیترال، β-کاریوفیلین بیشترین درصد ترکیبات را به خود اختصاص داده‌اند. بر این اساس مقادیر کارواکرول استات، لیمونن، کارواکرول، گاما-۳-کارن، سیترال، بتا-کاریوفیلین بیشترین میزان افزایش را در میان ترکیبات اصلی اسانس گیاهچه‌های تیمار شده با ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. در

شناسایی ترکیبات اسانس گیاهچه و کالوس بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم و بدون آن به روش GC/MS: تغییرات ترکیبات مؤثره دارویی گیاهچه و کالوس‌های بادرنجبویه طی چهار هفته با استفاده از GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱). نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد که اسانس حاصل از گیاه بادرنجبویه و کالوس‌های آن دارای ۳۸ ترکیب



شکل ۳- بررسی اثر کادمیوم بر میزان محتوای آنتوسیانین گیاهچه‌های بادرنجبویه ۴ هفته پس از کشت. (A) برگ و (B) ریشه. مقادیر میانگین ۳ تکرار و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار براساس آزمون توکی در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.



شکل ۴- بررسی اثر کادمیوم بر محتوای فلاونوئید گیاهچه‌های بادرنجبویه ۴ هفته پس از کشت. (A) برگ و (B) ریشه. مقادیر میانگین ۳ تکرار و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار براساس آزمون توکی در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

فتوستتزی و متابولیت‌های ثانویه کالوس و گیاهچه بادرنجبویه، به‌عنوان یکی از گیاهان مهم و ارزشمند دارویی، نسبت به تنش فلزات سنگین در شرایط کشت درون شیشه مورد ارزیابی قرار گرفت. فرایندهای فیزیولوژیک از جمله فتوستتز در گیاهان عالی به فلزات سنگین بسیار حساس هستند (Tanyolac et al., 2007). مطالعات متعددی بازراندگی فتوستتز در گیاهان مختلف رشدیافته تحت تنش فلزات سنگین را گزارش کرده‌اند. فلزات سنگین کاهش فتوستتز را ممکن است از طریق بازگشایی روزنه، آسیب به سازماندهی ساختار کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوستتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و... با یون فلز در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوستتزی القاء کنند. سمیت فلزات سنگین همچنین تنش اکسیداتیو را از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپر اکسید،

مقابل بیشترین میزان کاهش ترکیبات اصلی اسانس برای تیمول، سیس-سابینن، ترانس کاروئل، سیترونلول، کاریوفیلن اپوکساید، جرماکرن-دی و سیترونلال ثبت گردید. در کالوس‌های تیمار شده با کادمیوم ۳۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش مربوط به ترکیبات اصلی، گاما-تریپنین، جرماکرن-دی، کارواکرول، پاراسیمن، گاما-۳-کرن، سیترونلول، کارواکرول استات و تیمول بود. در مقابل بیشترین کاهش برای ترکیبات اصلی، سیترال، بتا-کاریوفیلن، ترانس-کاروئل و سیترونلال ثبت گردید. در مورد کالوس تولید هر دو ترکیب سیترال و سیترونلال روند کاهشی داشت.

بحث

از آنجا که تنش فلزات سنگین تأثیرات بسزایی بر رشد گیاهان دارد، در این مطالعه چگونگی تغییرات میزان رنگیزه‌های

جدول ۱- محتوای نسبی ترکیبات اسانس در گیاهچه و کالوس *Melissa officinalis* L. با استفاده از طیف‌سنجی جرمی گاز (GC-MS) در غلظت‌های صفر و ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم

