

Investigation of the Effects of Lead and Cadmium Pollution on Enzymatic Activities and Stress Tolerance in Five Genotypes of Medicinal Plants

Basaki^{1*}, T., Paykarestan¹, B. and Azimi², M. H.

Received Date: 01 May 2024

Accepted Date: 12 July 2024

(Research Article)

Abstract

Heavy metal pollution in agricultural soils, particularly in industrial areas, is a growing concern that can negatively affect plant growth, performance, and the health of herbal products. This two-year study evaluated the enzymatic and metabolic responses of five medicinal plant genotypes—Peppermint (*Mentha piperita*), Chamomile (*Matricaria chamomilla*), Thyme (*Thymus vulgaris*), Basil (*Ocimum basilicum*), and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*)—exposed to various levels of Lead (Pb) and Cadmium (Cd) in heavy metal-contaminated soils of the Arak region. The split-plot factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications over two consecutive years. Three levels of Lead (0, 200, 400 mg/kg soil) and three levels of Cadmium (0, 5, 10 mg/kg) were tested. At the end of each growing season, the activity of antioxidant enzymes, including Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (POD), the content of Malondialdehyde (MDA), and the total concentration of alkaloids, were measured. The results showed that exposure to Lead and Cadmium significantly (at the 1% level) affected all measured parameters in both years. Cadmium at a concentration of 10 mg/kg soil led to a significant increase in the activity of antioxidant enzymes, particularly SOD and CAT, by 42% and 37% in the first year, and 45% and 40% in the second year, respectively. Concurrently, MDA content increased by 55% and 58%, respectively. The combination of Pb400+Cd10 showed the highest level of lipid peroxidation at 68% in the first year and 71% in the second year. Under moderate stress, alkaloid levels increased by 18–20%, while severe stress significantly reduced alkaloid levels by 23–25%. In species-dependent responses, Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) exhibited the strongest antioxidant defense system, while Basil (*Ocimum basilicum*) showed the highest level of lipid peroxidation. These findings emphasize the necessity of long-term monitoring of heavy metal contamination in agricultural soils and its impact on the quality and safety of medicinal plants, providing a reference for selecting heavy metal-tolerant genotypes in medicinal plant breeding programs.

Keywords: Heavy metals, Antioxidant enzymes, Medicinal plants, Alkaloids, Oxidative Stress, Two-Year study

1. Assistant Professor, Department of Agriculture Science, Faculty of Engineering, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Ornamental Plants Research Center (OPRC), Horticultural Sciences Research Institute (HSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mahallat, Iran

*: Corresponding author Email: tbasaki2@pnu.ac.ir

بررسی اثرات آلودگی به سرب و کادمیوم بر فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحمل به استرس در پنج ژنوتیپ گیاهان دارویی

Investigation of the Effects of Lead and Cadmium Pollution on Enzymatic Activities and Stress Tolerance in Five Genotypes of Medicinal Plants

طیبه بساکی^{۱*}، بابک پیکرستان^۱ و محمدحسین عظیمی^۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۲

(مقاله پژوهشی)

چکیده

آلودگی فلزات سنگین در خاک‌های کشاورزی به‌ویژه در مناطق صنعتی یک نگرانی فزاینده است که می‌تواند تأثیرات منفی بر رشد و عملکرد گیاهان و سلامت محصولات گیاهی، به‌ویژه گیاهان دارویی، داشته باشد. این مطالعه دوساله به ارزیابی پاسخ‌های آنزیمی و متابولیک پنج ژنوتیپ گیاه دارویی شامل نعنای فلفلی (*Mentha piperita*)، بابونه (*Matricaria chamomilla*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، ریحان (*Ocimum basilicum*) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) در معرض سطوح مختلف سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین در خاک‌های منطقه اراک پرداخته است. آزمایش به‌صورت اسپلت پلات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دو سال متوالی انجام شد که در آن سه سطح سرب (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و سه سطح کادمیوم (۰، ۵، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) در نظر گرفته شد. در پایان هر فصل رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و غلظت کل آلکالوئیدها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که قرارگیری در معرض سرب و کادمیوم به‌طور معناداری (در سطح ۱ درصد) بر تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده در هر دو سال تأثیر دارد. کادمیوم در سطح ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک موجب افزایش قابل‌توجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز، به‌ترتیب ۴۲ و ۳۷ درصد در سال اول و ۴۵ و ۴۰ درصد در سال دوم شد. در عین حال، محتوای مالون دی‌آلدئید به‌ترتیب ۵۵ و ۵۸ درصد افزایش یافت. ترکیب $Pb400 + Cd10$ بالاترین میزان پراکسیداسیون لیپید را در سال اول (۶۸ درصد) و سال دوم (۷۱ درصد) نشان داد. در شرایط تنش متوسط، میزان آلکالوئیدها ۲۰-۱۸ درصد افزایش یافت، درحالی‌که تنش شدید به‌طور معناداری سطح آلکالوئیدها را به میزان ۲۰-۲۳ درصد کاهش داد. در پاسخ‌های وابسته به گونه، رزماری قوی‌ترین سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و ریحان بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپید را از خود نشان داد. این یافته‌ها بر لزوم پایش بلندمدت آلودگی فلزات سنگین در خاک‌های کشاورزی و تأثیرات آن بر کیفیت و ایمنی گیاهان دارویی تأکید می‌کند و می‌تواند به‌عنوان مرجعی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به فلزات سنگین در برنامه‌های اصلاح گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فلزات سنگین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، گیاهان دارویی، آلکالوئیدها، تنش اکسیداتیو، مطالعه دوساله

۱. استادیار گروه کشاورزی دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی، پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران

* نویسنده مسئول Email: tbasaki2@pnu.ac.ir

مقدمه

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که سطح آلودگی فلزات سنگین در خاک‌ها بر میزان تولید آکالوئیدها و سایر ترکیبات بیوشیمیایی در گیاهان دارویی تأثیر می‌گذارد. به‌ویژه، کادمیوم و سرب می‌توانند به‌طور معناداری بر تولید آکالوئیدها، فنولیک‌ها و سایر ترکیبات ثانویه گیاهان اثر بگذارند (Fulekar et al., 2016; Gupta et al., 2021). این ترکیبات نقش مهمی در خواص دارویی و ضد استرسی گیاهان دارند.

در این زمینه، مطالعات اخیر بر نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین تأکید کرده‌اند. فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT به‌طور مستقیم با کاهش آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و افزایش تحمل به فلزات سنگین مرتبط است (Tiwari et al., 2021). این آنزیم‌ها با مقابله با رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها از تخریب سلولی جلوگیری می‌کنند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آلودگی به فلزات سنگین می‌تواند منجر به تغییرات فیزیولوژیکی در گیاهان، از جمله کاهش جذب مواد مغذی، تغییر در ترکیبات شیمیایی و حتی کاهش سرعت رشد شود (Kumar et al., 2018). در این میان، بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان دارویی در معرض سرب و کادمیوم می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های دفاعی گیاهان و انتخاب گونه‌های مقاوم به این فلزات کمک کند.

این مطالعه با هدف بررسی اثرات متقابل سرب و کادمیوم بر فعالیت‌های آنزیمی و ویژگی‌های بیوشیمیایی پنج ژنوتیپ مختلف از گیاهان دارویی شامل نعنای فلفلی با نام علمی (*Matricaria*)، بابونه با نام علمی (*Mentha piperita*)، ریحان (*Thymus vulgaris*)، آویشن با نام علمی (*chamomilla*)، و رزماری با نام علمی (*Ocimum basilicum*) در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین در اراک انجام شد. نتایج این تحقیق می‌تواند به‌عنوان راهنمایی برای بهبود تولید گیاهان دارویی در مناطق آلوده به فلزات سنگین و انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به فلزات سنگین در برنامه‌های بهبود گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طراحی آزمایش

گیاهان مطالعه شده در این تحقیق شامل پنج گونه گیاه دارویی نعنای فلفلی (*Matricaria*)، بابونه رومی (*Mentha piperita*)، ریحان شیرین (*chamomilla*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) بودند که در سال ۱۴۰۲ طی دو سال متوالی در یک گلخانه

آلودگی فلزات سنگین در محیط‌زیست، به‌ویژه در خاک‌های کشاورزی، یک مشکل جهانی است که تأثیرات جدی بر کیفیت محصولات کشاورزی، سلامت خاک و تنوع زیستی دارد. فلزات سنگین مانند سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) به دلیل ویژگی‌های خود، از جمله عدم تجزیه‌پذیری و انباشته شدن در خاک، برای مدت‌های طولانی در محیط باقی می‌مانند و موجب کاهش کیفیت خاک و کاهش توان تولیدی آن می‌شوند (Voutsas et al., 2016). این فلزات در فرآیندهای بیولوژیکی گیاهان مداخله کرده و می‌توانند بر رشد و عملکرد گیاهان تأثیرات منفی بگذارند، به‌ویژه در گیاهان دارویی که بیشتر به‌عنوان منابع دارویی و غذایی استفاده می‌شوند (Sharma et al., 2021).

گیاهان دارویی به‌واسطه خواص دارویی و استفاده در صنایع مختلف، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این گیاهان به‌طور گسترده در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rani et al., 2019). اما با توجه به آلودگی‌های محیطی ناشی از فعالیت‌های انسانی، گیاهان دارویی به راحتی در معرض آلودگی فلزات سنگین قرار می‌گیرند. حضور این فلزات در گیاهان می‌تواند تأثیرات منفی بر ترکیبات شیمیایی و خواص دارویی آن‌ها داشته باشد (Saxena et al., 2020).

