مقاله پژوهشی

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 پیام‌نورتهران

(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 $mg.L^{-1}$ ۰/۲۵ و $BAP^{۲}$ با غلظت $mg.L^{-1}$ ۵) حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) انتقال یافتند. چهار هفته پس از کشت میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی 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 کاروئل، سیترونلال، سیترونلول، سیترال و بتا- کاریوفیلین مشاهده شد. به‌طورکلی 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 فتوسنتزی، فلاونوئید، کالوس، کشت درون شیشه‌ای، مواد مؤثره دارویی

مقدمه

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 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

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

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 زیست شناختی به سه گروه مهم شامل ترپن‌ها، فنول‌ها و ترکیبات نیتروژن‌دار تقسیم می شوند (Bourgaud *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 پنج کربنی مشابه در تمام آنهاست که به واحدهای ایزوپرن مشهورند (Silvestre and Gandini, 2008). از متابولیت‌های ثانویه نیتروژن‌دار می‌توان به آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای سیانوژنی 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 نعناییان (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، ضدموتاسیون و ضدترومبوز است. به علاوه ترکیبات فنولیک دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی زیادی می‌باشند. گیاه بادرنجبویه دارای اسانس به رنگ زرد کم رنگ 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 زیست محیطی آلوده‌شدن خاک زیر کشت گیاهان مختلف به فلزات سنگین می‌باشد. تعدادی از آنها (مس، روی، نیکل، مولیبدین، منگنز و آهن) عناصر کم مصرف 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 ونمو 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. درنتیجه 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 تدثیر 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 متیل کاویکول افزایش یافت (Prasad *et al.*, 2011). در تحقیق دیگری مشخص شد که با افزایش مس در محیط‌کشت 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). مطالعات نشان می‌دهد که در شرایط تنش فلزات سنگین برخی از این متابولیت‌های ثانویه به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Rai

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

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 ٤٠٠ متری از منبع آلودگی (کارخانه ذوب فلزات غیرآهنی) عملکرد اسانس گیاهان نعناع فلفلی و نعناع صحرایی را بیشتر از ١٤ 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 بر خوردار است. با توجه به متأثرشدن 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.

مواد و روش‌ها

تولید گیاهچه و کالوس بادرنجبویه در شرایط درون شیشه و اعمال تیمار: بذرهای گیاه بعد از شستشو با آب‌مقطر، با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه ضدعفونی شد و سپس به‌مدت ٦ دقیقه در آب ژاول ۲۰ درصد قرار گرفت، سپس بعد از چند بار شستشو با آب‌مقطر 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 (K, P, N, S, Mg, Ca)، عناصر میکرو (B, Cu Zn, Mn, Fe, Mo, I, Co)، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها (اسید نیکوتینیک (B3)، تیامین (B1)، پیرودوکسین (B6)، اسیدهای آمینه همچون گلایسین و ترکیبات پیچیده مثل پپتون بود. عناصر معدنی ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها به‌صورت 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 به‌مدت چهار هفته در اتاق کشت با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ١٦ 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 واکشت 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

محیط‌های پایه هورمونی (شامل 2, 4-D با غلظت $mg.L^{-1}$ ۰/۲۵ و BAP با غلظت $mg.L^{-1}$ ۵) منتقل و در اتاق کشت نگهداری شدند. پس از چهار هفته، کالوس‌های حاصل به محیط‌های هورمونی حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) منتقل شدند. ۲۸ روز پس از واکشت کالوس‌ها در محیط‌های تیمار کادمیوم، کالوس‌های حاصل جهت اندازه‌گیری میزان متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره دارویی مورد بررسی قرار گرفتند.

سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید: برای سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم برگ تر در هاون چینی که حاوی ۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد بود سائیده شد. محتوای هاون با کاغذ صافی صاف گردید. حجم محلول با استن ۸۰ درصد به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار ۳ میلی‌لیتر از این محلول، جهت خواندن شدت جذب در طول‌موج‌های ٦٦٣/٢، ٦٤٦/٨ و ٤٧٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 استفاده شد. برای تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر از استن ۸۰ 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 آنتوسیانین: سنجش میزان آنتوسیانین بر طبق روش Wagner (۱۹۷۹) انجام گردید. در این روش ۰/۰۵ گرم بافت تر (برگ و ریشه) در هاونی که حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت ۹۹ به ۱) بود، هموژنیز گردید. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر دیگر متانول اسیدی به آن اضافه شد. عصاره حاصل به لوله آزمایش در پیچ‌دار منتقل و به‌مدت ٢٤ ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس عصاره به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٤٠٠٠ g سانتریفوژ گردید در دمای محیط (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و۳ میلی‌لیتر از محلول رویی برای خواندن شدت جذب آن در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 استفاده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی معادل $mmol^{-1}cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد. برای محاسبه غلظت از فرمول $A= \varepsilon bc$ استفاده گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید. در این فرمول: A میزان جذب خوانده‌شده در طول‌موج ۵۵۰ نانومتر، ε ضریب خاموشی $mmol^{-1}\,cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰، b عرض کووت ۱ cm و C غلظت محلول مورد نظر بر حسب میلی‌مولار است.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: سنجش میزان ترکیبات فنلی بر طبق روش Sonald و laima (۱۹۹۹) انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم از برگ و ریشه گیاه جداگانه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به‌مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول روئی به ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و با آب دو بار تقطیر، حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه و مخلوط حاصل به‌مدت ۱ ساعت در تاریکی نگه‌داری شد. سپس جذب هر نمونه درطول‌موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 خوانده شد. غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید: سنجش میزان فلاونوئیدهای برگ وریشه بادرنجبویه به روش اسپکترفتومتری بر طبق روش Krizek و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. مقدار ۰/۵ گرم برگ تر در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (شامل الکل اتیلیک ۹۵ درصد و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۹۹ به ۱) سائیده شد و عصاره حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٤٠٠٠ g سانتریفوژ در دمای محیط (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) گردید. محلول رویی جدا شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه به آرامی در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس شدت جذب، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل JENWAY 6305 در سه طول‌موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

ارزیابی مواد مؤثره اسانس گیاهچه و کالوس بادرنجبویه با دستگاه گاز کروماتوگراف جرم سنجی GC/MC: 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 به‌طول 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 ٤ درجه در دقیقه استفاده شد. از هلیم فوق خالص با سرعت عبور ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده گردید. شناسائی 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

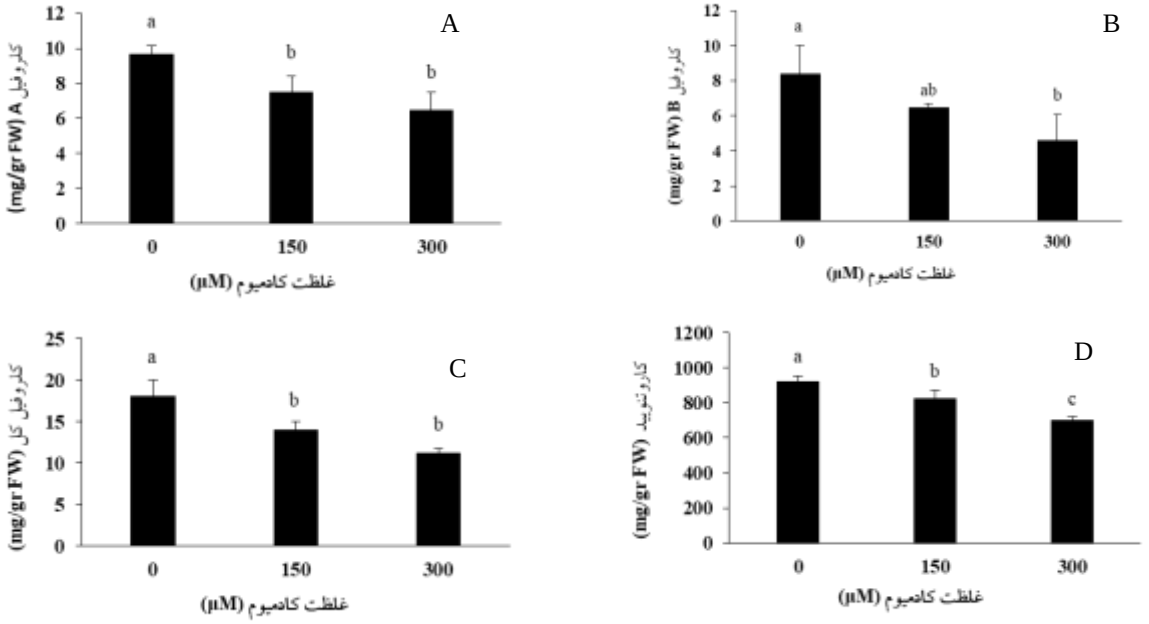
تأثیر فلز کادمیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های بادرنجبویه: نتایج حاصل از تأثیر تیمار غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار فلز سنگین کادمیوم بر میزان کلروفیل‌های a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید در شکل ۱ نشان داده شده است. افزایش میزان فلز کادمیوم در محیط باعث کاهش میزان کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل در گیاهچه‌های بادرنجبویه گردید (شکل A۱، B و C). افزایش میزان فلز 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 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.