محتوای نسبی (درصد)					نام ترکیب
کالوس تیمار	کالوس شاهد	گیاه تیمار	گیاه شاهد	زمان بازداری	
۰/۷	۱/۱	۰/۹	۰	۷/۶	۱-اکتادین
۱/۲	۰/۸	۱/۲	۱	۹/۸	آلفا - پینن
۰/۸	۰/۷	۰/۸	۱/۲	۱۰/۵	۱-اکتان-۳-ال
۱	۰/۹	۱	۱/۳	۱۱	میرسین
۵/۷	۴/۲	۶/۶	۴/۴	۱۱/۳	گاما-۳-کارن
۱/۴	۰/۹	۱/۴	۰/۹	۱۱/۸	آلفا-فلاندرین
۱/۹	۱/۴	۱/۷	۱/۸	۱۲/۲	پارا سیمین
۳/۳	۲/۸	۱/۳	۰/۸	۱۲/۶	لیمونن
----	----	۱/۱	۱	۱۲/۹	ایکالپتول
۱/۶	۱/۲	۱/۲	۱/۵	۱۳/۵	۱-اکتان-۶-اکتانترین
۱/۲	۰	۰/۹	۱/۱	۱۴/۱	گاما-ترپنین
۴/۸	۴/۵	۴/۸	۴/۶	۱۴/۴	لینالول
----	----	۰/۸	۱/۳	۱۴/۸	سیس-سابینین
۱	۱/۲	۱	۰/۹	۱۵/۷	۳-متیل-۲-(متیل-۲-۲ بوتنیل)
۱/۴	۱/۷	۱/۳	۲/۵	۱۶/۳	بتا-توژن
۱/۹	۱/۳	۱/۶	۱/۳	۱۷/۴	۵-هیپن-۱-ال
۰/۸	۱/۲	۰/۸	۰/۷	۱۷/۸	بایسیکلو(۲,۲,۱) هیپن-۲-وان
۱/۶	۰/۹	۲/۶	۰/۸	۱۸/۲	ایزوپولژل
۹/۱	۱۲	۷/۲	۱۱/۲	۱۹/۵	ترانس-کارونل
۱۸/۲	۲۱/۵	۱۷/۱	۲۰/۶	۲۰/۱	سیترونال
۱/۳	۰/۹	۱/۲	۰/۸	۲۰/۴	ایزوبورنئول I
۹/۳	۷/۱	۶/۳	۸/۷	۲۱/۸	سیترونلول
----	----	۴	۳/۵	۲۲/۴	۱,۳,۸-پی-منتاتارین
۶/۸	۹/۹	۸/۶	۶	۲۳/۹	سیترال
۱	۱/۴	۰/۸	۰/۹	۲۴/۲	۳,۶-اکتادینوئیک اسید
۳/۳	۳	۱/۳	۲/۲	۲۵/۱	تیمول
۲/۸	۱/۹	۲/۳	۱/۵	۲۵/۵	کارواکرول
۱/۶	۱/۳	۱/۶	۰/۹	۲۶	کارواکرول استات
۴/۹	۶/۸	۶/۸	۵	۲۹/۸	بتا-گاریوفیلین
۱/۴	۱/۷	۱/۴	۱/۹	۳۰/۳	گاریوفیلین اپوکساید
۱/۹	۱/۲	۱/۷	۱	۳۰/۷	کالامن
۲/۳	۲/۱	۲	۱/۲	۲۱/۷	آلفا-هومولن

محتوای نسبی (درصد)					نام ترکیب
کالوس تیمار	کالوس شاهد	گیاه تیمار	گیاه شاهد	زمان بازداری	
۱/۸	۱	۱/۲	۱/۵	۲۳/۹	دی-جرماکرن
-----	-----	۰/۹	۰/۹	۳۳/۱	بتا-یونن
۱/۴	۰/۹	۱/۵	۱/۳	۳۴	بتا-بیسابولن
۰/۹	۰/۸	۰/۸	۰/۹	۳۵/۱	ایگنول
۱/۱	۱/۳	۰/۹	۱	۳۶/۶	آلفا-مورولن
-----	-----	۰/۸	۱/۳	۴۰/۲	بتا-کوبین
۹۹/۶	۹۹/۴	۹۹/۴	۹۹/۴		درصد نهایی ترکیبات

کادمیوم عنوان شده است (Prasad and Strzalka, 2002). غلظت بالای کادمیوم، سنتز کلروفیل را از طریق مختل کردن جذب دیگر یون‌های اساسی مانند منیزیم و یا با افزایش آنزیم تخریب‌کننده کلروفیل (کلروفیلاز) کاهش می‌دهد (Van Assche and Cligsters, 1990). فلزات سنگین به وسیله مهار آنزیم‌های گاما- آمینو لوالونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلد ردوکتاز سبب مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل می‌شوند (Khatib et al., 2008) بنابراین به دنبال انتقال کادمیوم به برگ‌ها و تجمع یون در این بافت، میزان فتوسنتز کاهش می‌یابد. در تحقیقی که روی سویا انجام شد نیز کاهش میزان کلروفیل و نیز فتوسنتز در اثر افزایش غلظت کادمیوم گزارش شده است (Xue et al., 2013). از دست رفتن کلروفیل در اثر اعمال تنش کادمیوم در این تحقیق می‌تواند جنبه سازگاری نیز داشته باشد زیرا با کاهش کلروفیل، الکترون برانگیخته شده طی فتوسنتز کاهش یافته و به دنبال آن خسارت‌های ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۲).

کاروتنوئیدها، شامل کاروتن و گزانتوفیل‌ها آنتی‌اکسیدان‌های چربی‌دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که تحت تنش فلز سنگین، غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاهش میزان کاروتنوئیدها تحت تنش کادمیوم به دلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و

رادیکال‌های هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید القاء می‌کند (Reddy et al., 2005). فلزات سنگین از عملکرد فتوسیستم‌های I و II ممانعت می‌کنند. مشخص شده است که حساسیت فتوسیستم II به فلزات سنگین بیش از فتوسیستم I است (Agrawal et al., 2012). بر طبق تحقیقات Almedia و همکاران (۲۰۰۷) مشخص شد که فلزات سنگین بر ناقلان الکترون اثر می‌گذارند و با رساندن خود به مرکز واکنش فتوسیستم II اثر خود را بر جای می‌نهند و در نتیجه سبب کاهش سطح انرژی و کاهش فتوسنتز در گیاه می‌شوند. چون کلروفیل b بیشتری در این فتوسیستم موجود است، مقدار تخریب کلروفیل b تحت شرایط تنش فلز سنگین کادمیوم بیشتر است (Almedia et al., 2007). در این تحقیق کلروفیل b تحت تأثیر فلز کادمیوم به شکل معنی‌داری کاهش یافت، به عبارت دیگر میزان بازداری کادمیوم بر این رنگیزه نسبت به کلروفیل a به مراتب بیشتر بود. همچنین میزان تجزیه کارتنوئید نیز تحت تأثیر فلز کادمیوم افزایش یافت. به دلیل تأثیر فلزات بر بیوسنتز کلروفیل و ایجاد تنش اکسیداتیو محتوای کلروفیل برگ می‌تواند معیاری برای سنجش بروز سمیت محسوب شود. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر فلز کادمیوم بر محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی مانند کلروفیل a و b در بسیاری از گونه‌های گیاهی وجود دارد، که این کاهش به اثر بازدارنده کادمیوم بر جذب آهن و منگنز و نیز مهار آنزیم‌های گروه سولفیدریل شرکت‌کننده در مسیر بیوسنتز رنگیزه‌ها توسط

