



اثر نانوذره کیتوزان بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم

Effect of chitosan nanoparticles on morpho-physiological and biochemical characteristics of lemon balm plants under cadmium stress

مبینا محمودیان^۱، مهیار گرامی^{۲*}، هانیه عابدین پور^۳، رقیه اصغرزاده^۳

Mobina Mahmoudian¹, Mahyar Gerami^{2*}, Hanieh Abedinpour³, Roghiyeh

Asgharzadeh³

۱- کارشناسی ارشد باغبانی (گیاهان دارویی)، ۲- دانشیار گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی سنا، ساری، ایران. ۳-

گروه ژنتیک و به نژادی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران،

1. MSc. of Horticultural Science (Medicinal Plant), 2. Associated Professor, Department of Plant Biology, Sana Institute of Higher Education, Sari, Iran.

3. Department of Genetic and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *

mahyar.gerami@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۸/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۱ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۰/۲۷)

Received: 2025/11/20 | Accepted: 2026/01/11 | Published: 2026/01/17

چکیده

Abstract

Industrialization and excessive application of chemical fertilizers have led to widespread contamination of agricultural soils with heavy metals such as cadmium. Lemon balm (*Melissa officinalis*), a medicinal plant, is also susceptible to cadmium pollution. Chitosan nanoparticles, due to their high biological properties, are able to improve plant tolerance to environmental stresses, including cadmium stress. Therefore, this study aimed to investigate the effect of chitosan nanoparticles on the morpho-physiological and biochemical characteristics of lemon balm plants under cadmium stress. The experiment was arranged as a factorial based on a completely randomized design with three replications, including four levels of cadmium (0, 50, 100, and 200 ppm) and four levels of chitosan nanoparticles (0, 0.2, 0.4, and 0.8 g L⁻¹). The results showed that both cadmium and chitosan nanoparticles had significant effects on the studied traits. Application of chitosan nanoparticles significantly increased shoot length, leaf number, chlorophyll (SPAD) index, number of lateral buds, and root length, whereas higher concentrations of cadmium reduced these traits. In addition, chitosan nanoparticles treatment increased phenolic and flavonoid contents in response to cadmium stress. The highest phenolic content (26.4 mg gallic acid/g) and flavonoid content (35.05 mg quercetin/g) were observed in the combined treatment of 0.8 g L⁻¹ chitosan nanoparticles and 200 ppm cadmium. Furthermore, increasing cadmium concentration led to higher malondialdehyde (MDA) levels, while treatments of chitosan nanoparticle showed a relative reduction in this trait. These results suggest that chitosan nanoparticles can mitigate the adverse effects of cadmium stress and enhance the growth and physiological characteristics of lemon balm under stress conditions.

Keywords: Cadmium, Chitosan nanoparticle, Heavy metal stress, Lemon Balm

رفرانس دهی این مقاله Citation

Mahmoudian M, Gerami M, Abedinpour H, Asgharzadeh R. Effect of chitosan nanoparticles on morpho-physiological and biochemical characteristics of lemon balm plants under cadmium stress. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (1): 120-132. Doi: [10.61882/gebsj.14.1.10](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.1.10)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-511-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 14, Number 1, 2025

خلاصه

صنعتی شدن و مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی موجب آلودگی گسترده خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین از جمله کادمیوم (Cd) شده است. گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) نیز در معرض این آلاینده قرار دارد. نانوذرات کیتوزان (CNPs) به دلیل خواص زیستی مطلوب توانایی بهبود تحمل گیاهان در برابر تنش‌های محیطی از جمله تنش کادمیوم را دارند. بر این اساس، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نانوذره کیتوزان بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه تحت تنش کادمیوم انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و شامل چهار سطح کادمیوم (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm) و چهار سطح نانوذره کیتوزان (۰، ۲/۰، ۴/۰ و ۸/۰ گرم بر لیتر) اجرا گردید. نتایج نشان داد که نانوذره کیتوزان و کادمیوم تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر صفات مورد بررسی داشت. نانوذره کیتوزان به طور معناداری موجب افزایش طول اندام هوایی، تعداد برگ، شاخص سبزی‌نگی، تعداد جوانه جانبی و طول ریشه شد، در حالی که غلظت‌های بالای کادمیوم موجب کاهش این صفات شد. همچنین، نانوذره کیتوزان موجب افزایش محتوای فنل و فلاونوئید در شرایط تنش شد و بالاترین محتوای فنل (۲۶/۴ میلی گرم اسید گالیک در گرم) و فلاونوئید (۳۵/۰۵ میلی گرم کوئرستین در گرم) در تیمار ترکیبی ۸/۰ گرم بر لیتر نانوذره کیتوزان و ۲۰۰ پی‌پی‌ام کادمیوم مشاهده شد. افزایش غلظت کادمیوم موجب افزایش مالون دی آلدئید و تیمارهای دارای نانوذره کیتوزان کاهش نسبی در این شاخص نشان دادند. در مجموع، نتایج حاکی از آن است که نانوذرات کیتوزان می‌تواند با کاهش اثرات منفی کادمیوم، صفات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه بادرنجبویه را تحت تنش بهبود بخشند.

کلمات کلیدی: بادرنجبویه، تنش فلزات سنگین، کادمیوم، نانوذره کیتوزان

Introduction

مقدمه

صنعتی شدن جهانی و استفاده بیش از حد از کودها منجر به آلودگی در مقیاس وسیع خاک‌های کشاورزی شده است که تهدیدی جدی برای انسان و همچنین اکوسیستم است (Zhai et al., 2018). بیش از ۱۰ میلیون هکتار اراضی آلوده در سراسر جهان وجود دارد که تقریباً ۵۰ درصد آن‌ها تحت تأثیر فلزات سنگین قرار دارند (Khalid et al., 2017). کادمیوم یکی از سمی‌ترین آلاینده‌ها است که یک نگرانی خطرناک در سراسر جهان محسوب می‌شود (Shah et al., 2021). در گیاهان، کادمیوم پس از جذب توسط ریشه به اندام‌های هوایی منتقل شده که باعث ایجاد اثرات نامطلوب مانند کمبود مواد مغذی در گیاهان، توقف تشکیل کلروفیل، کاهش فتوسنتز، اختلال در فعالیت آنزیم‌های مربوط به چرخه کالوین (Ahmad et al., 2020)، مهار روزنه با اختلال در تعادل آبی گیاه، تحریک تنش اکسیداتیو با تغییر در متابولیسم گیاه، جلوگیری از رشد محصول توسط ناهنجاری متابولیکی و در نهایت محدود کردن رشد گیاه می‌گردد (Ahmad et al., 2021). علاوه بر این، رسوب کادمیوم در بدن انسان از طریق زنجیره غذایی، مشکلات شدید سلامتی مانند نرخ بالای سرطان (پروستات و ریه) و ناهنجاری استخوان را به همراه دارد (Hamid et al., 2019). بنابراین، غلبه بر سمیت کادمیوم و کاهش رسوب و انتقال کادمیوم در گیاهان برای رشد استاندارد گیاهان و سلامت انسان بسیار مهم است.