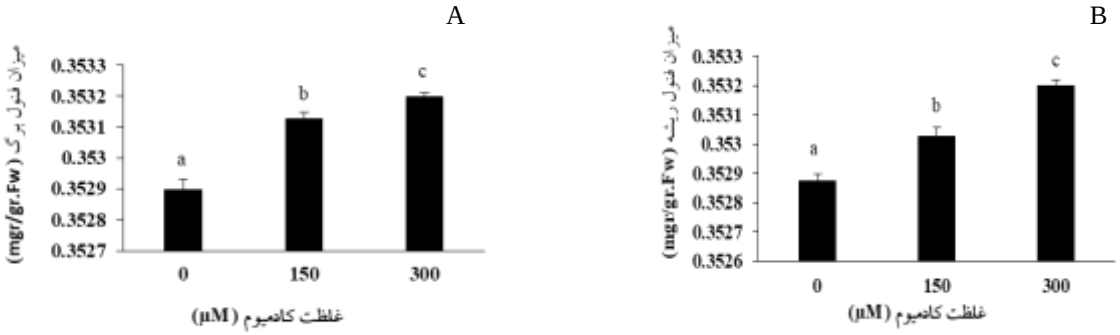
تأثیر کادمیوم بر میزان آنتوسیانین: نتایج حاصل از بررسی میزان آنتوسیانین حاصل از کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه در محیط حاوی نیترات کادمیوم در شکل ۳ (A و B) نشان داد افزایش میزان فلز کادمیوم در محیط‌کشت گیاهچه‌های بادرنجبویه موجب کاهش میزان آنتوسیانین تولیدشده در گیاه گردید. فلز کادمیوم در هر دو غلظت ۱۵۰ و 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 ٤ (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 و۳۳۰ 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]



شکل ۱ـ بررسی اثر کادمیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه‌های بادرنجبویه ٤ 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.



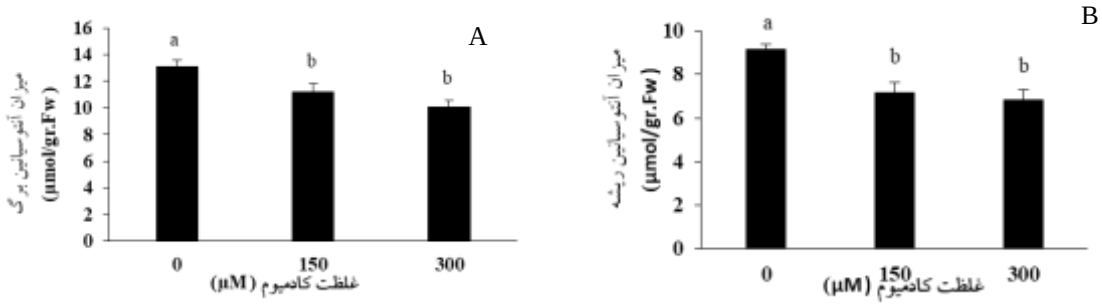
شکل ۲- بررسی اثر کادمیوم بر میزان محتوای فنول گیاهچه‌های بادرنجبویه، ٤ هفته پس از کشت. (A) برگ و (B) ریشه. مقادیر میانگین ۳ تکرار و حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار براساس آزمون توکی در سطح $P\leq 0.05$ می‌باشد.

نشان داد.