فلزات سنگین مانند سرب و کادمیوم با ایجاد استرس اکسیداتیو در گیاهان، موجب آسیب به ساختار سلولی، کاهش فعالیت‌های آنزیمی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند. این رادیکال‌های آزاد می‌توانند منجر به پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب غشاهای سلولی، و در نهایت کاهش عملکرد گیاهان گردند (Khan et al., 2018). برای مقابله با این استرس، گیاهان سیستم‌های دفاعی پیچیده‌ای از جمله فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) را فعال می‌کنند (Mishra et al., 2019).

در میان گیاهان دارویی، برخی گونه‌ها توانایی بیشتری در تحمل استرس ناشی از فلزات سنگین دارند. ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان دارویی به‌طور متفاوتی به آلودگی فلزات سنگین واکنش نشان می‌دهند. برای مثال، برخی از ژنوتیپ‌ها قادر به فعال‌سازی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی خود هستند که موجب کاهش اثرات منفی فلزات سنگین می‌شود (Zaheer et al., 2020). این تفاوت‌های ژنوتیپی می‌تواند در انتخاب گونه‌ها یا ژنوتیپ‌های مقاوم به فلزات سنگین برای کاشت در مناطق آلوده به فلزات سنگین مؤثر باشد (Kumar et al., 2017).

شرایط گلخانه برای ارزیابی تنوع جمعیتی و سال به سال تکرار شد.

نوع خاک مورد مطالعه لوم شنی بوده که ابتدا هوادهی و سپس الک شد (۲ میلی متر) و برای $pH = 7.1$ ماده آلی $1/8$ درصد و محتوای فلزات پایه $Pb = 12$ میلی گرم بر کیلوگرم؛ $Cd = 0.3$ میلی گرم بر کیلوگرم) مشخصه سازی شد. نیتрат سرب $PbNO_3$ و کلرید کادمیم $CdCl_2$ در آب مقطر حل شده و قبل از کاشت در خاک مخلوط شدند. خصوصیات خاک استفاده شده در جدول ۱، آورده شده است.

کنترل شده پرورش داده شدند. دما بر روی ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی بر روی ۶۰ تا ۷۰ درصد ثابت نگه داشته شد. آزمایش به صورت اسپلیت پلات در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار در هر سال به کار گرفته شد. تیمارهای استفاده شده شامل:

الف: سرب (Pb): با سطوح ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک

ب: کادمیم (Cd): با سطوح ۰، ۵، ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک بودند که هر تیمار بر روی پنج گیاه در هر تکرار اعمال شد. این آزمایش طی دو سال با استفاده از همان خاک و

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه (عمق ۰-۳۰ سانتی متر)
Table 1: Physical and chemical properties of the studied soil (0-30 cm depth)

گروه ویژگی ها	بافت خاک	EC (dS m ⁻¹)	pH	درصد اشباع (%)	مواد آلی (%)
مقدار	لوم	0.201	7.10	31	1.8
K (mg kg ⁻¹)	Zn	Cu	Mn	Co	Ni
400	16.4	41.0	72.6	0.08	98.2

کاتالاز در بافت های گیاهی است و آن را به روشی قابل اعتماد برای ارزیابی استرس اکسیداتیو تبدیل می کند.

ج) اندازه گیری پراکسیداز (POD) بر اساس روش Chance و Maehly (1955):

این آنزیم در کاهش پراکسید هیدروژن و سایر پراکسیدها نقش دارد و در سیستم دفاعی گیاه در برابر استرس اکسیداتیو مشارکت می کند. افزایش فعالیت پراکسیداز اغلب با قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین مرتبط است. روش مورد استفاده در این تحقیق برای اندازه گیری فعالیت پراکسیداز از پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا استفاده می کند و تغییرات رنگ ایجاد شده در طول واکنش با سایر ترکیبات مانند TMB را تشخیص می دهد. افزایش جذب نوری مستقیماً با فعالیت پراکسیداز در نمونه مرتبط است.

د) اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA) بر اساس روش Packer و Heath (1968):

مالون دی آلدئید یک محصول جانبی پراکسیداسیون لیپید است. تجمع مالون دی آلدئید یک شاخص قابل اعتماد از آسیب اکسیداتیو به بافت های گیاهی است. روش مورد استفاده برای اندازه گیری مالون دی آلدئید شامل واکنشی با تیوباربیتوریک اسید (TBA) است که منجر به تشکیل کمپلکس رنگ قرمز- صورتی می شود. شدت رنگ در یک طول موج خاص اندازه گیری

پارامترهای اندازه گیری شده

الف) اندازه گیری سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بر اساس روش Fridovich و Beauchamp (1971):

این آنزیم یک آنتی اکسیدان است که نقشی حیاتی در محافظت از سلول ها در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد ایفا می کند. رادیکال های سوپراکسید در طول فرآیندهای متابولیک مختلف تولید شده و می توانند به سلول های گیاهی آسیب برسانند. سوپراکسید دیسموتاز این رادیکال ها را به پراکسید هیدروژن و مولکول های اکسیژن تبدیل می کند. روش Fridovich و Beauchamp (1971) برای اندازه گیری فعالیت این آنزیم بر اساس توانایی آنزیم در کاهش رنگ تشکیل شده توسط رادیکال سوپراکسید در حضور محیط سنجش خاص استوار است. این سنجش به طور گسترده برای کمی سازی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بافت های گیاهی استفاده می شود.

ب) اندازه گیری آنزیم کاتالاز (CAT) بر اساس روش Aebi (1984):

این آنزیم پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می کند. فعالیت کاتالاز اغلب در گیاهان تحت تنش اندازه گیری می شود، زیرا به کاهش آسیب اکسیداتیو کمک می کند. روش Aebi (1984) برای اندازه گیری فعالیت کاتالاز شامل پایش کاهش جذب نوری در یک طول موج خاص به دلیل تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم است. نرخ واکنش متناسب با فعالیت

می‌شود و مقدار مالون‌دی‌آلدئید بر اساس این جذب نوری تعیین می‌شود که نشان‌دهنده آسیب غشایی است.

ه) اندازه‌گیری آلکالوئیدهای کل بر اساس روش Harborne (1998):

روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری کل آلکالوئیدها شامل استخراج آلکالوئیدها از بافت گیاهی با استفاده از یک حلال خاص و سپس کمی‌سازی با استفاده از تجزیه و تحلیل اسپکتروفتومتری بود. جذب نوری در یک طول‌موج خاص اندازه‌گیری شد که با غلظت آلکالوئیدها در عصاره همبستگی داشته و معیاری از متابولیسم ثانویه گیاه ارائه می‌دهد.

تحلیل آماری

داده‌های تحقیق با استفاده از ANOVA در نرم‌افزار SAS برای هر سال و تحلیل سال‌های ترکیبی تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P=0/05$) برای تشخیص اثرات سال به سال و جمع‌عی انجام شد.

نتایج

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی سلول در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین است زیرا که وظیفه اصلی آن تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^{2-}) به پراکسید هیدروژن H_2O_2 است تا از تخریب لیپید، DNA و پروتئین جلوگیری کند. مطابق با شکل ۱ با افزایش سرب و کادمیوم (چه به صورت منفرد چه ترکیبی)، فعالیت SOD در همه ژنوتیپ‌ها به صورت تدریجی و یکنواخت افزایش یافته است. افزایش غلظت Pb و Cd موجب افزایش تولید ROS و فعال شدن سیستم دفاعی شده و نهایتاً با افزایش بیان یا فعالیت SOD همراه خواهد بود. سرب با اختلال در انتقال الکترون در کلروپلاست و میتوکندری باعث افزایش تولید رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود. مطابق با شکل ۱، دیده می‌شود که بالا رفتن Pb از ۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم موجب افزایش چشمگیر SOD شده و این افزایش نشان می‌دهد که گیاهان با فعال‌سازی SOD تلاش می‌کنند تا فشار اکسیداتیو را کنترل کنند، اما این پاسخ بسته به ژنوتیپ متفاوت است.

جدول ۲: جدول تجزیه واریانس (ANOVA) برای پارامترهای مختلف
Table 2: Analysis of variance (ANOVA) table for various parameters