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. گیاهی چند ساله از خانواده Lamiaceae است که به طور گسترده در سراسر جهان کشت می‌شود (Meftahizade et al., 2010). این گیاه بومی نواحی شرقی مدیترانه، آسیای غربی و ایران است اما امروزه در ناحیه مرکزی اروپا نیز رشد می‌کند. بادرنجبویه گیاهی است که به راحتی رشد می‌کند و در خاک‌ها و شرایط آب و هوایی متنوع قابل کشت است. روغن استخراج شده از گیاه بادرنجبویه فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد افسردگی و ضد اسپاسم گسترده‌ای را نشان می‌دهد (Khalilouki et al., 2019).

(Sari & Ceylan, 2002; 2020). برگ‌های آن حاوی فلاونوئیدها، ترکیبات فرار مفید، تری‌ترین‌ها و پلی‌فنول‌ها است. ترکیب و ارزش درمانی گیاه بادرنبویه به شدت به شیوه‌های کشت در مزرعه و فصل برداشت بستگی دارد (Sharafzadeh *et al.*, 2011). علاوه بر این، بستر کشت از جمله سطوح فلزات سنگین باید به دقت کنترل شود. با توجه به خطر افزایش عناصر سنگین در خاک‌های کشاورزی، بادرنبویه نیز مانند سایر گیاهان دارویی در معرض عناصر سنگین قرار دارد. در همین راستا، پینتو و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که گیاه بادرنبویه می‌تواند غلظت بالای از عنصر کادمیوم را ذخیره نماید. همچنین، آدامسیک-زابل و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که کادمیوم در غلظت‌های بالا موجب کاهش شاخص‌های کلروفیل و تبادل گازی در بادرنبویه شدند. افزون بر این، رضوی‌نیا و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که افزایش غلظت کادمیوم باعث کاهش صفات رشد و فیزیولوژیکی و افزایش مالون‌دی‌آلدئید، پرولین و درصد اسانس در بادرنبویه می‌شود.

نانوتکنولوژی فرآیندی برای تولید، دستکاری و استقرار نانومواد در یک سیستم است (Baruah & Dutta, 2009). این تکنولوژی به دلیل کارکردهای فراوان در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی، به یک حوزه رو به رشد مهم تبدیل شده است (Del Buono *et al.*, 2021). نانومواد به عنوان جایگزین‌های سازگار با محیط زیست برای جاذب‌های سنتی برای کاهش اثرات مضر فلزات سنگین بر رشد گیاهان شناخته می‌شوند (Prasad *et al.*, 2021). نانوذرات مواد آلی، معدنی یا هیبریدی کوچک با ذرات کوچک (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) هستند که خواص بهتری نسبت به مواد حجیم و بزرگتر دارند. سطح تماس بالا و حجم کم آن زمینه بسیار خوبی را برای کاربردهای مختلف آن فراهم می‌کند (Khan *et al.*, 2019). تعداد زیادی نانوذره با منشأ متنوع وجود دارد که می‌تواند در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد (Al-Asmar *et al.*, 2019; Rajput *et al.*, 2020). کیتوزان یک پلی‌ساکارید طبیعی است که از N-deacetylation کیتین بدست می‌آید و جزء اصلی پوسته سخت پوستانی مانند خرچنگ و میگو می‌باشد (Orgaz *et al.*, 2011). کیتوزان و مشتقات آن غیرسمی، غیرحساسیت زاء، مقرون به صرفه، زیست تخریب پذیر و سازگار با محیط زیست است که در صنایع کشاورزی، زیست پزشکی و غذا استفاده می‌شود (Al-Dhabaan *et al.*, 2018; Arif *et al.*, 2021; Chandkrachang, 2002). نانوذرات کیتوزان به دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح تماس بالا از کیتوزان معمولی مؤثرتر هستند (Hassan *et al.*, 2021). آن‌ها فعالیت متابولیک گیاه را افزایش می‌دهند و مواد شیمیایی فعال را به طور مؤثرتر در غشای سلولی انتقال می‌دهند (Bandara *et al.*, 2020). همچنین مطالعات مختلف گزارش کرده‌اند که نانوذره کیتوزان تحمل گیاه را نسبت به تنش‌های مختلف از جمله کادمیوم (Faizan, Rajput, *et al.*, 2021; Panahirad *et al.*, 2023)، شوری (Alenazi *et al.*, 2024) و خشکی (Attaran Dowom *et al.*, 2022) افزایش داده است. در همین راستا، دلیما و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که کاربرد کیتوزان در گیاه *Talinum patens* تحت تنش کادمیوم می‌تواند سمیت این عنصر را کاهش داده و از طریق بهبود رشد ریشه، سطح جذب را افزایش دهد. با وجود مطالعات انجام شده در زمینه استفاده از نانوذره کیتوزان برای بهبود تحمل تنش در گیاهان، اطلاعات محدودی درباره اثر آن بر گیاهان دارویی، به‌ویژه بادرنبویه، تحت تنش کادمیوم وجود دارد. از آنجا که تجمع فلزات سنگین می‌تواند کیفیت و ایمنی گیاهان دارویی را تحت تأثیر قرار دهد، بررسی راهکارهای مؤثر برای کاهش اثرات این تنش ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی اثر نانوذره کیتوزان بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنبویه تحت تنش کادمیوم می‌باشد.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

نوع طرح آزمایشی و معرفی تیمارها: این پژوهش در بهار ۱۴۰۳ در گلخانه تحقیقاتی موسسه آموزش عالی سنا ساری به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل کادمیوم در چهار سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ پی پی ام (Yaghoobian *et al.*, 2016) و فاکتور دوم نانوذره کیتوزان در چهار سطح ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۸ گرم بر لیتر بود. نانوذرات کیتوزان مورد استفاده در این پژوهش با اندازه متوسط حدود ۵۰ نانومتر با خلوص ۹۹ درصد از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان (ایران) تهیه شدند.

آماده سازی بستر کاشت: بذرهای گیاه بادرنجبویه از شرکت پاکان بذر تهیه شد و در گلدان‌هایی با ابعاد 11×13 سانتی‌متر حاوی مخلوط پرلیت و پیت ماس به نسبت ۱:۱ در عمق ۱ سانتی‌متری کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شرایط رطوبتی ۷۰-۸۰ درصد قرار داده شدند. گیاهچه‌های بادرنجبویه هفته‌ای یک بار با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند (Hoagland & Snyder, 1933). قبل از اعمال تنش کادمیوم در گلدان‌ها تنک انجام شد و در هر گلدان ۳ بوته باقی ماند (Heidari *et al.*, 2021).