معنی داری افزایش می‌یابد. بیشترین میزان ترکیبات فنلی در گیاهچه و ریشه بادرنجبویه در غلظت ۳۰۰ میکرومولار نترات کادمیوم مشاهده می‌گردد. ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعدد مثل ربایش رادیکال‌های آزاد، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرارگرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با انتقال سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید، از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها ممانعت می‌کنند (Chu and Chang, 2000). ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌گردند، اما تنش‌های محیطی مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهند. تغییر در بیوسنتز آنزیم‌های بیوسنتزکننده یا تجزیه‌کننده این ترکیبات بر مقدار آن‌ها در سلول تأثیر می‌گذارد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی سینامیک استرها و لیگنین‌ها از ترکیبات فنلی و جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل پروپانویید هستند که در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل آلانین آمینولیز (PAL) آغازگر مسیر فنیل پروپانویید است که L- فنیل آلانین را با دامیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Solecka, 1997). افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمینولیز که اولین آنزیم مسیر بیوسنتز فنل‌ها است، در پاسخ به برخی تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است. آنزیم PAL می‌تواند به‌عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته می‌شود، زیرا دارای خاصیت به دام‌اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (Tian and Li, 2007). در گیاه بابونه تحت تنش کادمیوم و مس نیز افزایش فعالیت آنزیم PAL گزارش شده است (Kovacic and Backor, 2007). افزایش میزان ترکیبات فنلی در گیاه بادرنجبویه تحت تأثیر سلنیوم نیز گزارش شده است (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۵). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و افزایش میزان ترکیبات فنلی کل در گیاهچه بادرنجبویه قرار گرفته در معرض تنش کادمیوم، به نظر می‌رسد که افزایش ترکیبات مختلف فنلی (به‌عنوان یک جزء آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی) نقش بسیار مهمی

در نتیجه سبب برهم ریختن ساختارشان می‌گردد. کاروتنوئیدها در سمیت‌زدایی کلروفیل برانگیخته نقش دارند. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به‌صورت مستقیم رادیکال‌های اکسیژن را غیرفعال کنند و یا از طریق فرونشاندن کلروفیل برانگیخته‌شده، به‌صورت غیرمستقیم از تشکیل رادیکال‌های اکسیژن جلوگیری کنند و بدین ترتیب دستگاه فتوسنتزی را از شروع پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کنند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر به کاهش محتوای کاروتنوئیدها با افزایش میزان کادمیوم اشاره داشت. همچنین بر طبق مطالعات Tran و Raymundo (۱۹۹۹) مشخص شد که کادمیوم می‌تواند در چرخه ویولا گزانتوفیل-زآزانتین که در سنتز کاروتنوئیدها نقش دارد، اختلال ایجاد نموده و سبب کاهش تولید کاروتن شود. در مطالعات دیگر روی گلرنگ (Shi et al., 2010)، کلزا (علمی و همکاران، ۱۳۹۲ و سلطانی و همکاران، ۱۳۸۵) و *Aeluropus littoralis* (Rastgoo and Alemzadeh, 2011) کاهش محتوای کاروتنوئید به ازاء افزایش کادمیوم تأیید شده است. مطالعات انجام‌گرفته روی گیاه آزولا (Dai et al., 2006) و *Bacopa monnieri* (Mishra et al., 2006) نیز نشان داد که کاربرد کادمیوم به‌علت اثرات شدید اکسیداتیو در این گیاهچه‌ها باعث کاهش محتوای کاروتنوئید می‌شود. تنش عنصر سنگین به ساختار تیلاکوئید و گرانای کلروپلاست آسیب وارد می‌کند و باعث بی‌ثباتی مجموعه پروتئین رنگیزه و تخریب کلروپلاست می‌شود (Siddiqui et al. 2010). داده‌های این آزمایش با مطالعات Bajguz (۲۰۱۱) مطابقت دارد. او گزارش کرد که ریز جلبک *Chorella vulgaris* تیمارشده با فلزات سنگین کادمیوم، مس و سرب در غلظت‌های 10^{-4} و 10^{-6} مولار، کلروز (کم-شدن یا از بین رفتن رنگدانه زرد طبیعی) را از خود نشان دادند و این امر به‌دلیل کاهش چشمگیر محتوای کلروفیل کل ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از قرارگرفتن در معرض تنش کادمیوم، مس و سرب بود (Bajguz, 2011). نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط، میزان ترکیبات فنلی به‌طور

قند بر روی دو رقم کلزا *Brassica napos* نیز اثبات شده است. تخریب ساختار کلروپلاست و ناپایداری کمپلکس‌های رنگدانه - پروتئین، تجزیه کلروفیل‌ها توسط آنزیم تخریب‌کننده کلروفیل (کلروفیلاز) موجب کاهش میزان کلروفیل و در نتیجه کاهش تولید قند و به دنبال آن کاهش تولید آنتوسیانین می‌شود (Bertrand and Schoefs, 1999).

