Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 2, Page 294-313 (2024)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.363204.3359

The effect of sodium nitroprusside application on *Salvia virgata* Jacq. plant traits under cadmium stress conditions

Faeze Beheshti Qolezo[1], Mohammad Moghaddam[2*] and Leila Samiei[3]

1- M.Sc. student, Department Horticultural Sciences and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Mashhad, Mashhad, Iran
2*- Corresponding author, Department Horticultural Sciences and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Mashhad, Mashhad, Iran, E-mail: m.moghadam@um.ac.ir
3- Department of Ornamental Plants, Research Centre for Plant Sciences, Ferdowsi University Mashhad, Mashhad, Iran

Received: August 2023 Revised: September 2023 Accepted: December 2023

Abstract

Background and objectives: Maintaining medicinal plants' quality and effective compounds is a fundamental challenge. *Salvia* L. has antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties and is a rich source of biological compounds that destroy free radicals. *Salvia virgate* Jacq. has several biological activities and is used to treat wounds and various skin diseases and prevent blood cancer. Cadmium is one of the most toxic heavy metals due to its long biological half-life, significant mobility in soil, and capacity to be absorbed by plants. Cadmium's negative effects on plant growth, and physiological and biochemical activities reduce plant quality and performance. Sodium nitroprusside is involved in biological processes and responds to various stresses by releasing nitric oxide (NO).

Methodology: To investigate the effect of different levels of sodium nitroprusside on improving the response of *salvia virgata* to cadmium stress under in vitro conditions, an experiment was conducted in the Research Institute of Plant Sciences of the Ferdowsi University of Mashhad with a factorial design based on a completely randomized design with four replications. The studied factors included different levels of cadmium (0 (control), 25, 50, and 100 µM) and sodium nitroprusside (0 (control), 15, and 30 µM). Murashig and Skoog culture media were used for seed cultivation. In this experiment, different amounts of cadmium nitrate were added to the culture medium before adjusting the pH. Sodium nitroprusside was added to the medium after autoclaving and a sub-laminar filter due to its sensitivity to high temperatures. At first, the seeds were sterilized with 70% alcohol and 2% sodium hypochlorite; then, they were planted in a culture medium. After three months of growth, the seedlings were removed from the culture medium. Growth traits include the fresh and dry weight of the aerial part, root, and whole seedling, and physiological and biochemical traits including photosynthetic pigments (measurement of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoid, total chlorophyll, and total photosynthetic pigment), flavonoid, total phenol, carbohydrate, proline, protein, and antioxidant activity were measured. The data obtained from this research were analyzed by Minitab software. The mean comparisons were done by the Bonferroni test at the five percent probability level.

Results: According to the results of the analysis of variance of the data, the interaction effect of cadmium and nitroprusside on seedling fresh weight, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoid, total photosynthetic pigments, total phenol, carbohydrate and proline at the probability level of one percent and seedling dry weight, total chlorophyll, flavonoid, and protein were significant at the five percent probability level. The interaction effect of treatments on antioxidant activity was not significant, but their simple effects were significant. The results of the mean comparison of the data indicated that cadmium stress decreased the fresh and dry weight of seedlings, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, carotenoids, and total photosynthetic pigments in *S. virgata*, and the application of sodium nitroprusside led to the improvement of these traits; so that the application of 30 µM sodium nitroprusside under cadmium stress with a 50 µM concentration showed the highest fresh and dry weight of seedlings and the proline

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

content, and the application of 15 µM sodium nitroprusside under cadmium stress with a 25 µM concentration showed the highest amount of photosynthetic pigments. Also, this research indicated that cadmium stress increased antioxidant activity, total flavonoid, total phenol, soluble carbohydrate, proline, and protein in the *S. virgata* plant. However, sodium nitroprusside application improved these negative effects of cadmium stress. So, the application of 30 µM sodium nitroprusside led to an increase in total flavonoid, total phenol, soluble carbohydrate, and protein under cadmium stress conditions at 25 µM concentration.

Conclusion: The results showed that cadmium stress reduces plant growth and physiological and biochemical functions, but sodium nitroprusside application could improve cadmium's negative effects. These findings show that sodium nitroprusside can be used as an effective instrument in cadmium stress management in medicinal plants and help to improve the growth and quality of these plants. This research, in addition to enhancing our knowledge about the mechanisms of plants' response to cadmium stress, helps to analyze the effect of sodium nitroprusside in exposure to environmental life pollutants.

Keywords: Protein, proline, photocentric pigments, total phenol, flavonoid.

اثر کاربرد سدیم نیتروپروساید بر صفات گیاهی *Salvia virgata* Jacq. در شرایط تنش کادمیوم

فائزه بهشتی قلهزو[۱]، محمد مقدم[۲*] و لیلا سمیعی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

پست الکترونیک: m.moghadam@um.ac.ir

۳- دانشیار، گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: در تولید گیاهان دارویی، حفظ کیفیت و ترکیب‌های مؤثر آنها چالشی اساسی است. جنس مریم‌گلی (*Salvia* spp.)، منبع سرشاری از ترکیب‌های بیولوژیک هستند که باعث انهدام رادیکال‌های آزاد و اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد میکروبی این گیاهان می‌شوند. مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*) دارای چندین فعالیت بیولوژیکی است و از آن برای درمان زخم‌ها و بیماری‌های مختلف پوستی و برای جلوگیری از سرطان خون استفاده می‌شود. کادمیوم به‌دلیل نیمه‌عمر زیستی طولانی، تحرک قابل توجه در خاک و ظرفیت جذب توسط گیاهان، یکی از سمّی‌ترین فلزات سنگین است. اثرهای منفی کادمیوم بر رشد، فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان، باعث کاهش کیفیت و عملکرد گیاهان می‌شود. سدیم نیتروپروساید با آزاد کردن نیتریک اکسید (NO)، در فرایندهای زیستی و پاسخ به تنش‌های مختلف دخالت دارد.

مواد و روش‌ها: با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف سدیم نیتروپروساید در بهبود پاسخ گیاه مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*) به تنش کادمیوم تحت شرایط درون شیشه‌ای، آزمایشی با طراحی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل سطوح مختلف کادمیوم (۰ (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و سدیم نیتروپروساید (۰ (شاهد)، ۱۵ و ۳۰ میکرومولار) بودند. از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ برای کشت بذرها استفاده شد. در این آزمایش مقادیر مختلف نیترات کادمیوم قبل از تنظیم pH به محیط کشت اضافه گردید. سدیم نیتروپروساید به‌دلیل حساسیت به دمای بالا بعد از اتوکلاو و با فیلتر زیر لامینار به محیط اضافه گردید. در ابتدا، بذرها با استفاده از الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۲٪ استریل شدند؛ سپس در محیط کشت کاشته شدند. پس از سه ماه رشد، گیاهچه‌ها از محیط کشت برداشته شدند. صفات رشدی شامل وزن تر و خشک بخش هوایی، ریشه و کل گیاهچه و صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی (اندازه‌گیری کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئید، کلروفیل کل و رنگیزه فتوسنتزی کل)، فلاونوئید، فنول کل، کربوهیدرات، پرولین، پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌های بدست‌آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Minitab انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Bonferroni در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج: طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر وزن تر گیاهچه، طول اندام هوایی، کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئید، رنگیزه‌های فتوسنتزی کل، فنل کل، کربوهیدرات و پرولین در سطح احتمال ۱٪ و وزن خشک گیاهچه، کلروفیل کل، فلاونوئید و پروتئین در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد. اثر متقابل تیمارها بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار نشد؛ ولی اثرهای ساده آنها معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تنش کادمیوم باعث کاهش وزن تر و خشک گیاهچه، طول اندام هوایی، کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل، کاروتنوئید و رنگیزه‌های فتوسنتزی کل در گیاه مریم‌گلی ترکه‌ای شد و استفاده از سدیم نیتروپروساید منجر به بهبود این صفات گردید؛ به‌طوری که استفاده از ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید تحت تنش کادمیوم با غلظت ۵۰ میکرومولار، بیشترین وزن تر و خشک گیاهچه و میزان پرولین را نشان داد و استفاده از ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید تحت تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار، بیشترین میزان طول اندام هوایی، کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل، کاروتنوئید و رنگیزه‌های فتوسنتزی کل را نشان داد. همچنین، نتایج دیگر این پژوهش بیانگر آن بود که تنش کادمیوم منجر به افزایش

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان فلاونوئید کل، فنل کل، کربوهیدرات محلول، پرولین و پروتئین در گیاه مریم‌گلی ترکه‌ای شد؛ اما استفاده از سدیم نیتروپروساید باعث بهبود تأثیرات منفی تنش کادمیوم می‌گردید؛ به‌طوری که استفاده از ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید منجر به افزایش فلاونوئید کل، فنل کل، کربوهیدرات محلول و پروتئین در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که تنش کادمیوم باعث کاهش رشد و عملکردهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان می‌شود، اما استفاده از سدیم نیتروپروساید توانست تأثیرات منفی کادمیوم را بهبود بدهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سدیم نیتروپروساید می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مؤثر در مدیریت تنش‌های کادمیومی در گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گیرد و به بهبود رشد و کیفیت این گیاهان کمک کند. این تحقیق علاوه بر افزایش اطلاعات ما درباره سازوکارهای پاسخ گیاهان به تنش کادمیومی، به تحلیل تأثیر سدیم نیتروپروساید در مواجهه با آلاینده‌های زیست‌محیطی کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنول کل، فلاونوئید.