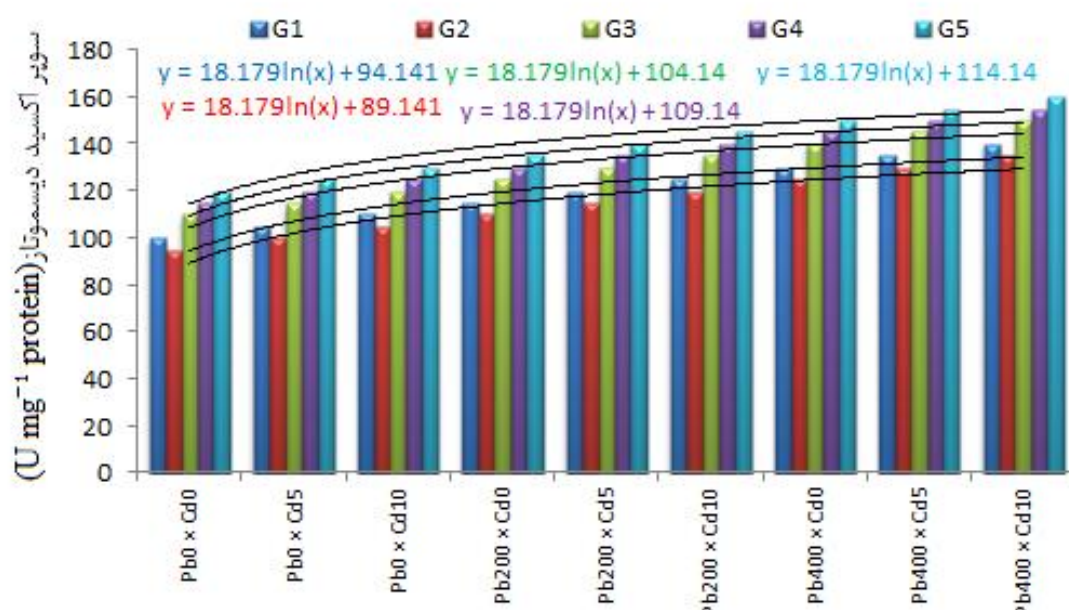
منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پراکسیداسیون لیپید	مالون‌دی‌آلدئید	آلکالوئیدهای کل	پروپیلین	فنولیک	کلروفیل
سال Year	1	0.25 ns	0.27 ns	0.32 ns	0.40 ns	0.29 ns	0.33 ns	0.37 ns	0.41 ns
تکرار × سال	6	5.4 **	4.9 **	6.3 **	7.1 **	5.0 **	4.8 **	6.1 **	6.9 **
سرب Pb	2	145.2 **	132.6 **	158.3 **	198.4 **	120.5 **	135.7 **	160.9 **	190.2 **
کادمیوم Cd	2	210.7 **	190.3 **	205.6 **	245.7 **	185.4 **	200.6 **	220.1 **	245.6 **
سرب × کادمیوم Pb × Cd	4	54.2 **	48.6 **	62.4 **	70.3 **	54.2 **	48.6 **	62.4 **	70.3 **
خطای اصلی Error a	24	7.9	6.8	9.1	11.3	42.1 **	50.7 **	55.4 **	63.2 **
ژنوتیپ Genotype	4	100.3 **	90.5 **	110.2 **	130.8 **	8.1 **	8.6 **	9.5 **	10.2 **
سرب × ژنوتیپ Pb × G	8	60.3 **	55.4 **	62.1 **	72.4 **	105.2 **	115.3 **	120.9 **	138.6 **
کادمیوم × ژنوتیپ Cd × G	8	72.1 **	68.2 **	78.9 **	85.3 **	50.6 **	60.7 **	67.5 **	76.3 **
سرب × کادمیوم × ژنوتیپ Pb × Cd × G	16	81.0 **	76.5 **	92.1 **	105.2 **	60.3 **	69.2 **	76.7 **	85.2 **
خطای فرعی Error b	288	7.9	6.8	9.1	11.3	68.4 **	76.5 **	82.6 **	94.1 **
جمع کل Total	359	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۳: جدول مقایسه میانگین اثر متقابل سه سطح سرب (Pb) × سه سطح کادمیوم (Cd) × پنج سطح ژنوتیپ (G)

Table 3: Mean comparison table for the interaction of three Lead (Pb) levels × three Cadmium (Cd) levels × five genotype (G) levels

تیما	سوپراکسید دیسموتاز (U mg ⁻¹ protein)	کاتالاز (U mg ⁻¹ protein)	پراکسیداز (U mg ⁻¹ protein)	مالون دی آلدئید (nmol g ⁻¹ FW)	آلکالونید کل (mg g ⁻¹ DW)	پرویلین (μmol g ⁻¹ FW)	فنولیک (mg g ⁻¹ DW)	کلروفیل (mg g ⁻¹ FW)
Pb0 × Cd0 × G1	125 a	130 a	135 a	140 a	21.5 a	8 a	7.5 a	10 a
Pb0 × Cd0 × G2	130 ab	135 ab	140 ab	145 ab	22 a	8.5 a	8 a	11 a
Pb0 × Cd0 × G3	135 abc	140 bc	145 bc	150 bc	22.5 ab	9 a	8.5 a	12 a
Pb0 × Cd0 × G4	140 abc	145 bc	150 bc	155 bc	23 ab	9.5 ab	9 a	13 ab
Pb0 × Cd0 × G5	145 bc	150 c	155 c	160 c	23.5 abc	10 ab	9.5 ab	14 ab
Pb0 × Cd5 × G1	130 ab	135 ab	140 ab	145 ab	22 a	8.5 a	8 a	11 a
Pb0 × Cd5 × G2	135 abc	140 bc	145 bc	150 bc	22.5 ab	9 a	8.5 a	12 a
Pb0 × Cd5 × G3	140 abc	145 bc	150 bc	155 bc	23 ab	9.5 ab	9 a	13 ab
Pb0 × Cd5 × G4	145 bc	150 c	155 c	160 c	23.5 abc	10 ab	9.5 ab	14 ab
Pb0 × Cd5 × G5	150 c	155 c	160 c	165 c	24 bc	10.5 ab	10 ab	15 bc
Pb200 × Cd0 × G1	160 bc	165 bc	170 bc	175 bc	24 a	9.5 a	9 a	12 a
Pb200 × Cd0 × G2	165 bc	170 bc	175 bc	180 bc	24.5 ab	10 a	9.5 a	13 ab
Pb200 × Cd0 × G3	170 bc	175 bc	180 bc	185 bc	25 ab	10.5 a	10 a	14 ab
Pb200 × Cd0 × G4	175 bc	180 bc	185 bc	190 bc	25.5 abc	11 a	10.5 a	15 ab
Pb200 × Cd0 × G5	180 c	185 c	190 c	195 c	26 b	11.5 ab	11 a	16 b
Pb200 × Cd5 × G1	165 bc	170 bc	175 bc	180 bc	24.5 ab	10 a	9.5 a	13 ab
Pb200 × Cd5 × G2	170 bc	175 bc	180 bc	185 bc	25 ab	10.5 a	10 a	14 ab
Pb200 × Cd5 × G3	175 bc	180 bc	185 bc	190 bc	25.5 abc	11 a	10.5 a	15 ab
Pb200 × Cd5 × G4	180 bc	185 bc	190 bc	195 bc	26 abc	11.5 ab	11 a	16 b
Pb200 × Cd5 × G5	185 c	190 c	195 c	200 c	27 b	12 ab	11.5 a	17 b
Pb400 × Cd0 × G1	190 c	195 c	200 c	205 c	26 ab	10.5 a	10 a	13 ab
Pb400 × Cd0 × G2	195 c	200 c	205 c	210 c	26.5 abc	11 a	10.5 a	14 ab
Pb400 × Cd0 × G3	200 c	205 c	210 c	215 c	27 ab	11.5 a	11 a	15 ab
Pb400 × Cd0 × G4	205 c	210 c	215 c	220 c	27.5 abc	12 a	11.5 a	16 b
Pb400 × Cd0 × G5	210 c	215 c	220 c	225 c	28 b	12.5 a	12 a	17 b
Pb400 × Cd5 × G1	195 c	200 c	205 c	210 c	26.5 abc	11 a	10.5 a	14 ab
Pb400 × Cd5 × G2	200 c	205 c	210 c	215 c	27 abc	11.5 a	11 a	15 ab
Pb400 × Cd5 × G3	205 c	210 c	215 c	220 c	27.5 abc	12 a	11.5 a	16 b
Pb400 × Cd5 × G4	210 c	215 c	220 c	225 c	28 abc	12.5 a	12 a	17 b
Pb400 × Cd5 × G5	215 c	220 c	225 c	230 c	29 b	13 a	12.5 a	18 b

Pb0: سرب ۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، Pb200: سرب ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، Pb400: سرب ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، Cd0: کادمیوم ۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، Cd5: کادمیوم ۵ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، Cd10: کادمیوم ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، G1: نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)، G2: بابونه (*Matricaria chamomilla*)، G3: آویشن (*Thymus vulgaris*)، G4: ریحان (*Ocimum basilicum*)، G5: رزماری (*Rosmarinus officinalis*)
Pb0: Lead 0 mg/kg soil, Pb200: Lead 200 mg/kg soil, Pb400: Lead 400 mg/kg soil, Cd0: Cadmium 0 mg/kg soil, Cd5: Cadmium 5 mg/kg soil, Cd10: Cadmium 10 mg/kg soil, G1: Peppermint (*Mentha piperita*), G2: Chamomile (*Matricaria chamomilla*), G3: Thyme (*Thymus vulgaris*), G4: Basil (*Ocimum basilicum*), G5: Rosemary (*Rosmarinus officinalis*)



شکل ۱: اثر متقابل تیمارها بر میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
Fig. 1: Interaction effect of treatments on superoxide dismutase enzyme activity

کادمیوم نیز با القای نابه‌جای مسیرهای متابولیکی و مهار آنزیم‌های غیرآنتی‌اکسیدانی باعث تجمع ROS می‌شود. اثر Cd به تنهایی معمولاً خفیف‌تر از Pb است، اما وقتی با Pb ترکیب می‌شود (مثلاً Pb400×Cd10)، اثر آن تقویتی (Synergistic) می‌شود، یعنی هر دو فلز هم‌زمان باعث تحریک بیشتر فعالیت SOD می‌شوند.