بررسی میزان فلاونوئیدهای گیاه بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم، افزایش میزان فلاونوئیدهای گیاه را در هر دو غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار گیاه نشان داد که بیشترین میزان افزایش فلاونوئیدها در غلظت ۳۰۰ میکرومولار مشاهده شد و در این غلظت تفاوت معنی‌داری با غلظت شاهد مشاهده گردید. در گیاهان در معرض تنش، فلاونوئیدها به عنوان جاروب‌کننده‌های رادیکال آزاد عمل می‌کنند و با شناسایی تعداد و موقعیت گروه‌های OH فنلی حاضر، کار پاکسازی رادیکال‌ها را انجام می‌دهند، از این رو میزان آن در گیاه در معرض تنش افزایش می‌یابد (Middleton et al., 2000). یکی از مکانیسم‌های مهم گیاهان در برابر تنش، تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در مهار و کاهش اتواکسیداسیون لیپیدها و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمل می‌نمایند. نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج بارنده و همکاران (۱۳۹۳) در گیاه عدس و همچنین پورتبیزی و همکاران (۱۳۹۷) در گیاه ماریغال مطابقت دارد.

فلاونوئیدها یا ترکیبات فنلی در سیتوپلاسم و نیز سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش حفاظتی دارند. اکسیداسیون فلاونوئیدها (به ویژه o-دی فنول-ها) در شرایط تنش سبب تولید ترکیبات جاروب‌کننده H_2O_2 می‌گردد (Dai et al., 2006). پلی فنل اکسیداز در مجاورت مولکول اکسیژن کاتالیز نوعی کوئینون از فنل‌ها را انجام می‌دهد. البته، هم شرایط رشد مانند بروز تنش و هم نوع ژنوتیپ بر فعالیت پلی فنل اکسیداز اثر می‌گذارد (Mayer,

در پاسخ گیاه بادرنجبویه به تنش فلز کادمیوم ایفا می‌کند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های نیرومندی در بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش می‌باشند و این خاصیت به دلیل ساختار اسکلتی و گروه فنل این متابولیت‌ها است. گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به وسیله جاروب‌گری رادیکال‌ها و سایر مکانیسم‌ها مانند فروکشی اکسیژن یکتایی و کلاته کردن فلز به وسیله باندشدن یون‌های سمی، آسیب‌های اکسیداتیو را کم کرده و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از تأثیرات منفی تنش محافظت می‌کنند و همچنین با عمل لیپواکسیژناز از اکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کنند. گزارش مشابهی مبنی بر افزایش بیوستنز ترکیبات فنلی تحت شرایط تنش اکسیداتیو توسط Mohdaly و همکاران (۲۰۰۹) ارائه گردید. در سال‌های اخیر ترکیبات فنلی به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی به شدت مورد توجه قرار گرفته است.

بررسی نتایج حاصل از تغییر میزان آنتوسیانین گیاهچه‌های بادرنجبویه تحت تیمار کادمیوم کاهش معنی‌دار میزان آنتوسیانین در هر دو غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار نیترات کادمیوم را نشان می‌دهد. سیستم دفاع غیرآنزیمی در گیاهان سنتز برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند آنتوسیانین، کاروتنوئید، توکوفرول، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنولی مانند فلاونوئیدها را القا می‌کند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان با رادیکال‌های آزاد واکنش داده، با دادن الکترون به این رادیکال‌های واکنش‌پذیر آنها را به شکل پایدار خود تبدیل می‌کنند (Tripathi et al., 1999). آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد سبب تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول‌ها و جمع‌آوری آنها از سایر بخش‌ها می‌شوند (Tripathi et al., 2006). در این تحقیق با افزایش غلظت کادمیوم میزان آنتوسیانین در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم نسبت به گیاهان گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافته است که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی گیاه *Brassica Oleracea* تحت تنش فلز کادمیوم همخوانی دارد (برجیان و همکاران، ۱۳۹۶). کاهش میزان آنتوسیانین در شرایط تنش با کاهش میزان

یافت. از آنجائیکه کادمیوم به‌عنوان یک عنصر غیرضروری و با قابلیت تحرک زیاد در خاک و انحلال زیاد در آب، همچنین جذب سریع توسط ریشه گیاه به‌عنوان عامل تنش سمی برای گیاهان شناخته شده است (Challahan *et al.*, 2005) و با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و کاهش بیشتر تولید سیترال و سیترونلول به‌عنوان ماده مؤثره گیاه دارویی بادرنجبویه می‌توان تأثیر منفی فلز سنگین کادمیوم در تولید پیش‌سازهای ساخت این مواد و در نتیجه کاهش تولید آنها را نتیجه‌گیری کرد.