مقدمه

جنس مریم‌گلی (*Salvia* spp.) یکی از مهمترین جنس‌های تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که بیش از ۱۰۰۰ گونه در دنیا دارد (Heydari *et al*., 2020). ایران یکی از مراکز تنوع جنس مریم‌گلی در آسیا است و ۶۱ گونه از این جنس به‌صورت خودرو در ایران پراکنش دارد که ۱۹ گونه آن انحصاری است (Jamzad & Moein, 2017). گونه مریم‌گلی (*S. virgata*) گیاهی چند ساله و علفی است که از سطح دریا تا ارتفاع ۲۳۰۰ متر می‌روید و از طریق کریمه، بالکان، ایتالیا، قفقاز، شمال عراق، ایران، افغانستان، ترکیه و آسیای میانه گسترش می‌یابد (Guzel *et al*., 2021؛ Ergul *et al*., 2021؛ Şenkal *et al*., 2019). محتوای گونه‌های مریم‌گلی غنی و عموماً سرشار از اسانس هستند و استفاده از آنها در بهداشت عمومی از زمان‌های قدیم تا به امروز موضوع بسیاری از تحقیقات رایج بوده و جای خود را در داروسازی بسیاری از کشورهای جهان باز کرده‌اند. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد عصاره‌های جنس مریم‌گلی به‌دلیل وجود پلی‌فنول‌ها (عمدتاً اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی نشان می‌دهند (İnan *et al*., 2021). ترکیب‌های اصلی اسانس، پنتاکوزان (۲۰/۰۹٪)، اکسید کاریوفیلن (۶/۹۰٪)، فیتول (۶/۸۳٪)، اسپاتولنول (۶/۰۹٪) و نوناکوزان (۵/۱۵٪) بودند. اجزای اصلی مختلف مانند بورنئول (Şenkal *et al*., 2019)، استروگل و آلفا–آمورفن (Yilar *et al*., 2017) نیز در اسانس *S. virgata* ثبت شده است. تحقیقات نشان داده است که مریم‌گلی ترکه‌ای دارای چندین فعالیت بیولوژیکی (ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضددرد، ضدالتهاب و ...) است و از آن برای درمان زخم‌ها و بیماری‌های مختلف پوستی و برای جلوگیری از سرطان خون استفاده می‌شود (İnan *et al*., 2021؛ Guzel *et al*., 2021؛ Ergul *et al*., 2021؛ Şenkal *et al*., 2019). رشد گیاه و بهره‌وری از آن تا حد زیادی تابع تنش‌های محیطی از قبیل تنش کم آبی، شوری، فلزات سنگین و ... است، به‌طوری که عوامل محیطی سبب تغییرات در رشد گیاهان دارویی (در مقدار و کیفیت مواد مؤثره) می‌گردد.

فلزات سنگین یکی از خطرناک‌ترین گروه آلاینده‌های زیست‌محیطی هستند و مشکل اصلی مربوط به تجزیه‌ناپذیر بودن این آلاینده‌هاست (Amari *et al*., 2017؛ Asghari *et al*., 2020؛ Azizi *et al*., 2021؛ Heidari *et al*., 2021). در بین فلزات سنگین، کادمیوم یکی از فلزات سنگین دوظرفیتی و به‌عنوان یک ماده سرطان‌زا شناخته شده که عامل اثرگذاری در ایجاد بیماری‌های قلبی، فشارخون، جنین ناقص و جهش ژنی است (Jafarhaddadian *et al*., 2021). کادمیوم در طبیعت از منابع مختلف مانند صنایع

ذوب فلز، فاضلاب‌های شهری، سوخت و استفاده بی‌رویه از کودهای فسفاته آزاد می‌شود و می‌تواند به انباشت آن در آب و خاک منجر شود (Azizi *et al.*, 2021). خاک‌های مختلف به میزان متفاوتی کادمیوم را جذب می‌کنند. این توانایی جذب به عوامل مختلفی ازجمله خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک، مقدار محتوای آلی، سطح pH خاک، میزان هوموس و کمپوست، نوع معادن رسوبی و شرایط محیطی بستگی دارد (Zulfiqar *et al.*, 2022). سمّیت کادمیوم تا ۲۰ برابر بیشتر از سایر فلزات سنگین است و در غلظت‌های بسیار پایین هم برای طیف وسیعی از گیاهان سمّی است؛ به‌طوری که در غلظت‌های بالاتر از ۵ تا ۱۰ میکروگرم بر وزن خشک گیاه می‌تواند باعث مرگ گیاه شود. کادمیوم در خاک بسیار متحرک است و در صورت حضور در محیط ریشه، به‌راحتی توسط ریشه گیاهان جذب و بعد وارد آوندهای چوبی می‌شود و به بخش‌های هوایی گیاه انتقال‌یافته و در اندام‌های مختلف آن انباشته می‌گردد که باعث تغییرات نامطلوبی در خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه می‌شود که در نهایت منجر به کاهش شدید تولید محصولات می‌گردد. مهمترین دلیل اثر مخرب کادمیوم، تولید القایی رادیکال‌های فعال اکسیژن است که منجر به اختلال در غشای سلول و اندامک می‌شود و فعالیت متابولیکی سلول را تغییر می‌دهد. از اثرهای نامطلوب تجمع کادمیوم می‌توان به اختلال در جذب و انتقال مواد مغذی و آب، افزایش آسیب اکسیداتیو، اختلال در متابولیسم گیاه و مهار مورفولوژی و فیزیولوژی گیاه مانند کاهش جوانه‌زنی، مهار رشد ریشه و ساقه، کاهش سطح برگ، کلروزه و نکروزه شدن برگ‌ها و صدمه به غشاء تیلاکوئیدی کلروپلاست‌ها و کاهش شدید ظرفیت فتوسنتز گیاه اشاره کرد (Asghari *et al.*, 2020؛ Heidari *et al.*, 2021؛ Jafarhaddadian *et al.*, 2021). افزایش غلظت کادمیوم با کاهش وزن خشک بخش هوایی و ریشه و افزایش میزان انباشت کادمیوم در گیاه همیشه‌بهار همراه بود. در نعنا فلفلی اعمال کادمیوم موجب کاهش خصوصیات مورفولوژیکی و درصد اسانس گردید (Amirmoradi *et al.*, 2016). کاهش رشد رویشی گیاه در اثر کاربرد فلزات سنگین همانند کادمیوم در لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris*) (Amini & Balouchi, 2017)، نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L.) (Baharvandi *et al.*, 2023) و ذرت (*Zea mays*) (Mohsenzadeh & Sheikhpour Jalaly, 2019) نیز گزارش شده است.

سدیم نیتروپروساید (SNP) ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) به شکل پودری قرمز رنگ است که اثر تحریک‌کنندگی آن به‌دلیل آزادکردن نیتریک اکسید یا مونوکسید نیتروژن (NO) در محیط کشت است و اثرهای تحریک‌کننده آن در باززایی شاخساره و توسعه ریشه در چند گونه گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده است (Chen *et al.*, 2018؛ Narimani *et al.*, 2017). اخیراً استفاده از مولکول‌های سیگنال‌دهنده مانند NO به‌منظور کاهش اثرهای تنش فلزات سنگین و سایر تنش‌های غیرزیستی رایج شده است (Izadi & Mirazi, 2022). اثرهای NO بر انواع مختلف سلول‌ها با توجه به غلظت و محل NO در سلول‌های گیاهی و نوع و غلظت فلز، ممکن است محافظ یا سمّی باشد، بنابراین باید به غلظت مورد استفاده با توجه به نوع و شدت تنش‌های زیستی و غیرزیستی و گونه گیاه توجه کرد (Chen *et al.*, 2018؛ Danaee & Abdossi, 2022؛ Sharma *et al.*, 2020). در پژوهشی نشان داده شد که نیتروپروساید سدیم (SNP)، به‌عنوان یک اهداءکننده NO، می‌تواند تنش کادمیوم را در گیاهان از طریق مهار مستقیم ROS یا افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش دهد؛ بنابراین مولکول‌های سیگنال داخلی مانند NO ممکن است در سنجش کادمیوم و فعال‌شدن مسیرهای سیگنال‌دهنده برای افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش کادمیوم دخالت داشته باشند