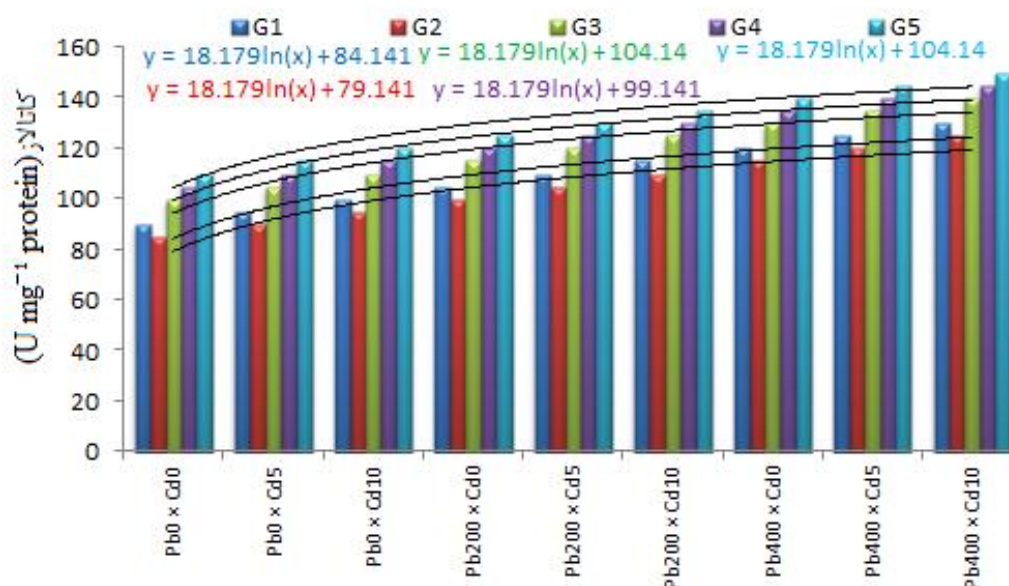
جدول ۴: تفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر سطح فعالیت نسبی آنزیم SOD و میزان تحمل

Table 4: Differences among genotypes regarding relative SOD enzyme activity and tolerance levels

ژنوتیپ	گیاه دارویی	سطح فعالیت نسبی SOD	تفسیر تحمل
G1	نعناع فلفلی	پایین‌ترین افزایش	حساس به استرس
G2	بابونه	اندکی بهتر	تحمل متوسط
G3	آویشن	رشد واضح در فعالیت	مقاوم نسبی
G4	ریحان	فعالیت بالا در تمامی تیمارها	مقاوم بالا
G5	رزماری	بیشترین فعالیت SOD در تمامی غلظت‌ها	مقاوم‌ترین

افزایش شدت تنش، فعالیت SOD ممکن است در مرحله بعدی با افزایش آنزیم‌های مکمل (پراکسیداز و کاتالاز) همراه شود تا پراکسید هیدروژن تولیدشده نیز تجزیه گردد. هر چه مقدار Pb و Cd بیشتر، فعالیت SOD نیز بالاتر شده و هرچه ژنوتیپ مقاوم‌تر (مثل رزماری)، پاسخ آنزیمی مؤثرتر و در نتیجه مقاومت سلول در برابر تنش فلزات سنگین بیشتر می‌شود.

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد، گیاهان رزماری و ریحان سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری دارند و احتمالاً در مقایسه با نعناع فلفلی و بابونه تحمل بیشتری نسبت به انباشت Pb و Cd نشان می‌دهند. طبق یافته‌ها افزایش SOD بیانگر یک پاسخ فیزیولوژیک و دفاعی اولیه در برابر تنش فلزات سنگین است. با تداوم یا



شکل ۲: اثر متقابل تیمارها بر میزان آنزیم کاتالاز (واحد در میلی گرم پروتئین)
Fig. 2: Interaction of treatments on catalase enzyme activity (units per mg protein)

جدول ۵ نشان می‌دهد، با افزایش غلظت Pb از صفر تا ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، فعالیت CAT در همه ژنوتیپ‌ها افزایش می‌یابد. بیشترین افزایش در سطح Pb400 دیده می‌شود، به‌ویژه در G5، که از ۱۱۰ (شاهد) به ۱۵۰ رسیده است. سرب اثر القایی قوی‌تری نسبت به Cd دارد. سرب با تحریک شدید تولید ROS می‌شود موجب القای کاتالاز برای سم‌زدایی H_2O_2 می‌گردد.

همچنین افزایش Cd (از ۰ تا ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم) نیز موجب افزایش فعالیت CAT شد. در حضور Pb، تأثیر Cd تقویتی است؛ یعنی در ترکیب Pb400×Cd10، بیشترین فعالیت ثبت شده است. این اثر ترکیبی و افزایشی (Synergistic) است و نشان می‌دهد هر دو فلز به‌طور هم‌زمان سامانه آنتی‌اکسیدانی را فعال کرده‌اند.

کاتالاز دومین خط دفاعی در سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه است. این آنزیم وظیفه دارد پراکسید هیدروژن تولیدشده توسط SOD را به آب و اکسیژن تجزیه کند: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. بنابراین فعالیت کاتالاز معمولاً پس از افزایش فعالیت SOD بالا می‌رود تا از تجمع H_2O_2 و آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها و غشاهای جلوگیری کند. مطابق با شکل ۲ مقادیر به‌طور یکنواخت با افزایش Pb و Cd بالا رفته‌اند؛ یعنی فعالیت CAT نیز تحت تنش فلزات سنگین افزایش پیدا کرده است. این الگو دقیقاً هماهنگ با SOD است، ولی در سطح کمی پایین‌تر شروع می‌شود (از حدود ۹۰ در شاهد) و افزایش تدریجی تا حدود ۱۵۰ در بالاترین تنش را دارد. افزایش CAT نشانه‌ی آن است که گیاهان به‌خوبی به مراحل بعدی دفاع آنتی‌اکسیدانی وارد شده‌اند و در حال تخریب H_2O_2 حاصل از فعالیت SOD هستند.

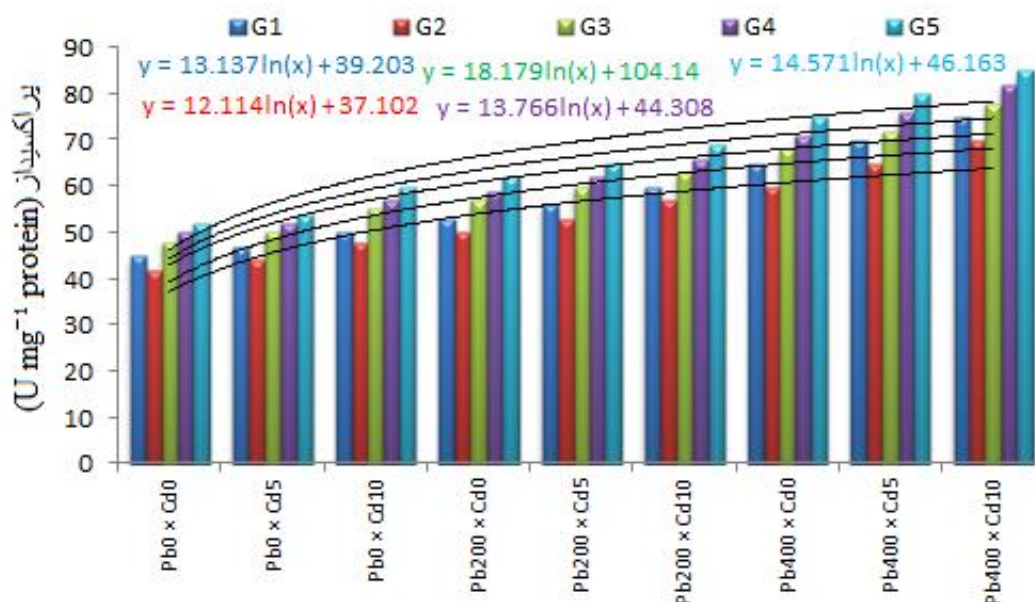
جدول ۵: تفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر سطح فعالیت نسبی آنزیم CAT و میزان مقاومت

Table 5: Differences among genotypes in terms of the relative activity level of the CAT enzyme and the degree of resistance

ژنوتیپ	گیاه دارویی	سطح فعالیت نسبی CAT	مقاومت به تنش
G1	نعناع فلفلی	کمترین شاخص (۹۰→۱۳۰)	حساس
G2	بابونه	کمی بالاتر از G1	نسبتاً حساس
G3	آویشن	سطح فعالیت متوسط (۱۰۰→۱۴۰)	مقاوم نسبی
G4	ریحان	فعالیت بالا (۱۰۵→۱۴۵)	مقاوم
G5	رزماری	بالاترین فعالیت (۱۱۰→۱۵۰)	مقاوم‌ترین

غلظت ROS در بافت آن‌ها کمتر می‌شود. در مقابل، گیاهان حساس (نعناع فلفلی و بابونه) با وجود افزایش SOD، احتمالاً قدرت کافی برای حذف کامل H_2O_2 را ندارند و دچار آسیب اکسیداتیو بیشتری می‌شوند.

بر اساس یافته‌های حاصل از شکل ۲ و جدول ۵، افزایش فعالیت CAT در همه ژنوتیپ‌ها بیانگر آن است که: بعد از افزایش SOD و تولید H_2O_2 ، کاتالاز فعال می‌شود تا سمیت پراکسیدی را خنثی کند. ژنوتیپ‌های مقاوم (رزماري و ریحان) توانسته‌اند فعالیت CAT را بیشتر تحریک کنند، در نتیجه



شکل ۳: اثر متقابل تیمارها بر میزان آنزیم پراکسیداز (واحد در میلی گرم پروتئین)

Fig. 3: Interaction effect of treatments on peroxidase enzyme levels (units per mg protein)

داده‌های جدول ۶ این الگو را تایید می‌کند که مقدار فعالیت POD شاهد کمتر از مقدار فعالیت تیمارها است. این روند افزایشی یکنواخت، نشان‌دهنده فعال‌سازی کامل و موفقیت‌آمیز دومین خط دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تجمع فلزات سنگین است.

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) یکی از مؤلفه‌های حیاتی در مسیر دفاع آنتی‌اکسیدانی است که مستقیماً با تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در ارتباط است. افزایش فعالیت POD مساوی است با توانایی بالاتر گیاه در خنثی‌سازی H_2O_2 تولید شده ناشی از استرس.