نحوه اعمال تیمارها: زمانی که گیاهان بادرنجبویه به مرحله ۶ برگگی رسیدند، تیمار کادمیوم در دو نوبت و از زیر گلدان اضافه گردید تا از طریق ریشه آب به داخل خاک کشیده شود. ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار کادمیوم، نانوذره کیتوزان به صورت محلول‌پاشی بر گیاهان بادرنجبویه اعمال گردید. نانو ذره کیتوزان به قدری اسپری شد که سطح برگ گیاه را کاملاً خیس کند. گیاهان بعد از گذشت سه هفته از اعمال تیمار (هفته‌ای یکبار محلول پاشی) برداشت شده و صفات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها مورد سنجش قرار گرفت.

تصویربرداری نمونه‌های گیاهی با میکروسکوپ الکترونی روبشی: برای بررسی مورفولوژی سطح برگ‌ها، نمونه‌های برگ تیمار شده و تیمار نشده پس از برداشت، با آب مقطر شست‌وشو داده شده و سپس در دمای اتاق و در شرایط سایه به‌طور کامل خشک شدند. جهت تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی (SEM) به مرکز پژوهش‌های متالوژی رازی (ایران) ارسال شدند.

اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه: پس از هر مرحله برداشت نمونه‌ها، طول ریشه از ناحیه‌ی طوقه تا نوک ریشه و طول اندام هوایی از ناحیه‌ی طوقه تا نوک جوانه انتهایی با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سبزینگی گیاه (شاخص SPAD): شاخص SPAD با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری کلروفیل SPAD (مدل SPAD-502؛ شرکت Konica Minolta Sensing، ساکای، اوساکا، ژاپن) محاسبه شد. برای این منظور تعداد ۴ برگ از هر بوته در ساعت ۹ تا ۱۱ صبح قرائت انجام گرفت.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی: جهت سنجش مقدار فنل کل، نمونه‌های برگ (0.1 گرم) با استفاده از اتانول (5 میلی‌لیتر، 95%) به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی استخراج شدند. پس از سانتریفیوژ کردن عصاره‌ها، فاز رویی (1 میلی‌لیتر) با اتانول (1 میلی‌لیتر، 95%) و آب مقطر (3 میلی‌لیتر) مخلوط شدند. سپس محلول فولین-سیوکالتیو (0.5 میلی‌لیتر، 50%) و بی‌کربنات سدیم (1 میلی‌لیتر، 5%) به مخلوط اضافه شد و این مخلوط به مدت ۱ ساعت در تاریکی انکوبه گردید. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 725 نانومتر اندازه‌گیری شد و مقدار فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک تعیین گردید (Xu *et al.*, 2010). مقدار فنل بر حسب معادل اسیدگالیک (میلی گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم عصاره وزن تر بیان شد).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید: میزان فلاونوئید طبق روش مارینوا و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. یک میلی‌لیتر از عصاره اتانولی به 300 میکرولیتر نیترات سدیم (NaNO_3) اضافه شد و مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، 300 میکرولیتر کلرید آلومینیوم (AlCl_3) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه، 2 میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (NaOH) با غلظت 1 مولار به مخلوط افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. حجم نهایی مخلوط با استفاده از آب مقطر به 10 میلی‌لیتر رسانده شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 510 نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت بر حسب معادل کوئرستین، میلی گرم معادل کوئرستین در هر گرم عصاره وزن تر بیان شد.

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA): اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (TBAT) با سنجش میزان MDA طبق روش فایزان و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد. برگ‌های تازه در محلول 0.1% اسید تریکلرو استیک (TCA) هموزن

شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتیفریوژ شدند. سپس محلول ۲۰٪ TCA همراه با ۰/۰۵٪ اسید تیوباربیتوریک به مخلوط واکنش اضافه شد. مخلوط نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد گرم شد. پس از سرد شدن، مخلوط دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰ دور و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتیفریوژ شد. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۳۲ نانومتر ثبت شد. میزان مالوندی آلدئید (MDA) با استفاده از ضریب خاموشی مولی ۱۵۵ میلی مولار بر سانتی متر محاسبه شده و نتایج به صورت میلی مولار MDA در گرم وزن تر گزارش شدند.

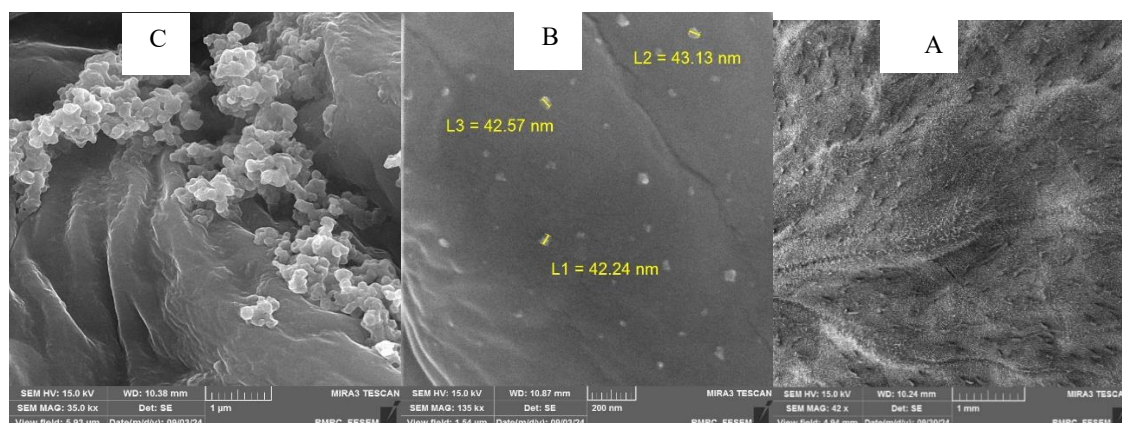
تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس دوطرفه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $P \leq 0.05$ مقایسه شدند.