(Nabaei & Amooaghaie, 2019). NO در تنظیم خیلی از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه شامل جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه، بسته‌شدن روزنه‌ها، تنظیم فتوسنتز، تنفس و گلدهی و پاسخ‌های تطبیقی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی وارد عمل می‌شود (Chen *et al*., 2018؛ Izadi & Mirazi, 2022؛ Nabaei & Amooaghaie, 2019؛ Sharma *et al*., 2020). محققان گزارش کرده‌اند که استفاده از نیتریک اکسید به‌عنوان یک ماده خارجی، می‌تواند باعث جذب ROS، افزایش توانایی غشاء سلولی، بهبود فتوسنتز و وضعیت آب برگ شود. افزایش کارایی فتوسنتزی ممکن است یکی از عوامل افزایش عملکرد توسط سدیم نیتروپروساید باشد (Asghari *et al*., 2020)، همانطور که در یک مطالعه از Gorgini Shabankareh وKhorasani Nejad (۲۰۱۷) با محلول‌پاشی سدیم نیتروپروساید، کلروفیل، درصد اسانس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرزه افزایش یافت. همچنین، پژوهشگران در یک مطالعه روی گیاه نخود اعلام کردند که استفاده از سدیم نیتروپروساید به‌عنوان یک ماده دهنده نیتریک اکسید، می‌تواند در شرایط تنش کادمیوم منجر به رشد بهتر گیاه و کاهش غلظت کادمیوم در اجزای مختلف گیاه شود (Asghari *et al*., 2020). ازاین‌رو، با توجه به مزایای ذکرشده برای سدیم نیتروپروساید، هدف از این مطالعه بررسی پاسخ مریم‌گلی ترکه‌ای به سطوح مختلف سدیم نیتروپروساید (به‌عنوان یک ماده کاهش‌دهنده تنش) تحت تنش کادمیوم در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی اثرهای مثبت سدیم نیتروپروساید بر عملکرد مریم‌گلی ترکه‌ای تحت تنش کادمیوم به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار در شرایط درون شیشه‌ای در سال ۱۴۰۱ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. انتخاب غلظت‌های مناسب برای این آزمایش با انجام پیش‌آزمون انجام شد. تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق شامل کادمیوم در سه سطح (صفر (شاهد)، ۲۵،۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از منبع نیترات کادمیوم) [$Cd(NO_3)_2$] و سدیم نیتروپروساید در سه سطح (صفر (شاهد)، ۱۵ و ۳۰ میکرومولار) بود. بذرهای مریم‌گلی ترکه‌ای از مزرعه دانشگاه فردوسی تهیه شد. برای ضدعفونی بذرها، ابتدا با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و بعد غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید، سپس سه بار با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند (Samiei *et al*., 2020؛ Ourmazd & Chalabian, 2006). از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ برای کشت بذرها استفاده شد. در این آزمایش مقادیر مختلف نیترات کادمیوم محاسبه و قبل از تنظیم pH به محیط کشت اضافه گردید. سدیم نیتروپروساید به‌دلیل حساسیت به دمای بالا بعد از اتوکلاو و با فیلتر زیر لامینار به محیط کشت اضافه شد. بذرهای کاشته شده در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی، هشت ساعت تاریکی و شدت نور ۵۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و رطوبت بین ۶۰٪ تا ۷۰٪ رشد کردند (Jafari *et al*., 2017). گیاهچه‌ها پس از سه ماه رشد که در شیشه‌های مربایی قرار داشتند، از محیط کشت خارج و صفات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شدند.

صفات رشدی

وزن تر و خشک بخش هوایی، ریشه و کل گیاهچه با استفاده از ترازوی دقیق با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد با استفاده از ترازوی دقیق آزمایشگاهی توزین

و وزن خشک نمونه‌ها ثبت گردید و برای طول بخش هوایی و نسبت طول بخش هوایی به ریشه هر گیاهچه به‌وسیله خطکش اندازه‌گیری شد.

صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از برگ‌های گیاهچه‌ها استفاده شد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

اندازه‌گیری کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کاروتنوئیدها، کلروفیل کل و رنگیزه فتوسنتزی کل، طبق روش Dere و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل OPTIMA SP-3000 Plus) میزان جذب نور در طول موج‌های ۶۵۳، ۶۶۶ و ۴۷۰ نانومتر قرائت و مشخص گردید. در نهایت غلظت کلروفیل با استفاده از روابط زیر تعیین شد.

رابطه ۱ $Chla= (15.65*A666)– (7.34*A653)$

رابطه ۲ $Chlb= (27.05*A653)– (11.21*A666)$

رابطه ۳ $Cx+c= (1000*A470–2.860*Chla–129.2*Chlb)/245$

رابطه ۴ $Chlt= Chla+Chlb$

رابطه ۵ $pigmentt= Chla+Chlb+Cx+c$

Chla: کلروفیل a، Chlb: کلروفیل b، کاروتنوئید کل: Cx+c، کلروفیل کل: Chlt، $pigment_t$: رنگیزه‌های فتوسنتزی

فلاونوئیدها

از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید برای تعیین مقدار فلاونوئید استفاده شد (Chang *et al.*, 2002). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی را با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب گردید و محلول در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. از غلظت‌های مختلف کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده شد و با رابطه زیر محاسبه گردید.

رابطه ۶ $y= 330.92x-48.006$

فنل کل

میزان ترکیب‌های فنل کل براساس روش رنگ‌سنجی فولین سیکالتو و برحسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۶۵ نانومتر ارزیابی شد. ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی را با ۰/۲ میلی‌لیتر فولین سیکالتو ۵۰٪ مخلوط و دو میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و بعد از سه دقیقه، یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰٪ اضافه و مخلوط گردید تا یکنواخت شود. پس از یک ساعت قراردادن در دمای محیط، میزان جذب عصاره نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای منحنی استاندارد از غلظت‌های متفاوت اسید گالیک استفاده گردید که به‌وسیله رابطه زیر محاسبه شد (Gao *et al.*, 2000).

رابطه ۷ $y= 732.92x+19.18$

کربوهیدرات‌ها

از روش Paquin و Lechasseur (۱۹۷۹) برای ارزیابی قندهای محلول استفاده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده (۰/۱۵ گرم پودر آنترون خالص با ۱۰۰cc اسیدسولفوریک ۷۲٪ حل شد) مخلوط گردید و ۱۰ دقیقه در حمام آب‌جوش قرار گرفت، پس از پایین آمدن دما، ۳۰ دقیقه در یخچال گذاشته، سپس میزان جذب نمونه در طول موج ۶۲۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و با منحنی استاندارد مربوط به غلظت‌های مختلف گلوکز خالص محاسبه گردید.

رابطه ۸ $y= 1228.8x-334.32$

پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین ۰/۱ گرم از بافت برگ در ۲ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک آب‌دار ۳٪ کاملاً ساییده و از محلول حاصل برای سنجش پرولین استفاده شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره، یک میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک گلایسیال اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در حمام آب‌جوش قرار داده شد و بلافاصله در ظرف محتوی یخ قرار داده شد. میزان پرولین با خواندن جذب واکنش نین‌هیدرین در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر طبق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) مشخص شد و غلظت پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین تعیین گردید.

رابطه ۹ $y= 294.96x-59.361$

پروتئین

برای ارزیابی میزان پروتئین، ۰/۱ گرم برگ تازه با یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با اسیدیته ۷/۸) حاوی EDTA یک مولار اضافه گردید. مواد محلول توسط سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا شد. سنجش پروتئین‌های محلول برگ به روش برادفورد انجام شد (Bradford *et al.*, 1976). جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر ثبت گردید. برای رسم نمودار استاندارد از آلبومین به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده و با رابطه زیر محاسبه گردید.

رابطه ۱۰ $y= 627.2x-83.732$

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش Yang و همکاران (۲۰۱۱) استفاده گردید. بدین‌منظور ماده ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) به عصاره متانولی نمونه‌ها اضافه و محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفت. جذب نمونه در برابر یک بلانک در طول موج ۵۱۷ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و درصد بازدارندگی DPPH به‌صورت زیر محاسبه گردید که در آن، A_0: جذب کنترل (بدون نمونه)، A_1: جذب در حضور نمونه و A_2: جذب نمونه بدون رادیکال DPPH است.

رابطه ۱۱

$$\text{درصد بازدارندگی (DPPH)} = [1-(A1-A2)/A0]\times 100$$

تجزیه‌وتحلیل داده‌های بدست‌آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار Minitab انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Bonferroni در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

صفات رشدی

وزن تر و خشک گیاهچه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل کادمیوم و سدیم نیتروپروساید بر وزن تر و خشک بخش هوایی در سطح احتمال ۱٪ و بر وزن تر و خشک کل گیاهچه به‌ترتیب در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار شد؛ ولی بر وزن تر و خشک ریشه معنی‌دار نشد. تیمار کادمیوم بر وزن تر و خشک ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد؛ ولی اثر سدیم نیتروپروساید بر وزن تر ریشه معنی‌دار نشد و فقط بر وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۱).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با اعمال کادمیوم وزن تر و خشک کل گیاهچه نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت؛ به‌طوری که در تیمار