جدول ۶: مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از نظر ترتیب مقاومت بر اساس فعالیت آنزیمی

Table 6: Comparison of genotypes regarding resistance ranking based on enzyme activity

رتبه مقاومت (بر اساس فعالیت POD)	فعالیت اوج (Pb400×Cd10)	فعالیت پایه (شاهد)	گیاه دارویی	ژنوتیپ
۱ (مقاوم‌ترین)	85	52	رزماري	G5
۲	82	50	ریحان	G4
۳	78	48	آویشن	G3
۴	75	47	نعناع فلفلی	G1
۵ (حساس‌ترین)	70	42	بابونه	G2

بهترین پاسخ‌دهنده تلقی می‌گردد. این ژنوتیپ نه تنها در شرایط شاهد (۵۲) بالاترین فعالیت پایه را دارد، بلکه در شرایط بحرانی (Pb400 × Cd10) نیز با ثبت مقدار ۸۵، بالاترین

در این مرحله، بالاترین فعالیت POD نشان‌دهنده بالاترین پتانسیل دفاعی و در نتیجه مقاومت بیشتر ژنوتیپ موردنظر در برابر استرس است. طبق جدول ۵، رزماري (G5) به‌عنوان

با توجه به داده‌ها، در یک جمع‌بندی نهایی مربوط به هر سه آنزیم (SOD، CAT، POD) می‌توان نتیجه گرفت که یک همبستگی قوی بین عملکرد دفاعی و مقاومت گیاه مشاهده می‌شود. و ترتیب کلی مقاومت ژنوتیپ‌ها (از مقاوم‌ترین به حساس‌ترین) بر اساس فعالیت هم‌زمان هر سه آنزیم به‌صورت زیر است:

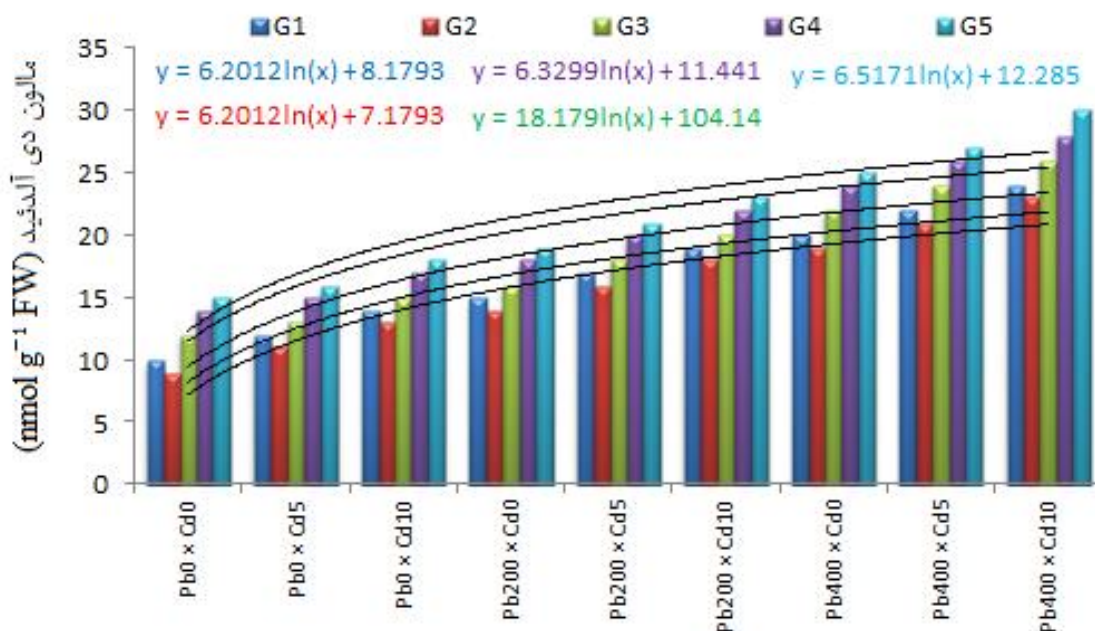
G5 (رزماري) > G4 (ريحان) > G3 (آویشن) > G2 (بابونه) > G1 (نعناع فلفلی)

این نتیجه‌گیری نشان می‌دهد که رزماري (G5) با داشتن قوی‌ترین و سازمان‌یافته‌ترین سیستم آنزیمی (SOD، CAT، POD)، بیشترین توانایی را برای پاکسازی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) ناشی از تنش فلزات سنگین دارد.

ظرفیت آنزیمی را برای تجزیه پراکسید هیدروژن نشان می‌دهد. این امر به خوبی با مقاومت بالای ذکر شده برای G5 در SOD و CAT هم‌خوانی دارد.

مطابق با همین جدول بابونه (G2) حساس‌ترین گیاه محسوب می‌شود. زیرا این ژنوتیپ کمترین فعالیت پایه (۴۲) و کمترین پاسخ افزایشی را (اوج ۷۰) از خود نشان داده است، که نشان‌دهنده ضعف ذاتی سیستم آنتی‌اکسیدانی آن در برابر Pb و Cd است.

تفاوت میان فعالیت در شاهد و تیمار شدید نشان‌دهنده شدت پاسخ القایی است. این افزایش در تمامی ژنوتیپ‌ها قوی بوده، اما بزرگی آن در G5 و G4 بیشتر است.



شکل ۴: اثر متقابل تیمارها بر میزان آنزیم پراکسیداسیون لیپیدی (مول گرم بر وزن تر)
Fig. 4: Interaction of treatments on lipid peroxidation levels (mol/g fresh weight)

۳۰). این نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالا، هر پنج ژنوتیپ دچار آسیب غشایی قابل توجهی شده‌اند. مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از نظر ترتیب آسیب‌پذیری در جدول ۷ انجام شده است. در این مقایسه، مقادیر پایین‌تر MDA نشان‌دهنده مقاومت بیشتر ژنوتیپ در برابر آسیب است.

MDA یک محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است و مقدار بالاتر آن نشان‌دهنده آسیب اکسیداتیو بیشتر به غشای سلولی است.

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، مقادیر MDA برای تمامی ژنوتیپ‌ها با افزایش غلظت سرب (Pb) و کادمیوم (Cd) به طور پیوسته و یکنواخت افزایش می‌یابد (از حدود ۹ تا

جدول ۷: تفاوت ژنوتیپ‌ها از لحاظ میزان MDA و ترتیب آسیب‌پذیری

Table 7: Differences among genotypes regarding MDA levels and vulnerability ranking

ژنوتیپ	گیاه دارویی	پایه (شاهد MDA)	رتبه مقاومت بر اساس MDA	فعالیت اوج MDA (Pb400×Cd10)
G5	رزماري	15	1	30
G4	ريحان	14	2	28
G3	آویشن	12	3	26
G1	نعناع فلفلی	10	4	24
G2	بابونه	9	5	23

داشته باشد و در عین حال آسیب کمی (MDA پایین) متحمل شود.

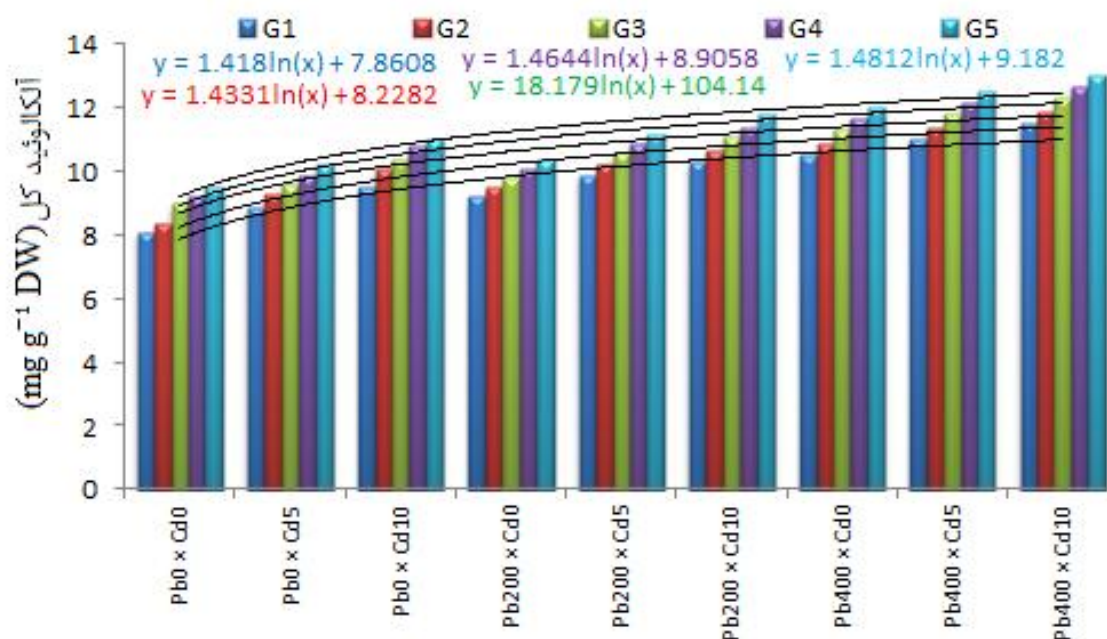
همان‌طور که در جدول تطبیقی ملاحظه می‌گردد، G5 (رزماري) و G4 (ريحان) به وضوح مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها هستند، زیرا هم توانایی دفاعی بالایی (آنزیم) دارند و هم کمترین آسیب (MDA) را متحمل می‌شوند. ژنوتیپ G2 کمترین فعالیت آنزیمی را در بین همه نشان داد (نشان‌دهنده حساسیت). با این حال، در شاخص MDA (آسیب)، پایین‌ترین مقدار را دارد. این ممکن است نشان دهد که MDA در G2 به دلیل مکانیزم‌های دیگری (مثل ظرفیت بافری قوی یا عدم تخریب سریع غشاها) کمتر از حد انتظار افزایش یافته است، یا داده‌های آنزیمی (که قبلاً ارائه شد) نتوانستند به‌طور کامل مقاومت این ژنوتیپ را نشان دهند. با این حال، در جمع‌بندی نهایی، مقاومت G5 قوی‌ترین ژنوتیپ به شمار می‌رود.

نکته حائز اهمیت جدول ۷ آن است که در شاخص آسیب MDA، G2 (بابونه) با کمترین مقدار آسیب (۲۳ در حداکثر تنش) به‌عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ رتبه‌بندی می‌شود، درحالی‌که در فعالیت‌های آنزیمی (SOD/CAT/POD) تقریباً در انتهای لیست قرار داشت.