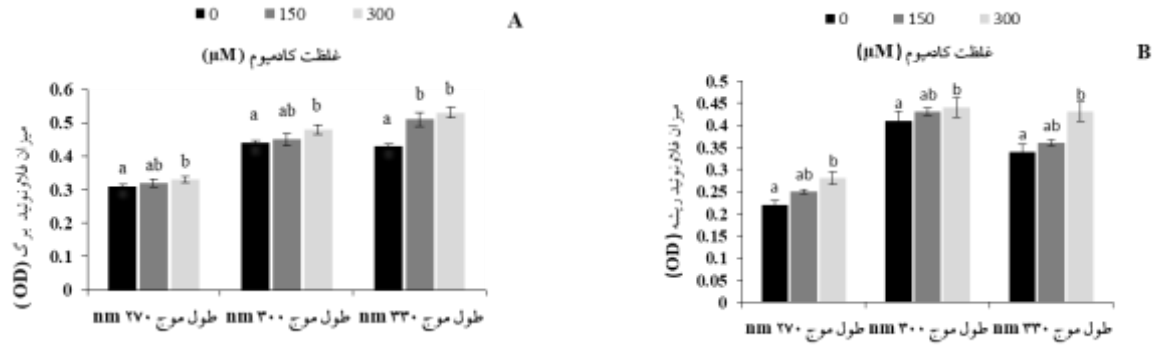
شناسایی ترکیبات اسانس گیاهچه و کالوس بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم و بدون آن به روش GC/MS: تغییرات ترکیبات مؤثره دارویی گیاهچه و کالوس‌های بادرنجبویه طی چهار هفته با استفاده از GC-MS مورد آنالیز قرار گرفت (جدول ۱). نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد که اسانس حاصل از گیاه بادرنجبویه و کالوس‌های آن دارای ۳۸ ترکیب است که در بین این ترکیبات γ-3- کرن، لینالول، ترانس کاروئل، سیترونلال، سیترونلول، سیترال، ß- کاریوفیلن بیشترین درصد ترکیبات را به خود اختصاص داده‌اند. بر این اساس مقادیر کارواکرول استات، لیمونن، کارواکرول، گاما-۳-کارن، سیترال، بتا- کاریوفیلن بیشترین میزان افزایش را در میان ترکیبات اصلی اسانس گیاهچه‌های تیمارشده با ۳۰۰ میکرومولار کادمیوم نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]



شکل ۳- بررسی اثر کادمیوم بر میزان محتوای آنتوسیانین گیاهچه‌های بادرنجبویه ٤ 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 ٤- بررسی اثر کادمیوم بر محتوای فلاونوئید گیاهچه‌های بادرنجبویه ٤ 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.

مقابل بیشترین میزان کاهش ترکیبات اصلی اسانس برای تیمول، سیس- سابینن، ترانس کاروئل، سیترونلول، کاریوفیلن اپوکساید، جرما کرن-دی و سیترونلال ثبت گردید.

در کالوس‌های تیمارشده با کادمیوم ۳۰۰ میکرومولار بیشترین افزایش مربوط به ترکیبات اصلی، گاما- ترپینن، 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 فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه کالوس و گیاهچه بادرنجبویه، به‌عنوان یکی ازگیاهان مهم و ارزشمند دارویی، نسبت به تنش فلزات سنگین در شرایط کشت درون شیشه مورد ارزیابی قرار گرفت. فرایندهای فیزیولوژیک از جمله فتوسنتز در گیاهان عالی به فلزات سنگین بسیار حساس هستند (Tanyolac *et al.*, 2007). مطالعات متعددی بازدارندگی فتوسنتز در گیاهان مختلف رشدیافته تحت تنش فلزات سنگین را گزارش کرده‌اند. فلزات سنگین کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق بازگشایی روزنه، آسیب به سازماندهی ساختار کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوسنتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و... با یون فلز در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی القاء کنند. سمیت فلزات سنگین همچنین تنش اکسیداتیو را از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپر اکسید،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