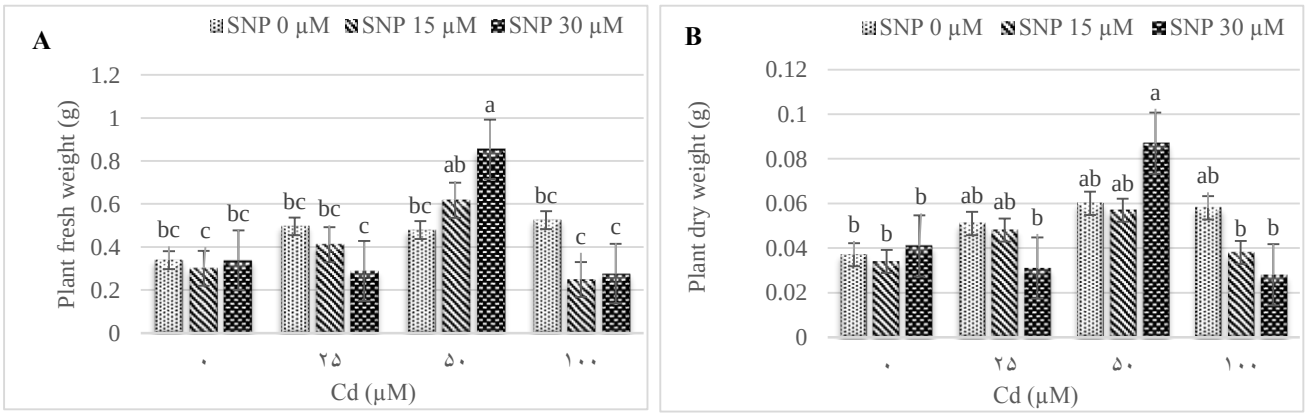
۱۰۰ میکرومولار کادمیوم کمترین میزان وزن تر و خشک کل گیاهچه مشاهده شد که حکایت از کاهش به‌ترتیب ۲۶/۵۴ و ۲۴/۳۲ درصدی وزن تر و خشک کل گیاهچه نسبت به شاهد داشت. وزن تر و خشک کل گیاهچه در شرایط کاربرد سدیم نیتروپروساید افزایش یافت، به‌طوری که بیشترین وزن تر و خشک گیاهچه در تیمار ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید تحت تنش ۵۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که موجب افزایش ۱۵۱/۹۱ و ۱۳۵/۱۳ درصدی وزن تر و خشک کل گیاهچه نسبت به شاهد شد (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر سدیم نیتروپروساید بر ویژگی‌های رشدی مریم‌گلی ترکه‌ای (***Salvia virgata***) تحت تنش کادمیوم

Table 1. ANOVA of sodium nitroprusside effects on *Salvia virgata* growth characteristics under cadmium stress

Treatment	Root fresh weight	Root dry weight	Aerial parts fresh weight	Aerial parts dry weight	Plant fresh weight	Plant dry weight	Aerial parts length	Aerial parts length to root length
Cadmium (a)	0.0236**	0.000307**	0.0431**	0.000328**	0.199675**	0.001759**	5.00**	1606.86**
Sodium itroprusside (b)	0.0027^{ns}	0.000101*	0.0025^{ns}	0.000005^{ns}	0.013437^{ns}	0.000144^{ns}	0.48**	1550.24**
a×b	0.0051^{ns}	0.000035^{ns}	0.0348**	0.000471**	0.066026**	0.000582*	0.97**	495.70**
Experimental error	0.0044	0.000028	0.0036	0.000065	0.009076	0.000178	0.02	43.00
C.V. (%)	0.005	36.08	20.54	25.19	22.09	28.08	5.09	20.8

n.s., *, and **: non-significant, significant at 1, and 5% probability levels, respectively



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر سدیم نیتروپروساید (**SNP**) بر **A**: وزن تر و **B**: وزن خشک گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای (***Salvia virgata***) تحت تنش کادمیوم

Figure 1. Means comparison of sodium nitroprusside (SNP) effects on A: fresh weight and B: dry weight of *Salvia virgata* plants under cadmium stress

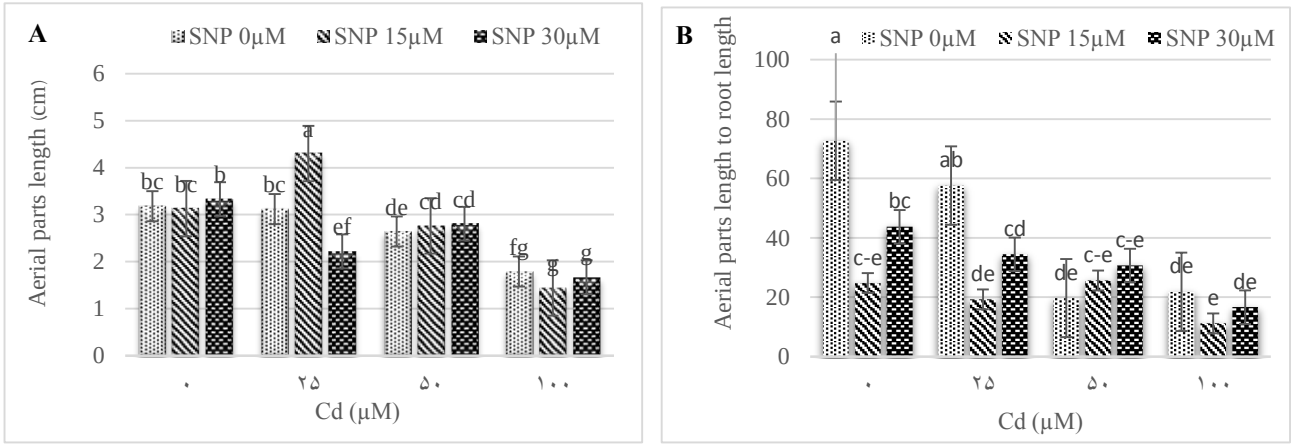
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Bonferroni test).

طول بخش هوایی

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر طول بخش هوایی گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین طول بخش هوایی گیاهچه، مربوط به تیمار سدیم نیتروپروساید با غلظت ۱۵میکرومولار در شرایط تنش ۲۵ میکرومولار کادمیوم است که نسبت به گیاهچه شاهد ۳۵/۲۲٪ افزایش داشت. کمترین طول بخش هوایی گیاهچه در تیمار با غلظت ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید در شرایط تنش ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که نسبت به شاهد ۵۴/۷۱٪ کاهش یافت (شکل ۲– A).

نسبت طول بخش هوایی به ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل کادمیوم و سدیم نیتروپروساید بر نسبت طول بخش هوایی به ریشه گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در شرایطی عدم کاربرد سدیم نیتروپروساید نسبت بخش هوایی به ریشه، بیشتر است. افزایش غلظت کادمیوم می‌تواند منجر به کاهش نسبت بخش هوایی به ریشه شود. با افزایش غلظت سدیم نیتروپروساید (نماینده تنش اکسیداتیو)، نسبت بخش هوایی به ریشه افزایش یافت (شکل ۲– B).



شکل ۲– مقایسه میانگین اثر سدیم نیتروپروساید (SNP) بر A: طول بخش هوایی و B: نسبت طول بخش هوایی به طول ریشه گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*) تحت تنش کادمیوم

Figure 2. Means comparison of sodium nitroprusside (SNP) effects on A: aerial parts length and B: ratio of aerial parts length to root length of *Salvia virgata* plants under cadmium stress

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Bonferroni test).

صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

رنگیزه‌های فتوسنتزی

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید و رنگیزه‌های فتوسنتزی کل در سطح احتمال ۱٪ و کلروفیل کل در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن بود که تیمار ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار و نسبت به شاهد باعث افزایش میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و رنگیزه کل به‌ترتیب ۱۰۰، ۶۰/۱۹، ۹۲/۷۳، ۳۰۰ و ۱۰۳/۵۸ درصد شد که به لحاظ آماری اختلاف

معنی‌داری با شاهد داشت. همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید و رنگیزه کل) در تیمار ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود که نسبت به گیاه شاهد به‌ترتیب ۳۸/۵۷، ۲۲/۳۳، ۳۰/۷۹، ۵۲/۹۴ و ۳۲/۲۴ درصد کاهش شد، به‌طوری که تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان داد (شکل ۳).

فلاونوئیدها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر فلاونوئید کل مریم‌گلی ترکه‌ای در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید سبب افزایش میزان فلاونوئید در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار شد؛ به‌طوری که نسبت به شاهد باعث افزایش ۲۳/۷۳ درصدی آنها گردید که به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کمترین میزان فلاونوئید در تیمار با غلظت‌های ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید و غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که نسبت به گیاه شاهد ۴۰/۶۹٪ کاهش داشت (شکل ۴- A).

فنول کل

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر فنول کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید سبب افزایش میزان فنول کل در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار شد، به‌طوری که نسبت به شاهد باعث افزایش ۴۲/۶۰ درصدی آنها شد. همچنین کمترین میزان فنل کل در سدیم نیتروپروساید با غلظت ۱۵ میکرومولار و کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار است که نسبت به شاهد ۲۹/۴۲٪ کاهش داشت (شکل ۴- B).

کربوهیدرات‌ها

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر کربوهیدرات محلول در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید سبب افزایش میزان کربوهیدرات محلول در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار شد، به‌طوری که نسبت به شاهد باعث افزایش ۵۳/۹۱ درصدی آن گردید. همچنین نتایج نشان داد که کمترین میزان کربوهیدرات محلول در تیمار با غلظت‌های ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید و غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که نسبت به گیاه شاهد ۵۸/۹۶٪ کاهش داشت (شکل ۴- C).

پرولین

اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر میزان پرولین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید تحت تنش کادمیوم با غلظت ۵۰ میکرومولار باعث افزایش میزان پرولین مریم‌گلی ترکه‌ای گردید؛ به‌طوری که نسبت به شاهد ۱۱۹/۰۹٪ افزایش داشت که به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت؛ همچنین کمترین میزان پرولین در سطح ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید و سطح ۵۰ میکرومولار کادمیوم بود که نسبت به شاهد ۳۶/۳۶٪ کاهش داشت (شکل ۴- D).