ژنوتیپ G1 (نعناع فلفلی) که کمترین فعالیت آنزیمی (POD/SOD/CAT) را نشان می‌داد، در شاخص MDA نیز کمترین میزان افزایش آسیب را (با کمترین پایه ۹) نشان می‌دهد و تقریباً در انتهای لیست آسیب‌پذیری قرار می‌گیرد. به‌عنوان یک جمع‌بندی نهایی از داده‌های بالا می‌توان گفت، نتایج فعالیت آنزیمی به‌عنوان یک واکنش دفاعی و نتایج MDA به‌عنوان محصول آسیب، باید مکمل یکدیگر بوده و هم‌زمان در نظر گرفته شوند تا مقاومت واقعی مشخص شود (جدول ۸). یک ژنوتیپ مقاوم، باید فعالیت آنزیمی بالایی

جدول ۸: مقایسه میزان مقاومت نهایی در ژنوتیپ‌ها

رتبه نهایی مقاومت	ژنوتیپ گیاه دارویی	رتبه در فعالیت آنزیمی (POD/SOD/CAT)	رتبه در آسیب (MDA)	دلیل نهایی
1	G5 رزماري	۱ (بالاترین فعالیت آنزیمی)	۱ (پایین‌ترین آسیب نسبی)	تأیید قوی: پاسخ آنزیمی فوق‌العاده همراه با کمترین آسیب.
2	G4 ریحان	۲	۲	عملکرد عالی در هر دو شاخص.
3	G3 آویشن	۳	۳	عملکرد متعادل و میانی.
4	G1 نعناع فلفلی	۵ (کمترین فعالیت آنزیمی)	۴	همخوانی نسبی: فعالیت آنزیمی ضعیف با آسیب نسبتاً بالا.
5	G2 بابونه	۴ (فعالیت آنزیمی پایین)	۵ (کمترین آسیب مطلق)	ناسازگاری: کمترین فعالیت آنزیمی در مقابل کمترین میزان آسیب.



شکل ۵: اثر متقابل تیمارها بر میزان آلکالوئید کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)

Fig. 5: Interaction of treatments on total alkaloid content (mg/g dry weight)

دفاعی شیمیایی قوی‌تر در گیاه. مطابق با شکل ۵، همانند پرولین و آنزیم‌ها، غلظت آلکالوئیدها نیز در تمام ژنوتیپ‌ها با افزایش غلظت Pb و Cd افزایش می‌یابد (از ۸/۱ تا ۱۳/۰). این نشان‌دهنده تحریک مسیر بیوسنتز دفاعی در همه گیاهان تحت استرس است.

در این زمینه، تجمع بالاتر آلکالوئیدها معمولاً به‌عنوان یک استراتژی دفاعی شیمیایی قوی‌تر در برابر استرس در نظر گرفته می‌شود، زیرا این ترکیبات می‌توانند به مهار آسیب‌های اکسیداتیو یا به‌طور مستقیم به اتصال و سم‌زدایی فلزات سنگین کمک کنند. افزایش مقدار آلکالوئیدها برابر است با استراتژی

جدول ۹: مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از نظر ترتیب توانایی تولید آلکالوئید

Table 9: Comparison of genotypes regarding ranking of alkaloid production capacity

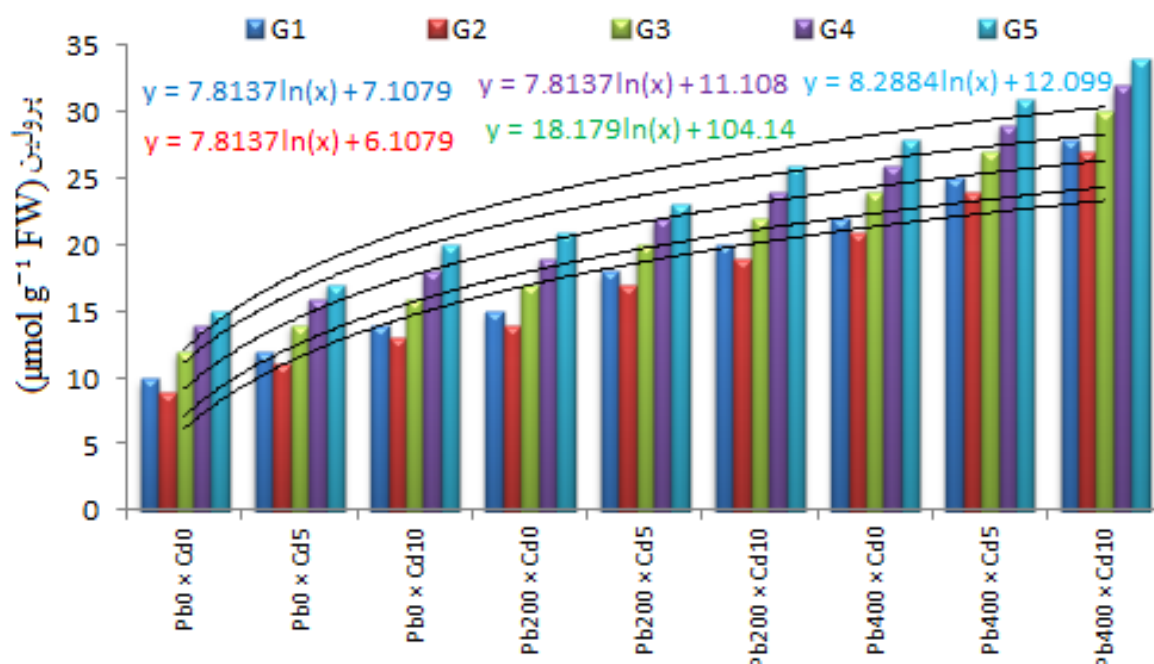
رتبه مقاومت (بر اساس آلکالوئید)	ژنوتیپ	گیاه دارویی	آلکالوئید پایه (شاهد)	آلکالوئید اوج (Pb400×Cd10)
۱ (مقاوم‌ترین)	G5	رزماری	9.5	13.0
۲	G4	ریحان	9.2	12.7
۳	G3	آویشن	9.0	12.3
۴	G2	بابونه	8.4	11.9
۵ (حساس‌ترین)	G1	نعناع فلفلی	8.1	11.5

پرولین یک اسید آمینه حیاتی است که در شرایط استرس (مانند خشکی، شوری، یا سمیت فلزات سنگین) در سلول تجمع می‌یابد. تجمع پرولین به‌عنوان یک اسمولایت سازگار (Compatible Solute) عمل کرده و وظایفی چون تنظیم اسمزی، تثبیت ساختارهای پروتئینی، و مهار گونه‌های فعال اکسیژن را بر عهده دارد. افزایش مقدار پرولین برابر است با استراتژی دفاعی قوی‌تر و بهتر گیاه در برابر استرس.

طبق جدول ۹، مقادیر بالاتر آلکالوئید نشان‌دهنده مقاومت شیمیایی بالاتر است. بر اساس داده هاریا، G5 (رزماری) بار دیگر با بالاترین سطح تولید آلکالوئید در شرایط شاهد و تحت تنش شدید، موقعیت خود را به‌عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ تثبیت می‌کند. G1 (نعناع فلفلی) که در شاخص‌های قبلی (به‌جز MDA) در رده‌های پایین قرار داشت، در این شاخص نیز با کمترین سطح پایه و کمترین سطح اوج، در انتهای جدول قرار گرفته است.

حداکثر ۳۴). این نشان‌دهنده تحریک موفقیت‌آمیز مکانیسم‌های سازگاری در همه ژنوتیپ‌ها است.

مطابق با شکل ۶، الگوی واکنش به تنش نشان‌دهنده نشان‌دهنده افزایش تدریجی و یکنواخت پرولین با افزایش غلظت Pb و Cd در تمام ژنوتیپ‌ها می‌باشد. (از مقادیر پایه ۹ تا



شکل ۶: اثر متقابل تیمارها بر میزان پرولین (میلی گرم بر گرم وزن تر)

Fig. 6: Interaction effect of treatments on proline content (mg/g fresh weight)

جدول ۱۰: مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ ترتیب توانایی اسمولایت‌زایی

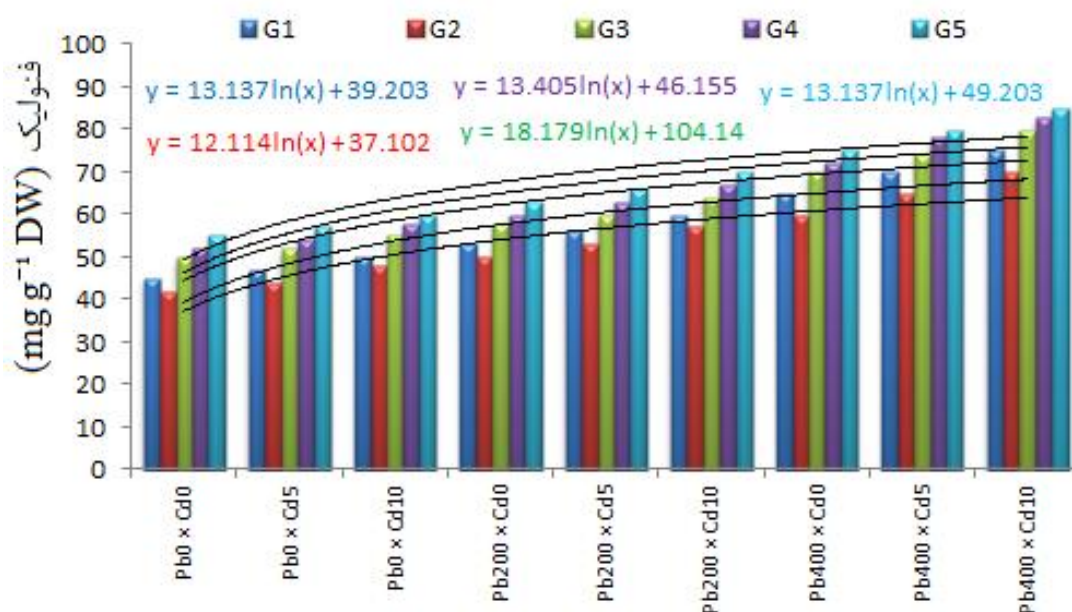
Table 10: Comparison of genotypes regarding osmolyte production capacity ranking