۳-۷- کرن و ترانس کارونل جزء کتون‌های موجود و دارای خواص آرام‌بخش، ضداسپاسم و محرک دستگاه گوارش است (Djilani and Dicko, 2012; Mahmoudi *et al.*, 2014) که در یافته‌های حاصل از این پژوهش ۳-۷- کرن در گیاهچه‌ها و کالوس افزایش یافت و ترانس کارونل در گیاهچه و کالوس کاهش داشت. β- کاربوفیلین نیز دارای خاصیت ضدتومور و مانع تجمع غیرطبیعی مایع در غشای بین یاخته‌ای بافت‌های بدن می‌شود (Bahlsberg-Pahlsson, 1989) که در این پژوهش میزان این ماده در گیاهچه‌های تیمار شده افزایش و در کالوس‌های تیمار شده کاهش داشت. اگر چه متابولیت‌های ثانویه به وسیله ژن‌ها کنترل می‌شوند ولی تولید آنها به میزان زیاد، تحت تأثیر عوامل محیطی می‌باشد (امید بیگی، ۱۳۸۴) و منجر به تغییرات در میزان و کیفیت متابولیت‌های ثانویه از قبیل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، اسانس‌ها و استروئیدها می‌شود. شواهد زیادی نشان می‌دهد که تحت شرایط تنشی تولید برخی از این ترکیب‌ها تا چندین برابر افزایش می‌یابد، اما دلایل زیادی نیز وجود دارد که این تأثیر همیشگی و همه‌گیر نیست، در موارد زیادی نیز کاهش میزان متابولیت‌های ثانویه در شرایط تنش دیده می‌شود (Atal and Kapur, 1998). گزارش‌های مشابهی در خصوص تغییرات متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر موارد مختلف تنش موجود است. در بررسی تأثیر نیتروژن بر گیاه بادرنجبویه گزارش شده است با افزایش میزان نیتروژن در محیط میزان ترکیبات سیترونللال و کاربوفیلین اکساید کاهش پیدا کردند. در مقابل با افزایش میزان نیتروژن، مقادیر ژرانیاال و نرال افزایش یافتند (عباس‌زاده و هکاران، ۱۳۸۵). در

در سال‌های اخیر خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Diaz *et al.*, 2001). فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها به‌طور عمده مربوط به خاصیت احیایی آنهاست که اجازه می‌دهد به‌عنوان عوامل احیایی، دهنده هیدروژن، برطرف‌کننده‌های اکسیژن منفرد و متصل‌شونده با عناصر عمل کنند (Sakihama and Yamosaki, 2002). به‌طور کلی تصور می‌شود فلاونوئیدها از آسیب اکسیداتیو با جاروب‌کردن انواع اکسیژن واکنش‌گر و شکستن واکنش‌های زنجیری رادیکالی در طی پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کنند. این اثرات اکسیداتیوی نیاز به شکل احیاء شده فلاونوئیدها دارد و شکل اکسید شده آنها تنها به عنوان پرواکسیدانت عمل می‌کند (Sakihama and Yamosaki, 2002).

امروزه مشخص گردیده است که تنش همیشه به‌طور کامل مضر نیست و گزارش‌های مبنی بر تأثیر مثبت آن بر ساخت مواد مؤثره گیاهان دارویی و معطر وجود دارد. گیاهانی که تحت عنوان گیاهان دارویی مشهور هستند، غنی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که دارای قابلیت بالا برای استفاده در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی هستند. در بین ترکیبات شناسایی شده این پژوهش لینالول و سیترونلول هر دو از گروه الکل‌های موجود در اسانس گیاه بادرنجبویه بوده و دارای خاصیت ضدحساسیت، ضدضعف و نیروزا، ضدویروس و باکتری‌کش، بازدارنده سرطان، خلط‌آور، آرام‌بخش و خواب‌آور، بالانس‌کننده و ضد میکروب هستند (Bahlsberg-Pahlsson, 1989) که در این پژوهش لینالول در گیاهچه و کالوس کمی افزایش یافت و سیترونلول در گیاهچه‌های تیمار شده کاهش و در کالوس به نسبت بیشتری افزایش یافت. سیترال و سیترونلال هر دو جز آلدئیدهای گیاهی بوده و دارای خاصیت ضدویروس، ضد میکروب، گشادکننده عروق، کاهش فشار خون، ضدتب، آرام‌بخش و ضداسپاسم است (Djilani and Dicko, 2012) که در این پژوهش سیترال در گیاهچه‌های تحت تیمار افزایش و در کالوس‌ها کاهش یافت و سیترونلول هم در گیاهچه‌ها و هم در کالوس‌های تحت تیمار کاهش

متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی گیاهان مورد مطالعه است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، حضور کادمیوم در محیط کشت گیاه دارویی بادرنجبویه در شرایط کشت درون شیشه، باعث القای پاسخ‌های فیزیولوژیکی، از جمله تولید ترکیبات فنلی به‌عنوان دفاع آنتی‌اکسیدانی گردید که می‌تواند در سازگاری گیاه در محیط آلوده به فلز سنگین کادمیوم اهمیت داشته باشد. همچنین تنش کادمیوم باعث اعمال تغییراتی در تولید متابولیت‌های ثانویه اسانس گیاه و کالوس بادرنجبویه گردید. بنابراین، با تنظیم بهینه شرایط در کشت درون شیشه‌ای گیاهچه و کالوس بادرنجبویه می‌توان با اعمال تنش فلز کادمیوم در جهت افزایش تعدادی از متابولیت‌های ثانویه خاص بهره گرفت.