Results and Discussion

نتایج و بحث

نتایج بررسی میکروسکوپی

نتایج بررسی میکروسکوپی الکترونی در شکل ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که ذرات نانوذره کیتوزان به طور مؤثر روی سطح برگ مستقر شده و اندازه‌ای در حدود 42.24 ± 4.44 نانومتر داشتند. این نتایج بیانگر توزیع یکنواخت و اندازه مناسب نانوذره در سطح برگ دارد که می‌تواند به بهبود جذب و افزایش کارایی اثرات نانوذرات در گیاه منجر شود و در نتیجه تقویت پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه از جمله افزایش کارایی جذب مواد مؤثر و بهبود مکانیسم‌های دفاعی گیاه بادرنجبویه در شرایط تنش شود.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی A- گیاه شاهد B و C- گیاهان تیمار شده با نانوذره کیتوزان

Figure 1. Electron microscope image A- Control B and C- Plants treated with chitosan nanoparticles

نتایج تجزیه و تحلیل صفات مورفوفیزیولوژیکی

نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر صفات مورفوفیزیولوژیکی مورد مطالعه (طول اندام هوایی، تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی، شاخص سبزی‌نگی و طول ریشه) در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل تیمارهای نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر صفت سبزی‌نگی گیاه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی بر خصوصیات طول اندام هوایی، تعداد برگ، تعداد جوانه جانبی و طول ریشه در گیاه بادرنجبویه معنی‌دار نبود (جدول ۱).

این نتایج نشان داد که هر یک از این عوامل به صورت مستقل تأثیر قابل توجهی دارند، اما تأثیرات همزمان آن‌ها در اغلب موارد از نظر آماری معنادار نبود.

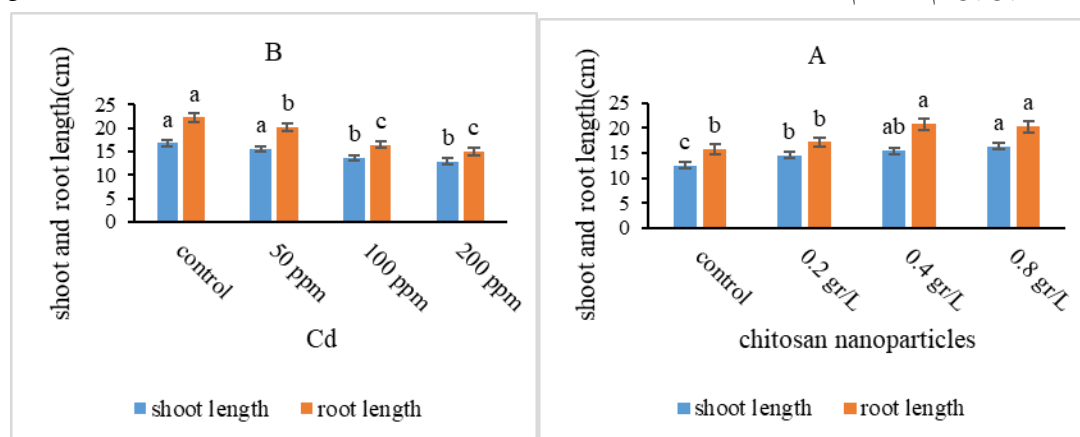
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نانوذره کیتوزان بر برخی از صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه بادرنجبویه در شرایط تنش کادمیوم. *, ** و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج درصد، یک درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند.

Table 1. Analysis of variance of the effect of chitosan nanoparticles on some morphological characteristics of lemon balm plants under cadmium stress conditions. *, ** and ns indicate significance at the 5% level, 1% level, and non-significance, respectively.

SPAD index	Root length	Number of lateral buds	Number of leaves	Shoot length	df	source
57.67**	69.85**	23.5**	47.08**	33.23**	3	Chitosan
44.28**	134.09**	36.56**	40.02**	37.95**	3	Cadmium
6.29*	2 ^{ns}	1.02 ^{ns}	3.39 ^{ns}	0.84 ^{ns}	9	Cadmium*Chitosan
2.28	3.93	2.67	3.63	2.57	32	Error
6.57	10.72	22.79	13.19	10.89		CV

صفات مورفولوژیکی: مقایسه میانگین اثر ساده نانوذره کیتوزان و اثر ساده کادمیوم بر برخی از خصوصیات مورفولوژیکی گیاه بادرنجبویه نشان داد که طول اندام هوایی گیاه با افزایش غلظت نانوذره کیتوزان افزایش یافت به طوری که بیشترین طول اندام هوایی برای نانوذره کیتوزان با غلظت ۰/۸ گرم بر لیتر (۱۶/۳۸ سانتی‌متر) و کمترین مقدار برای نمونه شاهد (۱۲/۵۰ سانتی‌متر) مشاهده شد که نسبت به شاهد حدود ۳۱/۰۴ درصد افزایش یافته بود. همچنین، با افزایش غلظت‌های مختلف کادمیوم، طول اندام هوایی روند کاهشی را نشان داد به گونه‌ای که کمترین مقدار آن، به غلظت ۲۰۰ پی پی ام اختصاص داشت (شکل ۲).

نتایج مقایسه میانگین اثر ساده نانوذره کیتوزان بر طول ریشه گیاه بادرنجبویه نشان داد که بیشترین طول ریشه مربوط به تیمارهای نانوذره کیتوزان ۰/۴ و ۰/۸ گرم بر لیتر به ترتیب ۲۰/۷۵ و ۲۰/۲۵ میلی‌متر بوده است. همچنین، اثر ساده کادمیوم بر صفت طول ریشه نشان داد که تنش کادمیوم تأثیر منفی بر طول ریشه داشته است و با افزایش غلظت کادمیوم طول ریشه کمتر شده است و کمترین طول ریشه برای تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام کادمیوم ثبت شد که نسبت به شاهد به ترتیب ۲۵/۸۴ و ۳۲/۷۶ درصد کاهش یافته بودند (شکل ۲).