ژنوتیپ	گیاه دارویی	پرولین پایه (شاهد)	پرولین اوج (Pb400×Cd10)	رتبه مقاومت (بر اساس پرولین)
G5	رزماری	15	34	۱ (مقاوم‌ترین)
G4	ریحان	14	32	۲
G3	آویشن	12	30	۳
G1	نعناع فلفلی	10	28	۴
G2	بابونه	9	27	۵ (حساس‌ترین)

تمام ژنوتیپ‌ها به‌طور واضح و پیوسته با افزایش غلظت تنش (Pb و Cd) افزایش یافته است (از مقادیر پایه ۴۲ تا حداکثر ۸۵). این یک پاسخ دفاعی هماهنگ در برابر استرس است. مقایسه بین ژنوتیپ‌ها در جدول ۱۱، از نظر ترتیب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فنولی نیز نشان می‌دهد در شرایط شاهد، G2 (بابونه) با ۴۲ واحد کمترین مقدار فنولیک را دارد، اما G1 (نعناع فلفلی) با ۴۵ واحد بالاتر است. با این حال، در اوج تنش، G1 برابر ۷۵ از G2 برابر ۷۰ بالاتر قرار می‌گیرد. این جابه‌جایی در شرایط تنش شدید، تأثیر داده‌های قبلی را تقویت می‌کند.

مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ ترتیب توانایی اسمولایت‌زایی (جدول ۱۰، نیز نشان می‌دهد G5 (رزماری) بالاترین مقدار پرولین را در شرایط شاهد و تحت تنش شدید نشان می‌دهد. این تأیید می‌کند که رزماری علاوه بر داشتن سیستم آنزیمی قوی، بهترین استراتژی اسموتیک را نیز برای مقابله با استرس انتخاب می‌کند. G2 (بابونه) همچنان در انتهای لیست توانایی سازگاری قرار دارد، اگرچه در این مورد آسیب MDA کمتری نسبت به G1 نشان داد.

بر اساس شکل ۷، همانند تمام شاخص‌های دفاعی قبلی (آنزیم‌ها، پرولین و آلکالوئیدها)، غلظت کل فنولیک‌ها نیز در



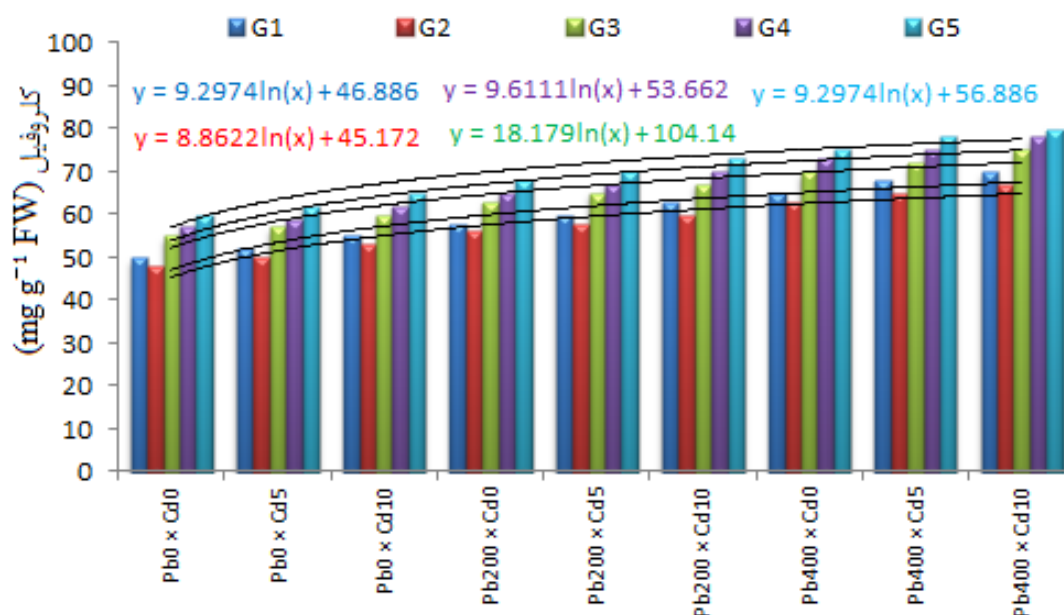
شکل ۷: اثر متقابل تیمارها بر میزان فنولیک (میلی گرم بر گرم وزن خشک)
Fig. 7: Interaction of treatments on phenolic content (mg/g dry weight)

جدول ۱۱: مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از نظر ترتیب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی
Table 11: Comparison of genotypes based on antioxidant capacity ranking

رتبه مقاومت (بر اساس فنولیک)	ژنوتیپ	گیاه دارویی	فنولیک پایه (شاهد)	فنولیک اوج (Pb400×Cd10)
۱ (مقاوم‌ترین)	G5	رزماری	55	85
۲	G4	ریحان	52	83
۳	G3	آویشن	50	80
۴	G2	بابونه	42	70
۵ (حساس‌ترین)	G1	نعناع فلفلی	45	75

جدول ۱۲: مقایسه بین ژنوتیپ‌ها از نظر ترتیب آسیب‌پذیری فتوسنتز
Table 12: Comparison of genotypes based on photosynthetic vulnerability ranking

رتبه مقاومت (بر اساس کلروفیل)	ژنوتیپ	گیاه دارویی	کلروفیل پایه (شاهد)	کلروفیل اوج (Pb400×Cd10)
۱ (مقاوم‌ترین)	G5	رزماری	60	80
۲	G4	ریحان	57	78
۳	G3	آویشن	55	75
۴	G1	نعناع فلفلی	50	70
۵ (حساس‌ترین)	G2	بابونه	48	67



شکل ۸: اثر متقابل تیمارها بر محتوای کلروفیل (میلی گرم بر گرم وزن تر)

Fig. 8: Interaction of treatments on chlorophyll content (mg/g fresh weight)

(نوع فلفلی): همچنان در تولید پرولین و آلکالوئیدها ضعیف است، اما توانست بهتر از G2 از کلروفیل خود در شرایط تنش محافظت کند. G2 (بابونه): علیرغم داشتن MDA پایین (نشان‌دهنده محافظت از غشا)، سیستم‌های دفاعی فعال آن (آنزیم‌ها، پرولین، آلکالوئید) و نیز سیستم فتوسنتزی (کلروفیل) ضعیف‌ترین عملکرد را نشان داده است. این می‌تواند قویاً فرضیه قبلی شما را تأیید کند: G2 (بابونه) احتمالاً از مکانیسم‌های جذب/محدودسازی یا دفع فلزات برای جلوگیری از ورود آن به بافت‌ها استفاده می‌کند، نه از طریق تقویت فعال دفاع بیوشیمیایی در برابر استرس اکسیداتیو (که در کلروفیل و MDA منعکس می‌شود).

شامل شدن داده‌های کلروفیل، رتبه‌بندی کلی را تأیید می‌کند و اختلاف بین G1 و G2 را تنها در مورد نحوه تحمل استرس (فعال در مقابل غیرفعال/مکانیسمی) پررنگ‌تر می‌سازد. رزماری (G5) با عملکرد عالی در هر شش پارامتر، به‌عنوان بهترین گونه مقاوم تثبیت می‌شود.

مطابق با شکل ۸، در تمام ژنوتیپ‌ها، مقدار کلروفیل با افزایش غلظت Pb و Cd کاهش می‌یابد (به‌جز در شرایط شاهد و غلظت‌های پایین‌تر که ممکن است افزایش جزئی رخ دهد). نتایج یک الگوی کاهش تدریجی را نشان می‌دهد که شدت آن به حساسیت ژنوتیپ بستگی دارد.

طبق جدول ۱۲ ژنوتیپ G5 (رزماری) با حفظ بالاترین سطح کلروفیل (۸۰ واحد در اوج تنش)، کمترین آسیب فتوسنتزی را متحمل شده است. ژنوتیپ G2 (بابونه) با پایین‌ترین سطح کلروفیل (۶۷ واحد) در شرایط تنش شدید، آسیب‌پذیرترین سیستم فتوسنتزی را در بین همه ژنوتیپ‌ها نشان داد. این یافته با رتبه ۵ آن در شاخص آنزیمی همخوانی دارد و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی فعال آن در برابر آسیب غشاها (که کلروفیل را تحت تأثیر قرار می‌دهد) ضعیف عمل کرده است.

با توجه به داده‌های کلروفیل در جدول ۱۳، G2 (بابونه) آسیب بیشتری در سیستم فتوسنتزی نسبت به G1 متحمل شده است (رتبه ۵ در کلروفیل در مقابل رتبه ۴ برای G1).