محلول‌پاشی متانول و سولفات منگنز بر روی گیاه بادرنجبویه میزان نرال، ژرانیال و ژرانیال استات افزایش یافت (حدادی و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه دیگری که بر روی کشت کالوس گیاه پروانش تحت تیمار فلز سنگین کادمیوم انجام شد منجر به افزایش ترکیب اجمالاسین در اسانس گیاه پروانش گردید (Chen et al., 2018). بدین ترتیب نتایج مطالعات مختلف در گیاهان دارویی نشان می‌دهد تولید اسانس به وضعیت متابولیکی بافت‌های منبع و فاکتورهای استرس بستگی دارد (Sangwan et al., 2001). همچنین ترکیب اسانس‌های به‌دست آمده از یک گونه خاص گیاهی براساس جغرافیای منطقه، فصل برداشت، سن گیاه و مرحله رشد و شرایط محیط متفاوت است. مطالعات اندکی بر روی اثر فلزات سنگین بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره دارویی و متابولیت‌های ثانویه گیاهان انجام گرفته است (Nasim and Dhir, 2010). ولی تمام مطالعات انجام‌شده، حاکی از اثرات قابل‌توجه فلزات سنگین بر میزان

منابع

- اسماعیل‌زاده بهابادی، ص. و شریفی، م. (۱۳۹۲) افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه زیستی با استفاده از البیستورهای زیستی. مجله سلول و بافت جلد ۴: ۱۲۸-۱۱۹.
- امینی، ز. و حدادی، ر. (۱۳۹۲) نقش رنگیزه‌های فنوستیزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۶: ۲۵۱-۲۶۵.
- امید بیگی، ر. (۱۳۸۴) تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات آستان قدس رضوی.
- بارنده، ف.، کاوسی، ح. و پورسیدی، ش. (۱۳۹۳) فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فنیل آلانین آمینو لیاز و میزان پرولین گیاهچه‌های عدس تحت تنش کلرید کادمیوم. اولین همایش الکترونیکی یافته‌های نوین در محیط‌زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی. دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- برجیان، م.، خوش سخن مظفر، م. و خسروی رینه، م. (۱۳۹۶) تغییرات آنتی‌اکسیدان در گیاه *Brassica olerac L. cv. Saccata* تحت تنش با فلز سنگین کادمیوم. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد آشتیان، آشتیان، ایران.
- پورتبریزی، ث.، پورسیدی، ش.، عبدالشاهی، ر. و نادرزاده، ن. (۱۳۹۷) تأثیر تنش کادمیوم بر برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه دارویی مارتیغال (*Silybum marianum*). فرآیند و کارکرد گیاهی ۲۶: ۴۱-۵۴.
- حبیبی، ق.، قربانزاده، پ. و عابدینی، م. (۱۳۹۵) تأثیر سلنیوم بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی بادرنجبویه. نشریه علمی تحقیقاتی گیاهان دارویی و معطر ایران ۷۸: ۶۹۸-۸۱۵.
- حدادی، ه.، مرادی، پ. و مطلبی، ا. (۱۳۹۴) تأثیر محلول‌پاشی متانول و سولفات منگنز بر میزان و اجزای اسانس گیاه بادرنجبویه. فصلنامه گیاهان دارویی ۵۸: ۸۰-۸۸.