پروتئین

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر متقابل کادمیوم و نیتروپروساید بر میزان پروتئین مریم‌گلی ترکه‌ای در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد ۳۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید سبب افزایش میزان پروتئین در شرایط تنش کادمیوم با غلظت ۲۵ میکرومولار شد، به‌طوری که نسبت به شاهد همان سطح باعث افزایش ۱۵۵/۴۲ درصدی آن گردید. کمترین میزان پروتئین در سطح ۱۵ میکرومولار سدیم نیتروپروساید و سطح ۵۰ میکرومولار کادمیوم بود که نسبت به شاهد ۳۴/۳۷٪ کاهش داشت (شکل ۴- E).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

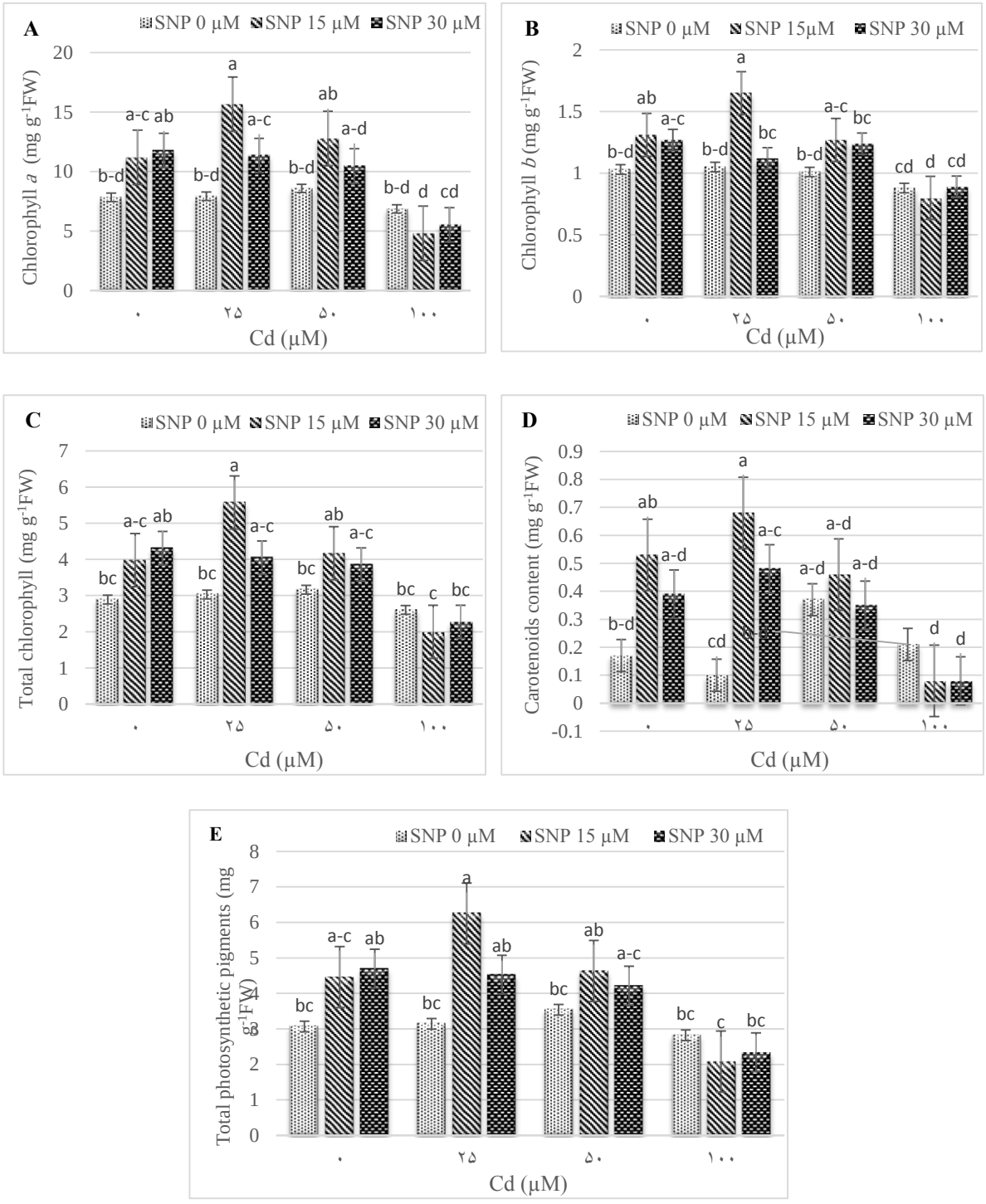
نتایج حاصل شده از تجزیه واریانس مشخص کرد که اثر متقابل تیمارها بر این صفت معنی‌دار نشد. اثر ساده کادمیوم تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ و سدیم نیتروپروساید در سطح احتمال ۵٪ بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش سطوح سدیم نیتروپروساید کاهش یافت و با افزایش سطوح کادمیوم میزان آن روند افزایشی داشت که اثر کادمیوم و سدیم نیتروپروساید را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد (شکل ۵).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سدیم نیتروپروساید بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*) تحت تنش کادمیوم

Table 2. ANOVA of sodium nitroprusside effects on *Salvia virgata* physiological characteristics under cadmium stress

Treatment	Chlorophyll *a*	Chlorophyll *b*	Total chlorophyll	Carotenoids content	Total photosynthetic pigments	Antioxidant activity	Flavonoids content	Total phenol content	Carbohydrates content	Proline content	Protein content
Cadmium (a)	61.76**	0.3**	6.21**	0.17**	8.42**	42.55**	133.56**	233.3^{ns}	271.31**	0.36*	325.4^{ns}
Sodium itroprusside (b)	33.33**	0.2**	3.2**	0.14**	4.6**	29.01*	40.63*	1990.3**	3.07^{ns}	1.00**	3712.5**
a*b	13.97**	0.08**	1.47*	0.07**	2.12**	4.94^{ns}	25.32*	1800.1**	272.75**	1.08**	525.8*
Experimental error	3.75	0.01	0.48	0.01	0.57	6.29	8.94	240	5.98	0.1	198
C.V. (%)	20.2	8.83	19.8	35.9	19.8	3.27	12.7	13.5	11.1	23.9	30.4

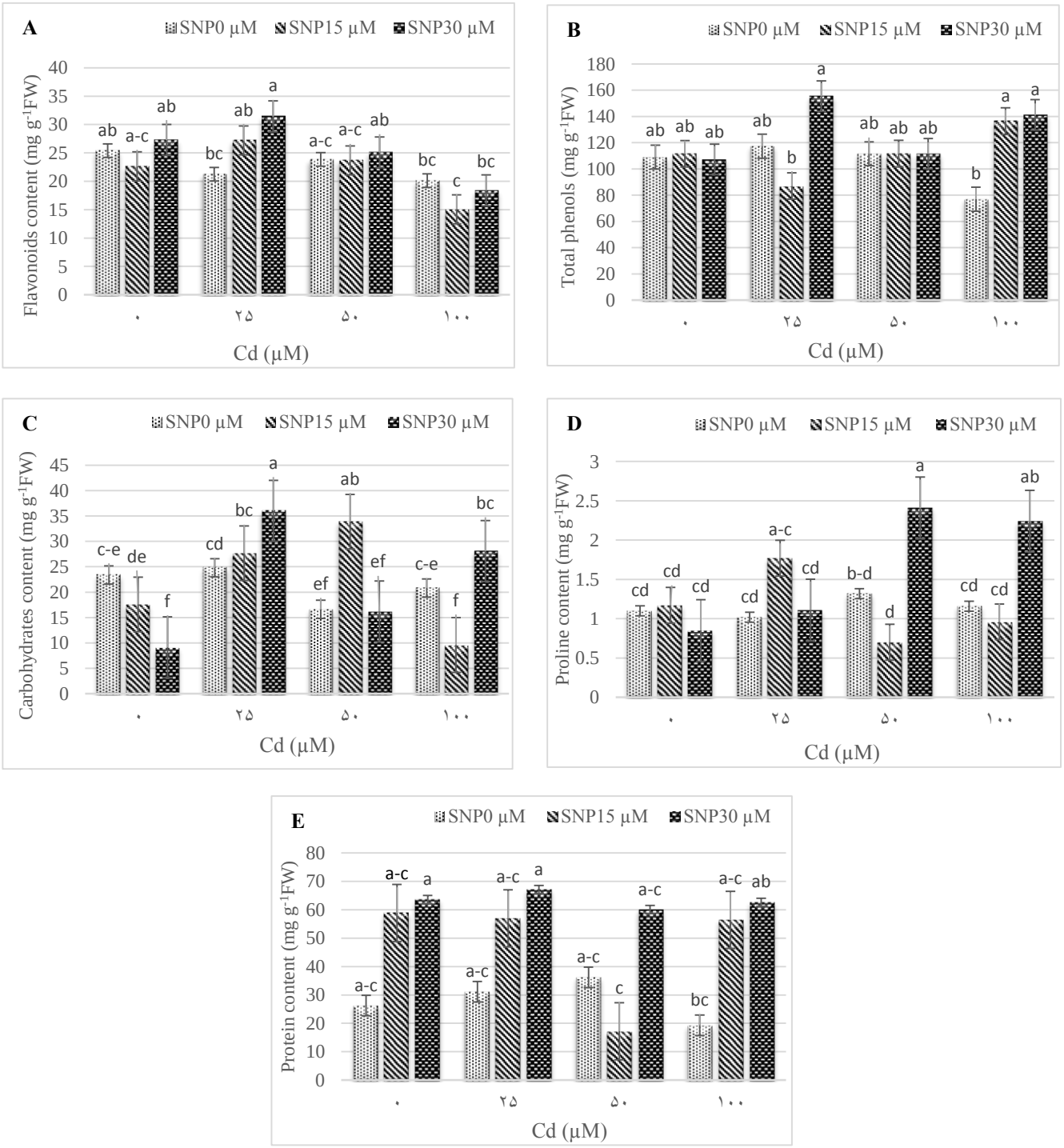
n.s., *, and **: non-significant, significant at 1, and 5% probability levels, respectively