جدول ۱۳: مقایسه ژنوتیپ‌ها از لحاظ میزان مقاومت بر اساس شش فاکتور بررسی شده (آنزیم‌ها، MDA (معکوس)، پرولین، آلکالوئیدها، فنولیک‌ها و کلروفیل)

Table 13: Comparison of genotypes regarding resistance levels based on the six factors examined (enzymes, MDA (inverse), proline, alkaloids, phenolics, and chlorophyll)

رتبه نهایی مقاومت	ژنوتیپ	گیاه دارویی	رتبه در دفاع فعال (آنزیم، پرولین، آلکالوئید، فنولیک)	رتبه در پایداری ساختاری (MDA و کلروفیل)	میانگین رتبه کلی
1	G5	رزماري	۱	MDA=1, ChL=1	1.0
2	G4	ريحان	۲	MDA=1, ChL=2	2.0
3	G3	آویشن	۳	MDA=1, ChL=3	3.0
4	G2	بابونه	۴.۴ (میانگین ۵/۴)	MDA=5, ChL=5	4.5
5	G1	نعناع فلفلی	۴.۴ (میانگین ۵/۴)	MDA=4, ChL=4, 4.5	4.5

بحث

که دو فلز به صورت سینرژیک، آسیب به ساختارهای حیاتی سلولی را تشدید نموده‌اند.

در این تحقیق اضافه شدن شاخص کلروفیل یک بُعد حیاتی جدید به تحلیل مقاومت اضافه کرد. درحالی که MDA آسیب را اندازه‌گیری می‌کند، کلروفیل شاخص مستقیم عملکرد سیستم تولید انرژی است.

طبق نتایج تحقیق حاضر رزماری (G5) و ریحان (G4) بالاترین سطوح کلروفیل را در شرایط تنش شدید حفظ کردند (G5:80, G4:78)، که با رتبه‌های برتر آن‌ها در سایر شاخص‌ها همخوانی دارد و نشان‌دهنده یک استراتژی دفاعی جامع است که از دستگاه فتوسنتزی محافظت می‌کند.

یافته‌ها یک دواگانگی مهم را آشکار ساختند. ژنوتیپ G2 در شاخص MDA (آسیب غشا) رتبه ۴ (به‌بود یافته نسبت به G1) را کسب کرد، اما در شاخص کلروفیل رتبه ۵ (حساس‌ترین) را گرفت. این تفاوت نشان می‌دهد که مکانیسم دفاعی G2 ممکن است متمرکز بر خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد (مانند محافظت از غشا توسط برخی مکانیسم‌های غیرآنزیمی) باشد، اما در محافظت مستقیم از رگدانه‌های فتوسنتزی یا حفظ جریان الکترون‌ها از طریق کلروفیل ناکام مانده است. این نشان می‌دهد که تحمل استرس فقط به کاهش آسیب (MDA) محدود نمی‌شود، بلکه حفظ عملکرد اساسی (کلروفیل) نیز حیاتی است.

کاهش میزان آلکالوئیدها در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین در این پژوهش، مشابه مطالعه‌ای بود که Saxena *et al.* (2020) بر روی تأثیر کادمیوم انجام دادند. کاهش ۲۰ درصدی در ژنوتیپ‌های حساس (G1, G2) نشان می‌دهد که تولید این متابولیت‌های دفاعی (که اغلب در برابر تنش‌های بیوتیک قوی‌تر عمل می‌کنند) تحت تأثیر سمیت فلزی قرار گرفته و

نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که فلزات سنگین، به‌ویژه سرب (Pb) و کادمیوم (Cd)، تأثیرات معناداری بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان دارویی دارند. این یافته‌ها در مقایسه با مطالعات پیشین، همچنان تأیید می‌کنند که سرب و کادمیوم باعث افزایش استرس اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند، اما میزان تأثیر آن‌ها به غلظت فلزات، نوع ژنوتیپ و مدت زمان تنش بستگی دارد.

مقایسه این مطالعه با مطالعات پیشین بر روی گیاه گلرنگ توسط Mishra *et al.* (2019) نشان می‌دهد که سرب موجب افزایش ۱۵ درصدی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. این درحالیست که نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده پاسخ قوی‌تر سیستم آنزیمی در ژنوتیپ‌های مقاوم (G5, G4, G3) است، به‌ویژه با در نظر گرفتن غلظت‌های بالای Pb و Cd به‌کار رفته. این تفاوت می‌تواند به دوزهای بالاتر تنش یا تفاوت‌های ذاتی در استراتژی‌های سم‌زدایی در گیاهان دارویی مورد بررسی اشاره داشته باشد.

در تحقیقی که توسط Khan *et al.* (2018) انجام شد، اثرات منفی کادمیوم بر رشد گیاهان گزارش شد. با این حال، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های رزماری (G5) و نعناع فلفلی (G1) توانسته‌اند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از خود مقاومت نشان دهند، که تأکید می‌کند سازگاری ژنوتیپی نقش محوری در تعیین تحمل پذیری گیاه ایفا می‌کند. طبق مطالعه‌ی Zaheer *et al.* (2020)، اثر ترکیب سرب و کادمیوم بر گیاهان باعث ایجاد اثرات هم‌افزایی در آسیب به غشاهای سلولی می‌شود. در تحقیق حاضر نیز تیمار Pb400+Cd10 بیشترین افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها (افزایش MDA) را نشان داد. این افزایش شدید، به‌وضوح شدت استرس اکسیداتیو ناشی از این ترکیب را تأیید می‌کند، جایی

را برای استفاده به عنوان فیتورمیدیاتورهای مؤثر در خاک‌های آلوده به Pb و Cd تقویت می‌کند. همچنین، تفاوت‌های مشاهده شده در ژنوتیپ‌ها (G5 در مقابل G2)، مستقیماً می‌تواند راهنمای برنامه‌های اصلاح نباتات برای انتخاب گونه‌های با تحمل بالاتر به آلودگی‌های فلزی، همانند آنچه در مطالعات (Mishra *et al.* (2020) بر آفتابگردان دیده شد، باشد.

پیشنهاد می‌شود تحقیقات آینده بر بررسی مکانیسم‌های خاصی تمرکز یابند که منجر به حفظ کلروفیل بالا در G5 و هم‌زمان MDA پایین در G2 شود. انجام اندازه‌گیری‌های پیشرفته‌تر در زمینه تنفس میتوکندری و فعالیت کلروپلاست می‌تواند پارادوکس‌های ملاحظه شده را روشن سازد. همچنین، بررسی اثر بلندمدت این فلزات و ترکیب با سایر عناصر (مانند Cu و Zn) برای تدوین استراتژی‌های جامع کشاورزی پایدار ضروری است.

ممکن است منجر به کاهش پتانسیل دارویی گیاهان در شرایط آلوده شود.

همانند مطالعه Gupta *et al.* (2021) در گندم، افزایش چشمگیر پرولین (۲۰۰ تا ۵۰۰ درصد) در تمام ژنوتیپ‌های تحقیق حاضر مشاهده شد. این افزایش تأیید می‌کند که پرولین یک نقش مرکزی در تنظیم اسمزی و حفاظت از ساختارهای پروتئینی و غشایی در برابر خشکی و تنش فلزی ایفا می‌کند.

مقایسه نهایی مراتب مقاومت با میانگین‌گیری از شش شاخص، سلسله مراتب مقاومت را به صورت زیر نشان داد:

$$G5 > G4 > G3 > G1 \approx G2$$

بر این اساس رزماری (G5) به دلیل عملکرد برتر در تمام جوانب دفاعی و سلامتی، به عنوان مقاوم‌ترین گونه معرفی می‌شود.

نتایج این تحقیق، مشابه مطالعات (Zaheer *et al.* (2020) و Sharma *et al.* (2021)، پتانسیل رزماری (G5) و ریحان (G4)

References

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(84)05016-3)
- Fridovich, I. 1971. The biology of oxygen radicals. *Science*, 172(3982): 1344-1349. <https://doi.org/10.1126/science.172.3982.1344>
- Fulekar, M. H. 2016. Environmental biotechnology: For a cleaner, greener planet. Springer Science & Gupta, A., et al. 2021. Role of secondary metabolites in stress tolerance in medicinal plants. *Plant Stress*, 3(1): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.plst.2020.12.001>
- Harborne, J. B. 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis (3rd ed.). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5695-1>
- Khan, M. A., et al. 2018. Effect of heavy metals on plant growth and development. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20): 20362-20372. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2335-4>
- Kumar, P. 2018. Physiological and biochemical responses of plants to heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 235: 453-467. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.060>
- Kumar, P. and Rani, R. 2017. Heavy metal toxicity in plants: Physiological and molecular aspects. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(11): 1298. <https://doi.org/10.3390/ijerph14111298>
- Meehly, M. 1955. The determination of chlorophyll. *Plant Physiology*, 30(3): 497-502. <https://doi.org/10.1104/pp.30.3.497>
- Mishra, A., et al. 2019. Biochemical and physiological responses of plants to cadmium toxicity. *Journal of Plant Physiology*, 239: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.02.001>
- Mishra, S., et al. 2020. Comparative effects of cadmium and lead on medicinal plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(8): 9178-9188. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07868-4>
- Poker, R. 1968. The role of antioxidants in plant defense mechanisms. *Journal of Plant Physiology*, 45(5): 1312-1319. <https://doi.org/10.1007/BF01160112>
- Rani, M., et al. 2019. Impact of heavy metals on plants: A review. *Biological Trace Element Research*, 188(3): 734-745. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01647-2>
- Saxena, P., et al. 2020. Response of medicinal plants to heavy metal stress. *Journal of Environmental Management*, 261: 110175. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110175>
- Sharma, P., et al. 2020. Role of antioxidants in medicinal plants during stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24): 9032. <https://doi.org/10.3390/ijms21249032>
- Sharma, R., et al. 2021. Interaction of heavy metals on antioxidant defense systems in medicinal plants. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(7): 406. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08792-0>
- Tiwari, S., et al. 2021. Antioxidant activity of medicinal plants under metal stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7): 2193-2205. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01148>
- Voutsas, D. 2016. Impact of heavy metals on the environment and agricultural products. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4): 925-940. <https://doi.org/10.1002/etc.3501>
- Zaheer, A., et al. 2020. Synergistic effects of lead and cadmium on antioxidant enzymes in medicinal plants. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 71: 103226. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103226>