- سلطانی، ف.، قربانلی، م. و منوچهری کلانتری، ف. (۱۳۸۵) اثر کادمیوم بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها و مالون دی‌آلدئید در گیاه کلزا. مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۱۴۵-۱۳۶.
- عباس‌زاده، ب.، شریفی عاشور آبادی، ا.، اردکانی، م.، لباسچی، م.، صفی‌خانی، ف. و نادری حاجی باقرکندی، م. (۱۳۸۵) بررسی تأثیر روش مصرف کود نیتروژن بر بازده و درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه تحت شرایط مزرعه. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۲: ۲۲۳-۲۳۰.
- علمی، ح.، احمدی موسوی، ع. و حسینی، ن. (۱۳۹۲) بررسی تیمار برون‌زای اسیدهای آلی کربوکسیلیک بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میزان جذب فلزات کادمیوم و سرب در گیاهچه‌های کلزا. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۱: ۳۸-۲۵.
- عبدلی، م.، سعیدی، م.، جلالی هنرمند، س.، منصورفر، س. و قبادی، م. (۱۳۹۲) بررسی برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و ارتباط آنها با عملکرد و اجزای آن در ارقام پیشرفته گندم نان در شرایط تنش کم آبی پس از گرده افشانی. مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۶: ۶۳-۴۷.
- نقدی بادی، ح.، زینلی مبارکه، ز.، امید، ح. و رضازاده، ش. (۱۳۹۰) تغییرات مورفولوژیک، زراعی و فیتوشیمیایی گاوزبان (*Borago officinalis* L.) تحت تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی. فصلنامه گیاهان دارویی ۹: ۱۵۶-۱۴۵.
- Agrawal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M. and Sharma, V. (2012) Metal toxicity and photosynthesis in Photosynthes: Overview on rescent progress and future perspectives (eds. Shigeru, I., Mohanty, P. Guruprasad, K.) Pp. 229-236. International Publisher, New Delhi.
- Ali, M. B., Singh, N., Shohael, A. M. and Hahn, E. J. (2006) Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171: 147-154.
- Almedia, A. A. F., Vale, R. R., Mielke, M. S. and Gomes, F. P. (2007) Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. *Brazilian Journals of Plant Physiology* 19: 83-98.
- Amin, A. L. (2008) Cadmium induced changes in pigment content, ion uptake, prolin content, and photo on phenol pyruvate carboxylase activity in *Triticum aestivum* seedlings. *Australia Journal of Basic and Applid Sciences* 2: 57-62.
- Atal, C. K. and Kapur, B. M. (1998) Cultivation and utilization of medicinal plants. India Regional Research Laboratory, Jammu, Tawi.
- Bahalsberg-Pahlsson, A. M. (1989) Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water, Air and Solil Pollution* 47: 287-319.
- Bajguz, A. (2011) Suppression of *Chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead and coper stress and its restoration by endogenous brassinolide. *Achives of Environmental Contaminatin and Toxicology* 60: 406-416.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 21-34.
- Bertrand, M. and Schoefs, B. (1999) Photosyntetic pigment metabolism in plants during stress, In: *Handbok of Plant and Crop Stress* (ed. Pessaraki, M.) Pp. 527-543. Marcel Dekker, New York.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Challahan, D. L., Baker, A. J. M., Kolev, S. D. and Wedd, A. G. (2005) Metal ion ligands in hyper accumulating plants. *Journal of Biological in Organic Chemistry* 11: 2-12.
- Chen, Q., LU, X., Guo, X., Pan, Y., Yo, B., Tang, Z. and Guo, Q. (2018) Differentail responses to Cd stress indused by exogenous application of Cu, Zn or Ca in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157: 75-266.
- Chu, Y. H. and Chang, C. L. (2000) Flavonoid contents of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Science* 80: 561-566.
- Davies, N. W. (1990) Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methylsilicon and carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography* 503: 1-24.
- Djilani, A. and Dicko, A. (2012) The therapeutic benefits of essential oils. *Nut Well-Bing Health* 7: 79-155.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P. C., Suresh, S., Damodharam, T. and Suresh, C. (2009) Cadmium induced changes on prolin, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogea* L. *Journal of Environmental Biology* 30: 289-294.

- Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F. and Merino, F. (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedling in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science* 161: 179-188.
- Dai, L. P., Xiong, Z. T., Huang, Y. and Li, M. J. (2006) Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla mbricata*. *Environmental Toxicology* 21: 12-505.
- Figuerido, A. C., Barrose, J. G., Pedro, L. G. and Scheffer, J. C. (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils *Flavour and Fragrance Journal* 22: 213-226.
- Heywood, V. H. (2002) The conservation of genetic and chemical diversity in medicinal and aromatic plants. *Biodiversity Springer* 13-22.
- Khatib, M., Rashed Mohasel, M., Ganjali, A. and Labouti, M. (2008) The effect of different nickel concentration on some morpho-physiological characteristics of parsley (*petroselinom crispum*). *Iranian Journal of Field Crops Research* 2: 3-295.
- Kovacik, J. and Backor, M. (2007) Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. *Water, Air and Soil Pollution* 185: 185-193.
- Krizek, D. T., Britz, S. J. and Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum* 103: 1-7.
- Li, X. M., Tian, S. L. and Pang, Z. C. (2009) Extraction of cuminum cyminum essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and system distillation. *Food Chem* 115: 1114-1119.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Mahmoudi, R., Zare, P., Nosratpour, S., Mardani, K. and Safari, F. (2014) Hygienic effects of *Teucreium polium* essential oils against *Salmonella typhimoriom* in probiotic yoghurt. *The International Food Research Journal* 2013: 20.
- Mayer, A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: A review. *Phytochemistry* 67: 2318-2331.
- Middleton Jr, E., Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. and Prasad, M. N. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 25-37.
- Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A. and Smetank, I. (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 218-226.
- Murashige, I. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 92: 21-30.
- Namdeo, A. (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews* 1: 320-345.
- Nasim, S. A. and Dhir, B. (2010) Heavy metals alter the potency of medicinal plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 203: 139-149.
- Prasad, M. and Strzalka, K. (2002) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. *Springer* 432.
- Prasad, A., Kumar, S., Khaliq, A. and Pandey, A. (2011) Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 47: 853-861.
- Rubio, C., Lucas, J. R. D., Gutierrez, A. J., Glez-weller, D., Perez Marrero, B., Caballero, J. M., Rvert, C. and Hardisson, A. (2012) Evaluation of metal concentration in menthe herbal teas (*Mentha piperita* L. *Mentha pulegium* L and *Mentha* species) by inductively coupled plasma spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 71: 11-17.
- Rai, V., Khatoon, S., Bisht, S. and Mehrotra, S. (2005) Effect of cadmium on growth, ultrastructure of leaf and secondary metabolites of *phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *Chemosphere* 61: 1644-1650.
- Rastgoo, L. and Alemzadeh, A. (2011) Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science* 5: 375-383.
- Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S. and Sudhakar, C. (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflora* (Lam)). *Verdc and bengagram (Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60: 97-104.
- Sakihama, Y. and Yamosaki, H. (2002) Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminium ions. *Biologia Plantarum* 45: 249.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., shabih, F. and Sangwan, R. S. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21