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

نام ترکیب	محتوای نسبی (درصد)				
	زمان بازداری	گیاه شاهد	گیاه تیمار	کالوس شاهد	کالوس تیمار
۱و۳-اکتادین	۷/٦	۰	۰/۹	۱/۱	۰/۷
آلفا - پینن	۹/۸	۱	۱/۲	۰/۸	۱/۲
۱-اکتان-۳- ال	۱۰/۵	۱/۲	۰/۸	۰/۷	۰/۸
میرسین	۱۱	۱/۳	۱	۰/۹	۱
گاما-۳- کارن	۱۱/۳	٤/٤	٦/٦	٤/۲	۵/۷
آلفا- فلاندرین	۱۱/۸	۰/۹	۱/٤	۰/۹	۱/٤
پارا سیمن	۱۲/۲	۱/۸	۱/۷	۱/٤	۱/۹
لیمونن	۱۲/٦	۰/۸	۱/۳	۲/۸	۳/۳
ایکالیپتول	۱۲/۹	۱	۱/۱	----	----
۱و۳و٦- اکتاترین	۱۳/۵	۱/۵	۱/۲	۱/۲	۱/٦
گاما- ترپنین	۱٤/۱	۱/۱	۰/۹	۰	۱/۲
لینالول	۱٤/٤	٤/٦	٤/۸	٤/۵	٤/۸
سیس- سابینین	۱٤/۸	۱/۳	۰/۸	-----	-----
۳-متیل-۲-(متیل-۲-۲ بوتنیل)	۱۵/۷	۰/۹	۱	۱/۲	۱
بتا- توژن	۱٦/۳	۲/۵	۱/۳	۱/۷	۱/٤
۵- هپتن-۱- ال	۱۷/٤	۱/۳	۱/٦	۱/۳	۱/۹
بایسیکلو(۲,۲,۱) هپتن-۲-وان	۱۷/۸	۰/۷	۰/۸	۱/۲	۰/۸
ایزوپولژل	۱۸/۲	۰/۸	۲/٦	۰/۹	۱/٦
ترانس-کاروئل	۱۹/۵	۱۱/۲	۷/۲	۱۲	۹/۱
سیترونلال	۲۰/۱	۲۰/٦	۱۷/۱	۲۱/۵	۱۸/۲
ایزوبورنئول	۲۰/٤	۰/۸	۱/۲	۰/۹	۱/۳
سیترونلول	۲۱/۸	۸/۷	٦/۳	۷/۱	۹/۳
۱,۳,۸- پی-منتاتارین	۲۲/٤	۳/۵	٤	-----	-----
سیترال	۲۳/۹	٦	۸/٦	۹/۹	٦/۸
۳,٦- اکتادینوئیک اسید	۲٤/۲	۰/۹	۰/۸	۱/٤	۱
تیمول	۲۵/۱	۲/۲	۱/۳	۳	۳/۳
کارواکرول	۲۵/۵	۱/۵	۲/۳	۱/۹	۲/۸
کارواکرول استات	۲٦	۰/۹	۱/٦	۱/۳	۱/٦
بتا- گاریوفیلین	۲۹/۸	۵	٦/۸	٦/۸	٤/۹
کاریوفیلین اپوکساید	۳۰/۳	۱/۹	۱/٤	۱/۷	۱/٤
کالامنن	۳۰/۷	۱	۱/۷	۱/۲	۱/۹
آلفا- هومولن	۲۱/۷	۱/۲	۲	۲/۱	۲/۳

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

ادامه جدول ۱-

نام ترکیب	محتوای نسبی (درصد)				
	زمان بازداری	گیاه شاهد	گیاه تیمار	کالوس شاهد	کالوس تیمار
دی- جرماکرن	۲۳/۹	۱/۵	۱/۲	۱	۱/۸
بتا- یونن	۳۳/۱	۰/۹	۰/۹	-----	-----
بتا- بیسابولن	۳٤	۱/۳	۱/۵	۰/۹	۱/٤
ایگنول	۳۵/۱	۰/۹	۰/۸	۰/۸	۰/۹
آلفا- مورولن	۳٦/٦	۱	۰/۹	۱/۳	۱/۱
بتا- کوبین	٤۰/۲	۱/۳	۰/۸	-----	-----
درصد نهایی ترکیبات		۹۹/٤	۹۹/٤	۹۹/٤	۹۹/٦

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 درنتیجه 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 بازدارندگی 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 فتوسنتزی 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 کادمیوم عنوان شده است (Prasad and Strzalka, 2002). غلظت بالای کادمیوم، سنتز کلروفیل را از طریق مختل‌کردن 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 به‌دنبال 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 دست‌رفتن کلروفیل در اثر اعمال تنش کادمیوم در این تحقیق می‌تواند جنبه سازگاری نیز داشته باشد زیرا با کاهش کلروفیل، الکترون برانگیخته‌شده طی فتوسنتز کاهش یافته و به‌دنبال آن خسارت‌های ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۲).