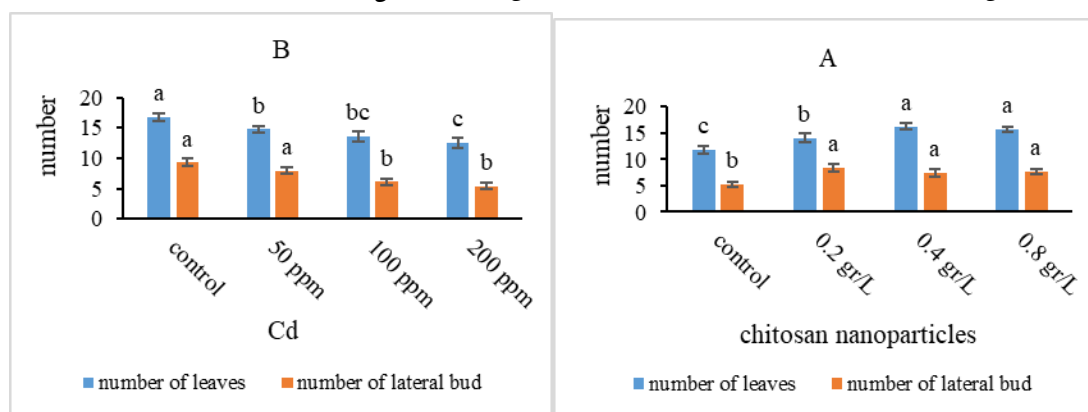


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر ساده نانوذره کیتوزان (A) و اثر ساده کادمیوم (B) بر مقدار طول اندام هوایی و ریشه گیاه بادرنجبویه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Figure 2. Mean comparison of simple effect of chitosan nanoparticles (a) and the simple effect of cadmium (b) on the shoot and root length of lemon balm plants. Similar letters indicate no significant difference.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تعداد برگ این گیاه با افزایش غلظت نانوذره کیتوزان افزایش پیدا کرد و بیشترین تعداد برگ در دو غلظت ۰/۴ و ۰/۸ گرم بر لیتر به ترتیب ۱۵/۶۷ و ۱۶/۲۵ عدد بوده است. همچنین در تیمار کادمیوم مشاهده شد که با افزایش غلظت کادمیوم تعداد برگ کاهش یافت و کمترین تعداد برگ در غلظت ۲۰۰ پی پی ام حدود ۱۲/۵۸ بوده است (شکل ۳). نتایج مقایسه میانگین اثر ساده نانوذره

کیتوزان بر صفت تعداد جوانه‌های جانبی نشان داد که تیمار نانوذره کیتوزان باعث افزایش تعداد جوانه‌های جانبی شده است به طوری که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. ولی بین غلظت‌های به کار رفته از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین، نتایج مقایسه میانگین اثر ساده کادمیوم بر تعداد جوانه‌های جانبی حاکی از آن بود که تیمار کادمیوم باعث کاهش تعداد جوانه‌های جانبی شده است به طوری که با افزایش غلظت کادمیوم تعداد جوانه‌های جانبی کاهش یافت و تیمار ۲۰۰ پی پی ام کادمیوم کمترین تعداد جوانه جانبی را با (۵/۴۲) به خود اختصاص داد که نسبت به نمونه شاهد ۴/۱ درصد کاهش داشت (شکل ۳).



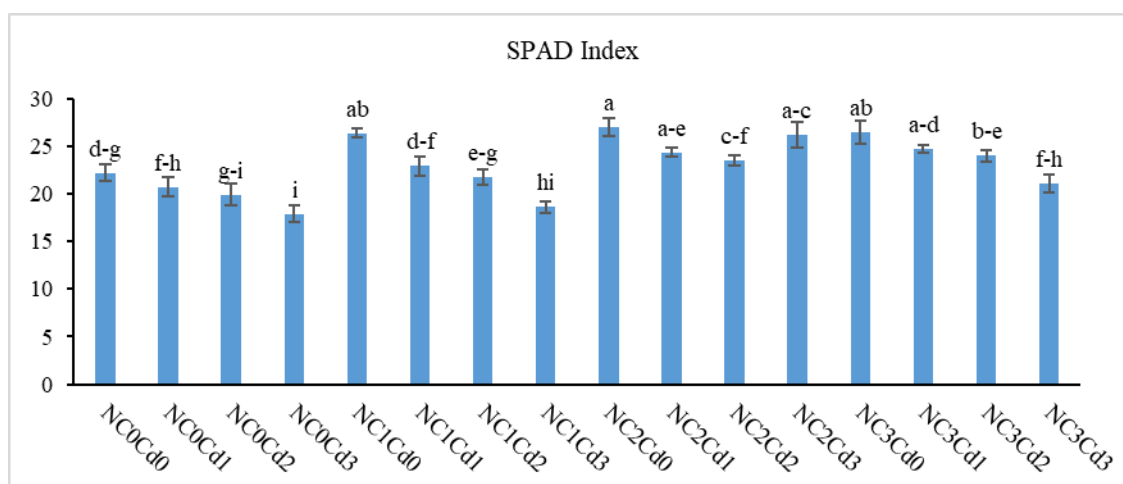
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ساده نانوذره کیتوزان (A) و اثر ساده کادمیوم (B) بر تعداد برگ و تعداد جوانه جانبی گیاه بادرنجبویه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Figure 3. Mean comparison of simple effect of chitosan nanoparticles (a) and the simple effect of cadmium (b) on the number of leaves and lateral bud of lemon balm. Similar letters indicate no significant difference.

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که تنش کادمیوم تأثیر منفی و معنی‌داری بر صفات مورفولوژیکی گیاه بادرنجبویه داشت، به‌طوری‌که با افزایش غلظت کادمیوم، طول اندام هوایی، طول ریشه، تعداد برگ و تعداد جوانه‌های جانبی به‌طور قابل توجهی کاهش یافت که تأییدکننده سمیت این عنصر سنگین برای گیاه بادرنجبویه است. در مقابل، کاربرد نانوذره کیتوزان باعث بهبود این صفات شد و بیشترین مقادیر در غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۸ گرم بر لیتر مشاهده گردید. این نتایج نشان‌دهنده نقش مثبت نانوذره کیتوزان در کاهش اثرات تنش کادمیوم و بهبود رشد گیاه است. کاهش صفات رشدی در اثر تنش کادمیوم با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد. گزارش شده است که سمیت کادمیوم باعث کاهش تقسیم سلولی و کشش سلولی می‌شود که در نهایت رشد و توسعه گیاه را محدود می‌کند (Shakirova *et al.*, 2016). همچنین، در مطالعه‌ای توسط گرامی و همکاران (۲۰۱۸)، کاهش ارتفاع گیاه و طول ریشه در گیاه مریم گلی تحت تنش کادمیوم نیز گزارش شده است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در مقابل، اثرات مثبت نانوذره کیتوزان بر بهبود رشد گیاه در این مطالعه با یافته‌های مطالعات دیگر همسو است. مطالعات زیادی گزارش کرده‌اند که نانومواد با افزایش جذب مواد مغذی و آب، رشد گیاه را بهبود می‌بخشند (ur Rahman *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2023). در گیاه کلزا نشان داده شده است که کاربرد کیتوزان باعث بهبود صفات رشدی شده است (Zong, Liu, *et al.*, 2017). همچنین در مطالعه‌ای دیگر تأثیر مثبت کیتوزان بر افزایش ارتفاع گیاه، طول ریشه و تعداد برگ در گیاه استویا تحت تنش شوری گزارش شده است (Majidian *et al.*, 2020). به‌طور کلی، می‌توان بیان کرد که اثرات منفی کادمیوم بر رشد گیاه احتمالاً ناشی از اختلال در جذب عناصر غذایی و مهار فرآیندهای فیزیولوژیکی است. در مقابل، نانوذره کیتوزان احتمالاً از طریق بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش دسترسی به عناصر غذایی و تحریک فعالیت‌های متابولیکی، موجب کاهش اثرات تنش و بهبود رشد گیاه بادرنجبویه شده است.