- Sebastiani, L., Scebba, F. and Tognetti, R. (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoids maximowiczii*) and I-214 (*P. euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany* 52: 79-88.
- Siddiqui, H. M., Al-Whaibi, H. and Basalah, O. M. (2010) Interactive effect of cadmium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticumaestivum* L. *Protoplasma* 248: 503-511.
- Sinha, S. and Saxena, R. (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62: 1340-1350.
- Silvestre, A. J. and Gandini, A. (2008) Terpenes: major sources, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* 17.
- Shi, G., Liu, C., Lu, Q. and Hou, C. (2010) Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bulletin of Environmental Behavior* 7: 1456-1466.
- Singh, B. R. and Narwall, R. P. (1999) Plant availability of heavy metals in a sludge treated soil. *Journal of Environmental Quality* 3: 9-344.
- Solecka, D. (1997) Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factor. *Plant Physiology* 19: 257-268.
- Sonald, S. F. and Laima, S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Griculture* 1: 1-5.
- Souza, J. F., Dolder, H. and Cortelzaao, A. L. (2005) Influence of Mn toxicity on photosynthesis in *Vigna umbellate* seedlings. *Phptosynthetica* 38: 449-453.
- Tanyolac, D., Ekmekci, Y. and unalan, S. (2007) Changes in photochemical and antioxidant enzyme activites in maize (*Zea mays* L.) leaves exposes to excess copper. *Chemosphere* 98: 89-98.
- Tian, X. and Li, Y. (2007) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50: 775-778.
- Tirillini, B., Ricci, A., Pintore, G., Chessa, M. and Sighinolfi, S. (2006) Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* L. in response to chromium. *Fitoterapia* 77: 164-170.
- Tran, T. L. H. and Raymundo, L. C. (1999) Biosynthesis of carotenoids in bitter melon at high temperature. *Phytochemistry* 52: 80-275.
- Tripathi, A. K., Sadhna, T. and Tripathi, S. (1999) Change in some physiological and biochemical characters in *Albizia lebbek* as bio-indicators of heavy metal toxicity. *Journal of Environmental Biology* 20: 93-98.
- Tripathi, B., Mehta, S., Amar, A. and Gaur, J. (2006) Oxidatives stress in *Scenedesmus* sp. during short and long term exposure to Cu and Zn. *Chemosphere* 62: 538. *Plants: A review. Plant Physiology* 23: 114-133.
- Van Assche, F. and Vlijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, cell and Environment* 13: 195-206.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology* 64: 88-93.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effect of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 218-223.
- Xue, Z. C., Gao, H. Y. and Zhang, L. T. (2013) Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soyben seedlings. *Biologia Plantarum* 57: 59-587.
- Zargari, A. (1990) *Medicinal Plants*. 4th Ed. Tehran University Press. Tehran.
- Zheljazkov, V. D. and Nielsen, N. E. (1996) Effect of heavy metals on peppermint and cornmint. *Plant and Soil* 178: 59-66.

Evaluation of changes in phenolic compounds and secondary metabolites of calluses and seedlings of *Melissa officinalis* L. under cadmium heavy metal stress

Nasimsadat Musavi and Roya Razavizadeh *

Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: 15/09/2020, Accepted: 02/11/2020)

Abstract

The present study was designed and conducted to investigate the effects of different concentrations of cadmium on some physiological parameters and changes in secondary metabolites in the medicinal plant *Melissa Officinal* L. in vitro culture conditions. For this purpose, first seeds of *Melissa Officinali* L. were sterilized and then cultured in MS medium. Then, the explants of 4-week-old seedlings were transferred to MS medium containing different concentrations of cadmium nitrate (150 and 300 μM) and kept in the culture room under controlled conditions. Also, callus obtained from stem explants were transferred to hormonal medium (0.25 mg L^{-1} 2,4-D and 5 mg L^{-1} BAP) containing different concentrations of cadmium (150 and 300 μM). Four weeks after treatment, photosynthetic pigments and levels of anthocyanin, phenols and flavonoids in seedlings were evaluated. Also, changes in secondary metabolites were investigated through GC-mass analyzes in calluses and seedlings of *Melissa Officinal* L. The results showed that increasing the concentration of cadmium nitrate in the medium decreased the amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids as well as anthocyanin in seedlings. With increasing the amount of cadmium nitrate in the medium, the content of phenols and flavonoids increased significantly. The results of GC-mass showed significant changes in the amount of secondary metabolites and essential oil of *Melissa Officinal* L seedlings and calli under cadmium stress. Most changes were found in γ -3-carn, transcarveole, citronlal, citronellol. Citral and β -caryophylline. In general, cadmium treatment by inducing physiological responses, including the production of phenolic compounds and changes in secondary metabolites increased plant antioxidant defense, which can be important in adaptation to cadmium stress.

Keywords: Anthocyanin, Callus, Essential oil, Flavonoid, in vitro culture, Photosynthetic pigments.

Corresponding author, Email: razavi.roya@gmail.com