کاروتنوئیدها، شامل کاروتن و گزانتوفیل‌ها آنتی‌اکسیدان-های 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 به‌دلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

درنتیجه سبب برهم ریختن ساختارشان می‌گردد. کاروتنوئیدها در سمیت‌زدایی کلروفیل برانگیخته نقش دارند. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می توانند 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 (علومی 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 غلظت های 10^{-4} و 10^{-6} مولار، کلروز (کم-شدن یا از بین‌رفتن رنگدانه زرد طبیعی) را از خود نشان دادند و این امر به‌دلیل کاهش چشمگیر محتوای کلروفیل کل ٢٤ ساعت و ٤٨ 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 معنی‌داری افزایش می‌یابد. بیشترین میزان ترکیبات فنلی در گیاهچه و ریشه بادرنجبویه در غلظت ۳۰۰ میکرومولار نیترات کادمیوم مشاهده می‌گردد. ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعدد مثل ربایش رادیکال‌های آزاد، خاموش‌کردن اکسیژن یکتایی، کلات‌کردن 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 پروپانوئید هستند که در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل آلانین آمینولیاز (PAL) آغازگر مسیر فنیل پروپانوئید است که L-فنیل آلانین را با دآمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Solecka, 1997). افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمینولیاز 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 (Kovacik 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، به‌نظر می‌رسد که افزایش ترکیبات مختلف فنلی (به‌عنوان یک جزء آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی) نقش بسیار مهمی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

در پاسخ گیاه بادرنجبویه به تنش فلز کادمیوم ایفا می‌کند. این ترکیبات آنتی‌اکسیدان‌های نیرومندی در بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش می‌باشند و این خاصیت به‌دلیل 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 کلاته‌کردن 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 بیوسنتز ترکیبات فنلی تحت شرایط تنش اکسیداتیو توسط Mohdaly و همکاران (۲۰۰۹) ارائه گردید. در سال‌های اخیر ترکیبات فنلی به‌دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی به‌شدت 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 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 درنتیجه کاهش تولید قند و به‌دنبال 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. درگیاهان در معرض تنش، فلاونوئیدها به‌عنوان جاروب‌کننده‌های رادیکال آزاد عمل می‌کنند و با شناسایی تعداد و موقعیت گروه‌های OH فنلی حاضر، کار پاکسازی رادیکال‌ها را انجام می‌دهند، از این‌رو 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 به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمل می‌نمایند. نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با نتایج بارنده و همکاران (۱۳۹۳) در گیاه عدس و همچنین پورتبریزی و همکاران (۱۳۹۷) در گیاه مارتیغال 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 (به‌ویژه o – دی‌فنول-ها) در شرایط تنش سبب تولید ترکیبات جاروب‌کننده H_2O_2 می‌گردد (Dai *et al.*, 2006). پلی‌فنل 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 پلی‌فنل اکسیداز اثر می‌گذارد (Mayer,

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

2006; Winkel-Shirley, 2002). 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، دهندهٔ هیدروژن، برطرف‌کننده‌های اکسیژن منفرد و متصل‌شونده با عناصر عمل کنند (Sakihama and Yamosaki, 2002). به‌طورکلی 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 احیاءشده فلاونوئیدها دارد و شکل اکسیدشده 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 شناسایی‌شده 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 ضدمیکروب هستند (Bahalsberg-Pahlsson, 1989) که در این پژوهش لینالول در گیاهچه و کالوس کمی افزایش یافت و سیترونلول در گیاهچه‌های تیمارشده کاهش و در کالوس به نسبت بیشتری افزایش یافت. سیترال و سیترونلال هر دو جز آلدئیدهای گیاهی بوده و دارای خاصیت ضدویروس، ضدمیکروب، گشادکننده عروق، کاهش فشار خون، ضدتب، آرام‌بخش و ضداسپاسم است (Djilian 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 یافت. از آنجایکه 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 درنتیجه کاهش تولید آنها را نتیجه‌گیری کرد.