سبزی‌نگی برگ (شاخص SPAD): نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای کادمیوم و نانوذره کیتوزان بر صفات سبزی‌نگی برگ نشان داد که بیشترین مقدار سبزی‌نگی برگ گیاه بادرنجبویه مربوط به تیمارهای نانوذره کیتوزان با غلظت صفر کادمیوم (NC3Cd0 و NC2Cd0، NC1Cd0) بوده است و کمترین مقدار سبزی‌نگی برگ هم مربوط به تیمارهای NC1Cd3 و NC0Cd3 بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش

غلظت نانوذره کیتوزان باعث بهبود سبزی‌نگی و افزایش غلظت کادمیوم باعث کاهش سبزی‌نگی شده است (شکل ۴). کادمیوم تمایل دارد به‌طور گسترده‌ای درون اندامک‌ها تجمع یابد و باعث آسیب به کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها شود. این اختلال در سیستم فتوسنتزی منجر به تشکیل لکه‌های زرد روی برگ‌ها، کلروز (زردی برگ) و در نهایت پیری برگ‌ها می‌شود (An et al., 2023) که در نهایت باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع ساقه و قطر ساقه می‌گردد (An et al., 2024). با این حال، مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نانومواد می‌توانند از طریق تأثیر بر ویژگی‌های فلوتورسانس کلروفیل و میزان رنگدانه‌ها، نرخ فتوسنتز گیاهان را تعدیل کنند (Yan et al., 2023). در این پژوهش مشاهده شد که افزایش غلظت نانوذره کیتوزان باعث بهبود سبزی‌نگی و افزایش غلظت کادمیوم باعث کاهش سبزی‌نگی شده است. کاربرد نانوذرات کیتوزان-سلنیوم تأثیر مثبتی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی و مقادیر SPAD در گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica*) تحت تنش کادمیوم نشان داده است (Azimi et al., 2021). در مطالعه‌ای دیگر در گیاه برنج گزارش شده است که کاربرد ZnO-NPs شاخص SPAD را نسبت به گیاهان شاهد تا ۴۰/۲ درصد افزایش داد و تأثیر مثبتی بر فلوتورسانس کلروفیل داشت (Faizan, Bhat, et al., 2021). در مجموع، کاهش سبزی‌نگی برگ تحت تنش کادمیوم احتمالاً ناشی از تخریب کلروفیل، اختلال در ساختار کلروپلاست و افزایش تنش اکسیداتیو است. در مقابل، نانوذره کیتوزان احتمالاً موجب حفظ رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش شاخص SPAD شده است.



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر برهمکنشی نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر سبزی‌نگی گیاه بادرنجبویه. تیمارهای نانوذره کیتوزان شامل: NC2=0.4 gr/L, NC1=0.2 gr/L, NC0=0 و NC3=0.8 gr/L و کادمیوم شامل: Cd3=200 ppm, Cd2=100 ppm, Cd1=50 ppm, Cd0=0. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Figure 4. Mean comparison of interaction effect of chitosan nanoparticles and cadmium on the SPAD index of lemon balm plant. Chitosan nanoparticle treatments include: NC0=0, NC1=0.2 gr/L, NC2=0.4 gr/L and NC3=0.8 gr/L and cadmium include: Cd0=0, Cd1=50 ppm, Cd2=100 ppm and Cd3=200 ppm. Similar letters indicate no significant difference.

نتایج تجزیه و تحلیل صفات بیوشیمیایی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر ساده نانوذره کیتوزان و اثر ساده کادمیوم بر برخی از صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه (محتوای فنل، محتوای فلاونوئید و مالون دی آلدهید) در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل تیمارهای نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر صفات بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه از جمله محتوای فلاونوئید و مالون دی آلدهید در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود و برای صفت محتوای فنل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). این نتایج نشان داد که استفاده همزمان نانوذره کیتوزان و کادمیوم می‌تواند به‌طور معنی‌داری پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه را تحت تأثیر قرار دهد و بیانگر اثر تعدیل‌کننده نانوذره کیتوزان در کاهش اثرات تنش کادمیوم باشد.

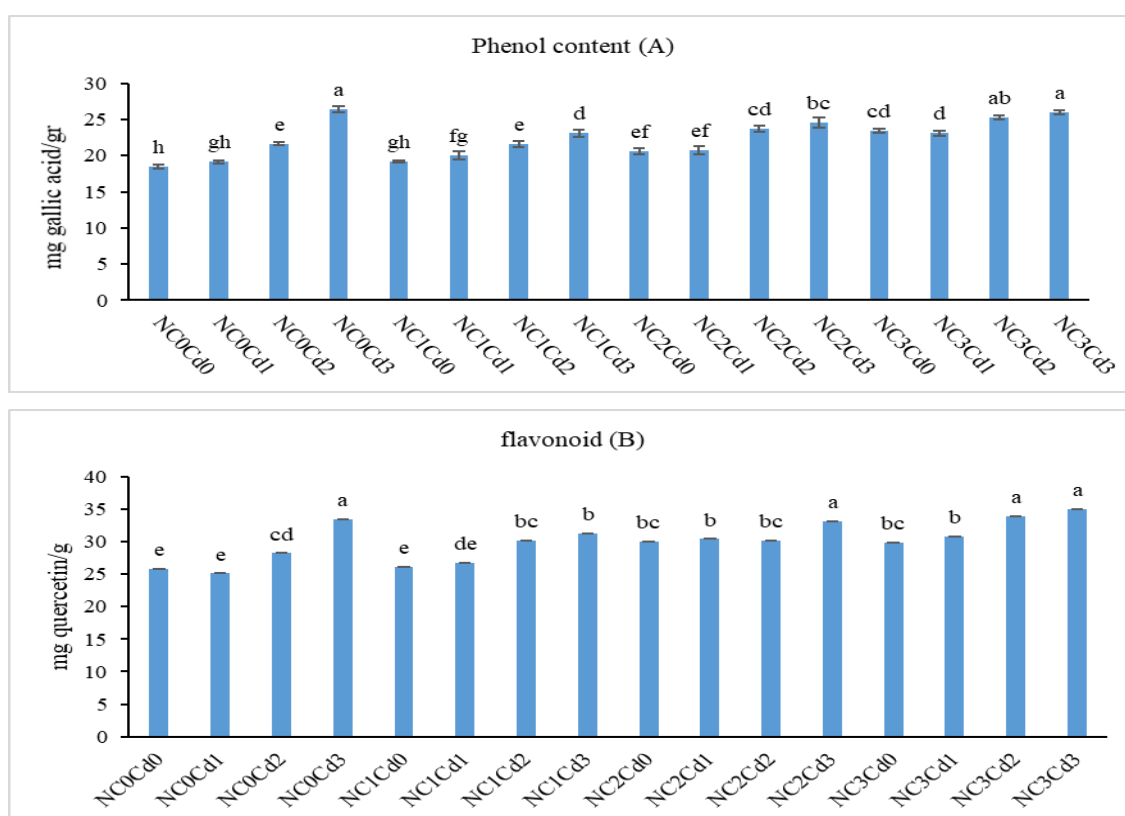
محتوای فنل و فلاونوئید: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر محتوای فنل و فلاونوئید نشان داد که افزایش غلظت نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر میزان فنل و فلاونوئید اثر مثبت دارد. بالاترین میزان فنل در تیمارهای کادمیوم ۲۰۰ پی پی ام با نانوذره کیتوزان