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر سدیم نیتروپروساید (SNP) بر A: کلروفیل *a*، B: کلروفیل *b*، C: کلروفیل کل، D: کاروتنوئید و E: رنگیزه‌های فتوسنتزی کل گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*) تحت تنش کادمیوم

Figure 3. Means comparison of sodium nitroprusside (SNP) effects on A: chlorophyll *a*, B: chlorophyll *b*, C: total chlorophyll, D: carotenoids content, and E: total photosynthetic pigments of *Salvia virgata* plants under cadmium stress

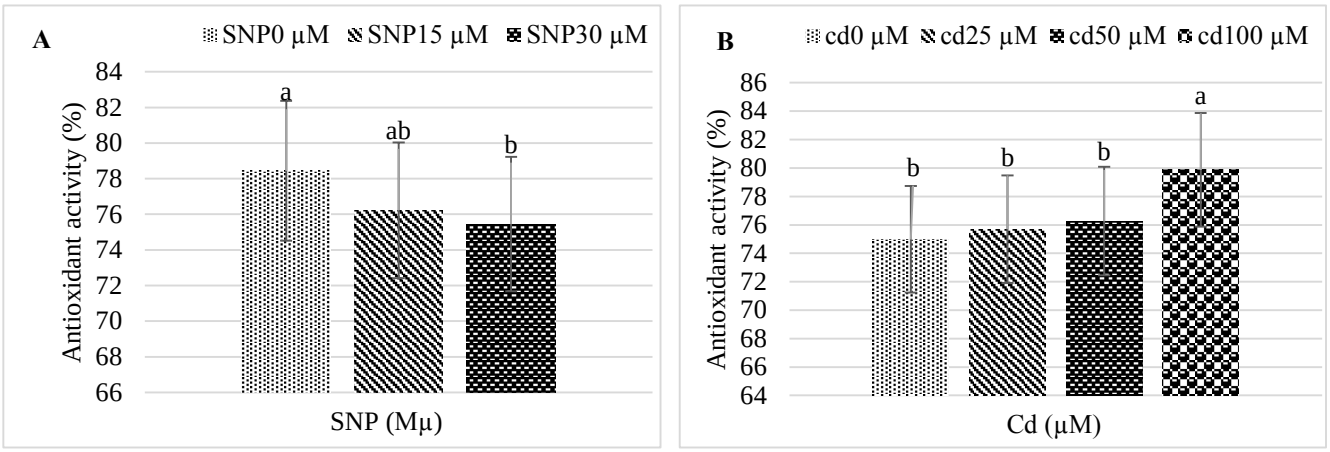
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Bonferroni test).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر سدیم نیتروپروساید (SNP) بر محتوی A: فلاونوئیدها، B: فنول کل، C: کربوهیدرات‌ها، D: پرولین و E: پروتئین گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*) تحت تنش کادمیوم

Figure 4. Means comparison of sodium nitroprusside (SNP) effects on content of A: flavonoids, B: total phenols, C: carbohydrates, D: proline, and E: protein of *Salvia virgata* plants under cadmium stress

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Bonferroni test).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر A: سدیم نیتروپروساید (SNP) و B: کادمیوم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای (*Salvia virgata*)

Figure 5. Means comparison of A: sodium nitroprusside (SNP) and B: cadmium effects on antioxidant activity of *Salvia virgata* plants

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Bonferroni test).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش وزن تر و خشک کل گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای ممکن است در ارتباط با سمّیت کادمیوم باشد. بدین‌ترتیب که این ماده سمّی می‌تواند سازوکارهای فیزیولوژیکی نرمال را مختل کرده و موجب اثرهای منفی بر زیست‌توده شود که با نتایج Asghari و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی داشت. کاهش وزن در غلظت‌های سمّی کادمیوم به‌دلیل اختلال در فرایند فتوسنتز، تنفس و متابولیسم نیتروژن رخ می‌دهد. سدیم نیتروپروساید با حفاظت از اندام‌های هوایی گیاه و بهبود وضعیت کلروفیل سلول‌ها و افزایش فتوسنتز در شرایط تنش گیاه می‌تواند منجر به افزایش تجمع ماده خشک تحت این شرایط شود (Asghari *et al.*, 2020).

در پژوهش Baniasadi و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که افزایش غلظت کادمیوم در خاک باعث افزایش غلظت کادمیوم ریشه نسبت به شاخساره شد که استفاده از غلظت‌های مختلف SNP، این مقدار انباشت کادمیوم در ریشه را افزایش داد. در این تحقیق افزایش غلظت کادمیوم موجب اختلال در تعادل طبیعی میان بخش هوایی و ریشه گردید که موجب کاهش رشد بخش هوایی شد. استفاده از سدیم نیتروپروساید، نسبت بخش هوایی به ریشه را افزایش داد. این افزایش نسبت در تنش کادمیوم می‌تواند نشانگر تلاش گیاه در مقابله با تنش اکسیداتیو و رشد بخش هوایی باشد.

مهار رشد تحت تنش کادمیوم ممکن است ناشی از تغییر فرایندهای اصلی متابولیکی، محتوای کلروفیل، سیستم آنتی‌اکسیدانی و جذب عناصر معدنی در برگ‌ها و ریشه‌ها باشد و کاربرد سدیم نیتروپروساید توانست اثرهای منفی کادمیوم را کاهش دهد (Chen *et al.*, 2018). مقدار کلروفیل عموماً با افزایش غلظت کادمیوم کاهش می‌یابد و کاربرد سدیم نیتروپروساید تأثیر به‌سزایی در افزایش مقدار کلروفیل دارد (Baniasadi *et al.*, 2021). بنابراین کاهش تنش کادمیوم توسط سدیم نیتروپروساید ممکن است با

افزایش محتوای کلروفیل، بهبود تعادل مواد مغذی، تنظیم بهتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار انتقال کادمیوم از ریشه به برگ‌ها مرتبط باشد (Chen *et al*., 2018). به نظر می‌رسد کادمیوم با ایجاد رادیکال‌های آزاد و با تحریک تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان برای مقابله با این رادیکال‌های آزاد موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود و سدیم نیتروپروساید با کاهش رادیکال‌های آزاد موجب کاهش آن می‌گردد.

فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین و متنوع‌ترین ترکیب‌های طبیعی هستند که همانند سایر ترکیب‌های فنولی توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را دارند (Khanpour-Ardestani, 2015). اهمیت فلاونوئیدها به علت نقشی است که در سیستم‌های دفاع غیرآنزیمی دارند. عوامل محیطی در فعالیت فلاونوئیدها بسیار تأثیرگذار است و زمانی که در گیاه تنش ایجاد شود، سیستم دفاعی گیاه ازجمله فلاونوئیدها برای مقابله با تنش فعال می‌شوند و افزایش می‌یابند (Ebrahimi *et al*., 2019). گیاهان به‌عنوان پاسخ به برخی ترکیبات پیام‌رسان، نقش دفاعی مهمی دارند و ترکیب‌های فنولی را آزاد می‌کنند. ترکیب‌های فنولی، به‌ویژه فلاونوئیدها، به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، توانایی به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و کاهش تنش اکسیداتیو را دارند. این ترکیبات با سازوکارهای متعددی مانند جاروب رادیکال‌های آزاد، دادن هیدروژن، کلات کردن یون‌های فلزی و یا در همکاری با پراکسیدازها در جمع‌آوری یا حذف پراکسید هیدروژن، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفاء می‌کنند. با توجه به وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی در گیاه گل میمونی، می‌توان نتیجه گرفت که برخی از اثرهای حفاظتی گیاه از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و مهار تولید ROS اعمال می‌گردد. در تنش‌های اکسیداتیو، ترکیب‌های فنولی، به‌ویژه فلاونوئیدها، می‌توانند با فسفولیپیدهای غشاء از طریق پیوند هیدروژنی با سرهای قطبی فسفولیپیدها ارتباط برقرار کنند. در نتیجه، این ترکیبات در سطح داخل و خارج غشاء جمع شده و به‌دلیل جلوگیری از دستیابی مولکول‌های آسیب‌رسان به ناحیه هیدروفوبی دوقطبی، به حفظ سیالیت و تمامیت غشاء کمک می‌کنند. افزایش ترکیب‌های فنولی و فلاونوئیدی به‌دلیل افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول، در حفاظت سلول علیه تنش‌های اکسیداتیو نیز نقش مؤثری خواهد داشت (Khanpour-Ardestani, 2015). نتایج داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فنل کل و فلاونوئید حکایت از آن دارد که محتوای فنل کل و فلاونوئید برگ مریم‌گلی ترکه‌ای با افزایش غلظت کادمیوم افزایش‌یافته و تیمار سدیم نیتروپروساید منجر به افزایش بیشتر فنل و فلاونوئید کل در تمام سطوح کادمیوم شد که با نتایج سایر محققان همخوانی دارد (Mousavi & Razavizadeh, 2021؛ Gerami *et al*., 2018).