γ–3– کرن و ترانس کاروئل 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 γ–3– کرن در گیاهچه‌ها و کالوس افزایش یافت و ترانس کاروئل در گیاهچه و کالوس کاهش داشت. ß– کاریوفیلن 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 تیمارشده افزایش و در کالوس‌های تیمارشده کاهش داشت. اگر چه متابولیت‌های ثانویه به وسیله ژن‌ها کنترل می‌شوند ولی تولید آنها به میزان زیاد، تحت تأثیر عوامل محیطی می‌باشد (امید بیگی، ١٣٨٤) 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 تاثیر موارد مختلف تنش موجود است. در بررسی تاثیر نیتروژن بر گیاه بادرنجبویه گزارش شده است با افزایش میزان نیتروژن در محیط میزان ترکیبات سیترونلال و کاریوفیلن اکساید کاهش پیدا کردند. در مقابل با افزایش میزان نیتروژن، مقادیر ژرانیال و نرال افزایش یافتند (عباس‌زاده و هکاران، ١٣٨٥). در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

محلول‌پاشی متانول و سولفات منگنز بر روی گیاه بادرنجبویه میزان نرال، ژرانیال و ژرانیال استات افزایش یافت (حدادی و همکاران، ۱۳۹٤). در مطالعه دیگری که برروی 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 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.

منابع

اسماعیل‌زاده بهابادی، ص. و شریفی، م. (۱۳۹۲) افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه زیستی با استفاده از الیسیتورهای زیستی. مجله سلول و بافت جلد ٤: ۱۲۸-۱۱۹.

امینی، ز. و حداد، ر. (۱۳۹۲) نقش رنگیزه‌های فنوستنزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲٦: ۲۵۱-۲٦۵.

امید بیگی، ر. (۱۳۸٤) 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. (۱۳۹٦) 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 نادرنژاد، ن. (۱۳۹۷) تأثیر تنش کادمیوم بر برخی صفات مورفولوژیک وفیزیولوژیک گیاه دارویی مارتیغال (*Silybum marianum*). فرآیند و کارکرد گیاهی ۲٦: ٤۱-۵٤.

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: ٦۹۸-۸۱۵.

حدادی، ه.، مرادی، پ. و مطلبی، ا. (۱۳۹٤) تأثیر محلول‌پاشی متانول و سولفات منگنز بر میزان و اجزای اسانس گیاه بادرنجبویه. فصلنامه گیاهان دارویی ۵۸: ۸۰-۸۸.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

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.، صفی خانی، 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.

علومی، ح.، احمدی موسوی، ع. و حسیبی، 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.، منصوری‌فر، 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 ٦: ٦٣-٤٧.

نقدی بادی، ح.، زینلی مبارکه، ز.، امیدی، ح. و رضازاده، ش. (۱۳۹۰) تغییرات مورفولوژیک، زراعی و فیتو شیمیایی گاوزبان (*Borago officinalis* L.) تحت تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی. فصلنامه گیاهان دارویی ۹: ۱۵٦-۱٤٥.

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. Astralia 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. Pessarakli, M.) Pp. 527-543. Marcel Dekker, New York.

Bourgaud, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

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 n pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonialyase 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 secoundary metabolite production in plants: volatile components and essential oils Flavour and Fragrance Journa 22: 213-2266.

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 (*petroseliom crispum*). Iranian Journal of Field Crops Research 2: 3-295.

Kovacik, J. and Backor, M. (2007) Phenylalanine ammonialyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. Water, Air and Solil 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 firelettuce. 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 Enzymology148: 350-382.

Mahmoudi, R., Zare, P., Nosratpour, S., Mardani, K. and Safari, F. (2014) Hygenic effects of *Teucreium polium* essential oils against *Salmonela typhimoriom* in probiotic yoghurt. The International Food Research Journal 2013: 20.

Mayer, A. M. (2006) Poliphenol 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., Srivastave, 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. Plangt 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. Achives of Environmental Contaminatin 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, ultramorphology of leaf and secoundy 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 uniflorm* (Lam)). Verdc and bengagram (*Cicer arietinum* L.). Chemosphere 60: 97-104.

Sakihama, Y. and Yamosaki, H. (2002) Lipid peroxidation induces by phenolics in cinjunction 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

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 tolerace 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. Phptosynthettica 38: 449-453.

Tanyolac, D., Ekmekci, Y. and unalan, S. (2007) Changes in photochemical and antoxidant 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. Biologa 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) Biosyntesis 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]

Evaluation of changes in phenolic compounds and secondary metabolites of calluses and seedlings of *Mellissa 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 *Mellissa Officinal* L. in vitro culture conditions. For this purpose, first seeds of *Mellissa Offcinali* 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 *Mellissa 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 *Mellissa 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-02-19]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.41.17.7]