۰/۸ گرم بر لیتر (NC3Cd3) و کادمیوم ۲۰۰ پی پی ام (NC0Cd3)، به ترتیب ۲۶/۴ و ۲۵/۹۹ میلی گرم اسید گالیک در گرم مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۴۲/۷۸ و ۴۰/۵۶ درصد افزایش داشت (شکل A). همچنین، مشاهده شد که بالاترین میزان فلاونوئید برای تیمارهای کادمیوم ۲۰۰ پی پی ام + نانوذره کیتوزان ۰/۸ گرم بر لیتر (NC3Cd3)، کادمیوم ۱۰۰ پی پی ام + نانوذره کیتوزان ۰/۸ گرم بر لیتر (NC3Cd2)، کادمیوم ۲۰۰ پی پی ام (NC0Cd3) و کادمیوم ۲۰۰ پی پی ام + نانوذره کیتوزان ۰/۴ گرم بر لیتر (NC2Cd3) به ترتیب ۳۵/۰۵، ۳۳/۸۹، ۳۳/۳۷ و ۳۳/۱۱ میلی گرم کوئرستین بر گرم بود (شکل B).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر برخی از صفات بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه. *، ** و ns به ترتیب معنی داری در سطح پنج درصد، یک درصد و عدم معنی داری را نشان می دهند.

Table 2. Analysis of variance of the effect of chitosan and cadmium nanoparticles on some biochemical traits of lemon balm plant. *, ** and ns indicate significance at the 5% level, 1% level, and non-significance, respectively.

MDA	Flavonoid content	Phenol content	(df)	source
0.87**	48.6**	28.55**	3	Chitosan
3.03**	71.33**	55.42**	3	Cadmium
0.23*	4.84*	3.51**	9	Cadmium*Chitosan
0.06	1.16	0.49	32	error
10.45	3.6	3.14		CV

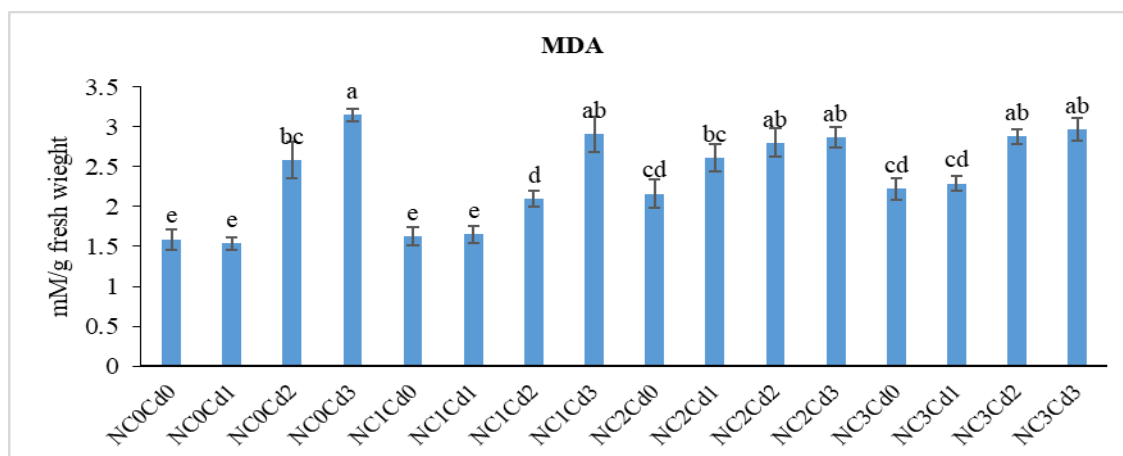


شکل ۵- مقایسه میانگین اثر برهمکنشی نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر مقدار فنل (A) و فلاونوئید (B) گیاه بادرنجبویه. تیمارهای نانوذره کیتوزان شامل: NC1=0.2 gr/L, NC0=0, NC2=0.4 gr/L, and NC3=0.8 gr/L و کادمیوم شامل: Cd0=0, Cd1=50 ppm, Cd2=100 ppm, Cd3=200 ppm. حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار می باشند.

Figure 5. Mean comparison of interaction effect of chitosan nanoparticles and cadmium on the phenolic content (A) and flavonoid (B) of lemon balm. Chitosan nanoparticle treatments included: NC0=0, NC1=0.2 gr/L, NC2=0.4 gr/L, and NC3=0.8 gr/L, and cadmium included: Cd0=0, Cd1=50 ppm, Cd2=100 ppm, and Cd3=200 ppm. Similar letters indicate no significant difference.

ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند که توانایی خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد را دارند. بنابراین، میزان این ترکیبات در شرایط تنش افزایش می‌یابد تا از سلول‌های گیاهی در برابر اثرات مخرب تنش محافظت کنند (Saleem *et al.*, 2019; Taie *et al.*, 2022). در مطالعه حاضر، افزایش ترکیبی کیتوزان و کادمیوم منجر به افزایش فنل و فلاونوئید شد که بیانگر فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی ثانویه در گیاه است که با نتایج مطالعات پیشین در تطابق است. در مطالعه‌ای توسط فولادی و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده شد که محتوای ترکیبات فنلی در گیاه بادرنبویه در اثر تیمار کیتوزان افزایش یافت. به طور مشابه، استفاده نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂ NPs) به‌طور قابل توجهی فعالیت آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند فلاونول‌ها، توکوفرول‌ها و فنول‌های کل را در بامبو تحت تنش کادمیوم افزایش داد و آسیب به غشای سلولی ناشی از ROS را کاهش داد (Emamverdian *et al.*, 2022). علاوه بر این، در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که تیمار با نانوذرات ZnO باعث افزایش محتوای فلاونوئید و ترکیبات فنولی تحت تنش کادمیوم در گیاه خربزه شد (Shah *et al.*, 2021). بنابراین، با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که کادمیوم با افزایش تولید ROS موجب تحریک مسیر فنیل‌پروپانویید می‌شود، در حالی که این پاسخ می‌تواند به نقش کیتوزان به‌عنوان یک الیستور زیستی مرتبط باشد که از طریق القا تولید کنترل شده ROS و فعال‌سازی آنزیم‌های دخیل در سنتز فنول‌ها، موجب تحریک مسیر فنیل‌پروپانویید و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شود.