در بیشتر شرایط تنش‌زا، افزایش قندهای محلول به‌عنوان یک سازوکار مقاومت در برابر تنش است و تنش کادمیوم مقدار قندهای محلول مریم‌گلی ترکه‌ای را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد و در واقع باعث تنظیم ظرفیت آب سلول در بخش سیتوزول برای مقابله با غلظت بالای یون‌های جذب و انباشته شده در واکوئل گردید. تجمع اسمولیت‌هایی مانند قندها می‌تواند تا حدودی گیاهان را از اثرهای تنش محافظت کند. به نظر می‌رسد که سدیم نیتروپروساید نقش مستقیمی در بیوسنتز قندها در شرایط تنش ندارد. قندهای محلول فقط در شرایط تنش با کاربرد تیمار سدیم نیتروپروساید نسبت به شاهد باعث افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش گردید (Barghi *et al*., 2021؛ Hamidi *et al*., 2017).

تنش فلزات سنگین سبب تجمع پرولین در گیاهان می‌شود. گیاه در شرایط تنش فلزات سنگین، بیشتر مواد

فتوسنتزی خود را صرف تولید ترکیب‌های تنظیم اسمزی ازجمله پرولین می‌کند تا بتواند شرایط لازم را برای ادامه حیات در این شرایط فراهم کند. مقدار افزایش پرولین در شرایط تنش برای بسیاری از گونه‌های گیاهی، بستگی به میزان مقاومت آنها در برابر تنش دارد و در گیاهان مقاوم، غلظت پرولین بیشتر از گیاهان حساس است. تیمار کادمیوم باعث افزایش معنی‌دار پرولین در گیاه مریم‌گلی ترکه‌ای شد که با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان همخوانی دارد (Asghari *et al*., 2020؛ Heidari *et al*., 2021؛ Khanpour-Ardestani, 2015). تیمار سدیم نیتروپروساید باعث افزایش بیشتر پرولین در سطوح مختلف کادمیوم در مریم‌گلی ترکه‌ای شد که به‌نوعی باعث تحریک سیستم دفاعی این گیاه در برابر این تنش و افزایش مقاومت آن گردید که با نتایج پژوهش Baniasadi و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت داشت.

تجمع پروتئین و اسیدهای آمینه به‌عنوان سیگنال مهم در تنش فلزات سنگین شناخته شده است و نقش مهمی در تنظیم اسمزی، تثبیت ماکرومولکول‌ها، مهار ROS و محافظت سلول در برابر آسیب اکسیداتیو دارد (Kamalvand *et al*., 2022). مقادیر بیش از حد ROS عمدتاً به‌دلیل واکنش آنها با لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، برای سلول‌ها مضر است. در شرایط طبیعی بین میزان تولید ROS و فعالیت سازوکارهای از بین برنده ROS تعادل وجود دارد. ROS به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه مهم در چندین فرایند گیاهی ازجمله تحمل به تنش فلزات سنگین عمل می‌کند و موجب به‌هم‌خوردن این تعادل و در نتیجه تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. گیاهان از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیرآنزیمی برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو استفاده می‌کنند (Khanpour-Ardestani, 2015). تنش کادمیوم برهم‌کنش‌های مرتبط با ساختار سوم پروتئین‌ها را مختل می‌کند و باعث از بین رفتن عملکردهای مهم پروتئین‌ها می‌شود و از طریق مهار فعالیت آنزیم‌ها و غیرطبیعی شدن پروتئین بر متابولیسم گیاه تأثیر می‌گذارد (Khanpour-Ardestani, 2015؛ Sharma *et al*., 2020). NO قابلیت بازیابی و دفاع از غشاء سلولی را برای کاهش آسیب در سیستم غشاء سلولی دارد، به‌عنوان‌مثال، به‌حداقل‌رساندن نفوذپذیری غشاء و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء، در نتیجه از نشت الکترولیت جلوگیری می‌کند. این تجمع ROS در گیاهان توسط انواع آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی حذف می‌شود و در گیاهان رشد کرده در غلظت سمی افزایش می‌یابد؛ بنابراین، تحریک تولید آنتی‌اکسیدان ممکن است نشان دهد که NO می‌تواند غشاءهای سلولی را تثبیت کند، با آسیب‌های اکسیداتیو مقابله کند و از کلم (*Brassica oleracea* L.) در برابر شرایط تنش‌زا محافظت نماید. در گیاهان مجموعه‌ای از ترکیب‌های غیرآنزیمی مانند اسیدهای آمینه آزاد، پروتئین‌های محلول، فلاونوئیدها و فنولیک‌ها را تولید می‌کنند که تحمل در برابر سمّیت فلزات را بهبود می‌بخشد. برای مثال تیمار کادمیوم در کلم باعث افزایش میزان پرولین، ترکیب های فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین و پروتئین های محلول شد (Kamalvand *et al*., 2022). در این پژوهش تنش کادمیوم باعث افزایش میزان پروتئین محلول مریم‌گلی ترکه‌ای نسبت به شاهد شد. تیمار سدیم نیتروپروساید باعث افزایش بیشتر پروتئین‌های محلول در سطوح مختلف کادمیوم شد که این نتایج با پژوهش Gerami و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت داشت.

نتایج این تحقیق نشان داد که کادمیوم به‌عنوان یک عامل تنش‌زا باعث افزایش ترکیب‌های بیوشیمیایی مانند پرولین، فنول کل، فلاونوئید کل و کربوهیدرات محلول می‌شود و بر فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه تأثیر می‌گذارد. این یافته‌ها با نتایج بسیاری از تحقیقات انجام شده در رابطه با اثر کادمیوم

بر ترکیب‌های بیوشیمیایی و افزایش آنها در گونه‌های گیاهی مطابقت دارد (Khanpour-Ardestani, 2015؛ Barghi *et al*., 2021؛ Mousavi & Razavizadeh, 2021؛ Baniasadi *et al*., 2021). تأثیر کادمیومی بر مهار رشد توسط انباشته‌شدن فلزات سنگین در محیط ریشه به‌دلیل کاهش جذب آب و مواد غذایی، کاهش انتقال آب و برهم‌خوردن تعادل آب، مهار فعالیت آنزیم‌ها، کاهش متابولیسم سلولی، کاهش فتوسنتز، تنفس و تعرق، فقدان نیتروژن و فسفر است. گیاه در شرایط تنش فلزات سنگین، بیشتر مواد فتوسنتزی خود را صرف تولید ترکیب‌های تنظیم اسمزی ازجمله پرولین، گلیسین بتائین و ترکیب‌های قندی می‌کند تا بتواند شرایط لازم را برای ادامه حیات در این شرایط فراهم کند (Asghari *et al*., 2020). تنش فلزات سنگین سبب تجمع پرولین در گیاهان می‌شود. مقدار افزایش پرولین در شرایط تنش برای بسیاری از گونه‌های گیاهی، بستگی به میزان مقاومت آنها در برابر تنش دارد و در گیاهان مقاوم، غلظت پرولین بیشتر از گیاهان حساس است. تیمار کادمیوم باعث افزایش معنی‌دار پرولین در گیاه مریم‌گلی ترکه‌ای شد که با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان همخوانی دارد (Khanpour-Ardestani, 2015؛ Heidari *et al*., 2021). تیمار سدیم نیتروپروساید باعث افزایش بیشتر پرولین در تمام سطوح کادمیوم در مریم‌گلی ترکه‌ای شد که به‌نوعی باعث تحریک سیستم دفاعی این گیاه در برابر این تنش و افزایش مقاومت آن گردید (Baniasadi *et al*., 2021).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که براساس نتایج این مطالعه، تنش کادمیوم به‌طور قابل توجهی بر وزن گیاهچه، میزان رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، فلاونوئید، فنل کل، کربوهیدرات محلول، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پرولین و پروتئین در گیاهچه مریم‌گلی ترکه‌ای تأثیر می‌گذارد. نتایج این تحقیق شواهدی ارائه کرد که سدیم نیتروپروساید به‌طور مؤثر در بهبود صفات مورد مطالعه نقش مؤثری داشت؛ بااین‌حال، این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از سدیم نیتروپروساید در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میکرومولار ممکن است به‌جای بهبود وضعیت گیاه، باعث تضعیف رشد و تولید گیاه شود. در کل، نتایج این پژوهش بیان‌کننده این است که استفاده از سدیم نیتروپروساید به‌عنوان یک تولید کننده نیتریک اکسید در گیاه مریم‌گلی ترکه‌ای تحت تنش کادمیوم، باعث بهبود برخی از ویژگی‌های این گیاه می‌شود. به‌عنوان مثال، استفاده از سدیم نیتروپروساید منجر به افزایش تولید فنول و کربوهیدرات محلول، کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش سطح پروتئین و پرولین در گیاه می‌گردد. این نتایج می‌تواند با توجه به توسعه روش‌های بهبود وضعیت گیاهان در شرایط تنش کادمیوم کمک کند. بااین‌حال، برای استفاده بهینه از سدیم نیتروپروساید در گیاهان تحت تنش کادمیوم، نیاز به بررسی دقیق‌تر تأثیر مقادیر مختلف سدیم نیتروپروساید در شرایط مختلف محیطی و غلظت‌های متفاوت آن در برخی گونه‌های دیگر گیاهی وجود دارد.

References

- Amari, T., Ghnaya, T. and Abdelly, C., 2017. Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. South African Journal of Botany, 111: 99-110.
- Amini, F. and Balouchi, H., 2017. The effect of heavy metals and different combination of planting beds on antioxidant enzymes in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadri). Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 30(3): 498-511.
- Amirmoradi, Sh., Rezvani Moghaddam, P., Koocheki, A., Danesh, Sh. and Fotovat, A., 2016. Study of sage (*Salvia officinalis* L.) cultivation in condition of using irrigated water polluted by cadmium and lead, Journal of Water and Soil, 29(5): 1360-1375.
- Asghari, M., Masoumi Zavariyan, A. and Yousefi Rad, M., 2020. Investigating the effect of sodium nitroprusside in reducing cadmium toxicity in basil (*Ocimum basilicum* L.) plant. Environmental Stresses in Crop Sciences, 13(3): 1009-1018.
- Azizi, I., Esmaielpour, B. and Fatemi, H., 2021. Exogenous nitric oxide on morphological, biochemical and antioxidant enzyme activity on savory (*Satureja Hortensis* L.) plants under

sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(5): 1485-1490.
- Gorgini Shabankareh, H. and Khorasani Nejad, S., 2017. The Effect of sodium nitroprusside on some physiological and biochemical characteristics of medicinal plant Marze (*Satureja khuzestanica*) under water deficit regimes. Journal of Plant Production Research, 24(3): 55-70. (In Persian)
- Guzel, K.S., Ulger, M. and Kahraman, A., 2021. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia virgata* mericarps. Botanica Serbica, 45(2): 223-231.
- Hamidi, H., Masoudian, N. and Saeedisar, S., 2017. Nitric oxide effect on proline, soluble sugars and activity of antioxidant enzymes in Pb stress terms in *Brassica napus* L. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 29(4): 775-782.
- Heydari, Z., Yavari, A., Jafari, L. and Mumivand, H., 2020. Study on the chemical diversity of essential oil from different plant parts of *Salvia sharifii* Rech. f. & Esfand. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 36(4): 627-641.
- Heidari, M., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sangtarash, M., 2021. Effect of salicylic acid on physiological and biochemical characteristics of *Melissa officinalis* L. under cadmium stress. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 34(3): 694-707.
- İnan, Y., Kurt-Celep, I., Akyüz, S., Barak, T.H., Celep, E. and Yesilada, E., 2021. An investigation on the enzyme inhibitory activities, phenolic profile and antioxidant potentials of *Salvia virgata* Jacq. South African Journal of Botany, 143: 350-358.
- Izadi, Z. and Mirazi, N., 2022. Effect of foliar application of sodium nitroprusside on some morphological, physiological and biochemical properties of marigold plant (*Calendula officinalis* L.) under different irrigation regimes. Journal of Plant Production Technology, 21(1): 1-17.
- Jafarhaddadian, E., Zoufan, P. and Shafiei, M., 2021. Effect of NaCl on Cd stress modulation, antioxidant system and Cd uptake and accumulation in *Malva parviflora* L. Iranian Journal of Plant Biology, 12(4): 59-76.
- Jafari, S., Daneshvar, M.H., Salehi Salmi, M.R. and Lotfi Jalal-Abadi, A., 2017. Influence of putrescine and thidiazuron on in vitro organogenesis in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 25(2): 201-211.
- Jamzad, Z. and Moein, F., 2017. The conservation status of *Salvia aristata*, a rare species of the genus *Salvia*. Iran Nature, 2(3): 92-95 (In Persian)
- Kamalvand, A.A., Hosseini Sarghein, S. and Karamian, R., 2022. Impact of cadmium stress on growth and physiological responses of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Journal of Plant Physiology and Breeding, 12(1): 51-65.
- Khanpour-Ardestani, N., 2015. Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cadmium stress. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 20(6): 417-423.
- Baharvandi, F., Feizian, M., Abdi, S. and Alinejadian, A., 2023. Effect of different feedstock and their biochars on the growth of peppermint (*Mentha piperita* L.) in cadmium-contaminated soil. Iranian Journal of Soil Research, 37(1): 33-49.
- Baniasadi, F., Arghavani, M., Saffari, V.R. and Mansouri, M., 2021. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity by studying some of morphophysiological and biochemical characteristics of cock's comb (*Celosia argentea var. plumosa*). plumosa. Iranian Journal of Horticultural Science, 52(3): 743-754.
- Barghi, A., Golipoori, A., Ghavidel, A. and Sedghi, M., 2021. Effect of plant growth promoting rhizobacteria, salicylic acid and brassinosteroid on physiological properties of Black Mustard in cadmium stress condition. Journal of Plant Production Research, 28(1): 153-168.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39(1): 205-207.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 114-123.
- Chen, W., Dong, Y., Hu, G. and Bai, X., 2018. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity and antioxidative system in *Perennial ryegrass*. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 18(1): 129-143.
- Danaee, E. and Abdossi, V., 2022. The effects of drought stress and sodium nitroprusside on growth indices and enzymatic activity of *Satureja hortensis*. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 35(2): 326-341.
- Dere, Ş., GÜNEŞ, T. and Sivaci, R., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and totalcarotenoid contents of some algae species using different solvents. Turkish Journal of Botany, 22(1): 13-18.
- Ebrahimi, M., Karimi, R. and Amerian, M., 2019. The effect of foliar application of nitric oxide in alleviating of salt stress in bidaneh sefid grapevine cultivar. Iranian Journal of Plant Biology, 11(1): 59-64.
- Ergul, M., Atas, M., Bal, H., Ucar, E., Eruygur, N., Senkal, B.C. and Uskutoglu, T., 2021. Pharmacological and biological features of ethanol extract of *Salvia virgata* Jacq. Medicine, 10(4): 1103-1109.
- Gerami, M., Ghorbani, A. and Karimi, S., 2018. Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Plant Biology, 10(1): 81-96.
- Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Björk, L. and Trajkovski, V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of

cell culture. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 27(5): 840-853.
- Mohsenzadeh, S. and Sheikhpour Jalaly, M., 2019. Effect of nanoabsorbent on removal of cadmium heavy metal from water and study of maize growth. Journal of Environmental Science Studies, 4(4): 2037-2045.
- Mousavi, N. and Razavizadeh, R., 2021. Evaluation of changes in phenolic compounds and secondary metabolites of calluses and seedlings of *Mellissa officinalis* L. under cadmium heavy metal stress. Journal of Plant Process and Function, 10(41): 17-34.
- Nabaei, M. and Amooaghaie, R., 2019. Nitric oxide is involved in the regulation of melatonin-induced antioxidant responses in *Catharanthus roseus* roots under cadmium stress. Botany, 97(12): 681-690.
- Narimani, R., Moghaddam, M. and Shokouhi, D., 2017. The effect of different concentrations of sodium nitroprusside in alleviating oxidative damages caused by water stress of polyethylene glycol in medicinal plant of *Catmint hairless* under in vitro condition. Journal of Plant Productions, 40(3): 77-88.
- Ourmazd, P. and Chalabian, F., 2006. Tissue culture and organogenesis of *Salvia nemorosa*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14(2): 69-79. (In Persian)
- Paquin, R. and Lechasseur, P., 1979. Observations surune méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. Canadian Journal of Botany, 57(18): 1851-1854.
- Samiei, L., Pahnehkolayi, M.D., Karimian, Z. and Nabati, J., 2020. Morpho-Physiological responses of halophyte *Climacoptera crassa* to salinity and heavy metal stresses in in vitro condition. South African Journal of Botany, 131: 468-474.
- Şenkal, B.C., Uskutoğlu, T., Cesur, C., Özavci, V. and Doğan, H., 2019. Determination of essential oil components, mineral matter, and heavy metal content of *Salvia virgata* Jacq. grown in culture conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 43(4): 395-404.
- Sharma, A., Soares, C., Sousa, B., Martins, M., Kumar, V., Shahzad, B., Sidhu, G., Bali, A., Asgher, M., Bhardwaj, R., Thukral, A., Fidalgo, F. and Zheng, B., 2020. Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects. Physiologia Plantarum, 168(2): 318-344.
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y. and Li, X., 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in *Anhui, China*. Molecules, 16(4): 3444-3455.
- Yilar, M., Kadiouglu, İ. and Telci, İ. 2017. Essential Oils' Compositions of *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia candidissima* subsp. candidissima Vahl. Growing in Natural Habitats of Tokat Province. Turkish Journal of Weed Science, 20(1): 70-77.
- Zulfiqar, U., Ayub, A., Hussain, S., Waraich, E.A., El-Esawi, M.A., Ishfaq, M., Ahmad, M., Ali, N. and Maqsood, M.F., 2022. Cadmium toxicity in plants: Recent progress on morpho-physiological effects and remediation strategies. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 22(1): 212-269.