میزان مالون دی آلدئید MDA: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر میزان MDA نشان می‌دهد که نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر فعالیت پراکسیداسیون لیپید غشا تأثیر دارد و با افزایش غلظت کادمیوم فعالیت آن نیز افزایش یافته است به طوری که در مقایسه با تیمار شاهد حدود ۹۸/۱۱ درصد افزایش داشته است (شکل ۶). همچنین نتایج نشان داد که کاربرد نانوذره کیتوزان اثر تعدیل کننده بر میزان MDA داشت و میزان آن تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است (شکل ۶). تجمع بیش از حد کادمیوم در گیاهان می‌تواند منجر به تولید بیش از حد ROS شود که این گونه‌ها شامل مجموعه‌ای از مولکول‌های واکنش‌پذیر حاوی اکسیژن مانند سوپراکسید آنیون ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل ($\bullet OH$) و اکسیژن (O_2) هستند و می‌توانند باعث پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب به مولکول‌های زیستی و اندامک‌های سلولی شوند (Haider *et al.*, 2021; Rombel-Bryzek *et al.*, 2018). مالون‌دی‌آلدئید (MDA) یکی از محصولات پراکسیداسیون تحت شرایط تنش است و میزان آن در گیاهان اغلب به‌عنوان یک شاخص زیستی برای ارزیابی میزان آسیب وارده به سلول‌های گیاهی بر اثر تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه مشاهده شد که افزایش غلظت کادمیوم منجر به افزایش MDA شده است که با کاربرد نانوذره کیتوزان محتوای آن در گیاه بادرنبویه کاهش یافت. این نتایج با تحقیقات پیشین مطابقت داشت، به طوری که در مطالعه‌ای در گیاه کلزا مشاهده شد که تیمار کیتوزان با وزن مولکولی پایین به‌طور قابل توجهی میزان MDA را تحت تنش کادمیوم کاهش داد (Zong, Li, *et al.*, 2017). کاربرد نانوذرات آهن (IONPs) و نانوذرات سیلیس (SiNPs) بر گیاه لوبیای قرمز و نانوذرات اکسید روی (ZnO-NPs) در برنج موجب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و سایر شاخص‌های اکسیداتیو شدند (Ghouri *et al.*, 2023; Koleva *et al.*, 2022). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، استفاده از نانوذرات کیتوزان بر برگ‌های گیاه گوجه فرنگی، تجمع MDA را تحت تنش کادمیم کاهش داد، که نشان می‌دهد نانوذرات کیتوزان قابلیت کاهش پراکسیداسیون لیپیدها را دارند (Faizan, Rajput, *et al.*, 2021). این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات کیتوزان می‌تواند از گیاهان در برابر آسیب غشایی ناشی از تولید بیش از حد ROS تحت تنش کادمیوم محافظت کند، که احتمالاً به ساختار مولکولی کیتوزان مربوط می‌شود. گزارش شده است که گروه‌های عاملی مانند گروه‌های هیدروکسیل و آمین موجود بر سطح کیتوزان، امکان تبدیل ROS به رادیکال‌های ماکرومولکولی نسبتاً غیرسمی را فراهم می‌کنند (Ahmed *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020).



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر برهمکنشی نانوذره کیتوزان و کادمیوم بر میزان MDA در گیاه بادرنجبویه. تیمارهای نانوذره کیتوزان شامل: NC2=0.4 gr/L, NC1=0.2 gr/L, NC0=0 و کادمیوم شامل: Cd3=200 ppm و Cd2=100 ppm, Cd1=50 ppm, Cd0=0 و NC3=0.8 gr/L. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Figure 6. Mean comparison of interaction effect of chitosan nanoparticles and cadmium on MDA levels in lemon balm. Chitosan nanoparticles treatments included: NC0=0, NC1=0.2 gr/L, NC2=0.4 gr/L and NC3=0.8 gr/L and cadmium included: Cd0=0, Cd1=50 ppm, Cd2=100 ppm and Cd3=200 ppm. Similar letters indicate no significant difference.

نتیجه گیری: به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات کیتوزان می‌توانند به‌عنوان یک محرک رشد و عامل محافظتی مؤثر در کاهش اثرات منفی کادمیوم بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه عمل کنند. نتایج نشان داد که استفاده از این نانوذرات باعث بهبود پاسخ‌های دفاعی و کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش کادمیوم شد. این یافته‌ها بیانگر پتانسیل بالای نانوذره کیتوزان در توسعه راهکارهای نوین برای کشاورزی پایدار و مدیریت تنش‌های محیطی می‌باشد. با این حال، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، اثر سطوح مختلف نانوذره کیتوزان در شرایط مزرعه‌ای نیز بررسی شود. همچنین ارزیابی مکانیسم‌های مولکولی و ژنتیکی دخیل در پاسخ گیاه بادرنجبویه به نانوذره کیتوزان و بررسی تأثیر آن بر تجمع فلزات سنگین در بافت‌های این گیاه می‌تواند به درک بهتر عملکرد این نانوذرات کمک کند.

References

منابع

- Adamczyk-Szabela, D., Lisowska, K., Romanowska-Duda, Z., & Wolf, W. M. (2019). Associated effects of cadmium and copper alter the heavy metals uptake by *Melissa officinalis*. *Molecules*, 24(13), 2458. <https://doi.org/10.3390/molecules24132458>.
- Ahmad, A., Khan, T. A., Mubeen, S., Shahzadi, I., Akram, W., Saeed, T., Bashir, Z., Wang, R., Alam, M., & Ahmed, S. (2020). Metabolic and proteomic perspectives of augmentation of nutritional contents and plant defense in *Vigna unguiculata*. *Biomolecules*, 10(2), 224. <https://doi.org/10.3390/biom10020224>.
- Ahmad, A., Shahzadi, I., Mubeen, S., Yasin, N. A., Akram, W., Khan, W. U., & Wu, T. (2021). Karrikinolide alleviates BDE-28, heat and Cd stressors in *Brassica alboglabra* by modulating biochemical attributes, antioxidative machinery and osmoregulators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112047. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112047>.
- Ahmed, K. B. M., Khan, M. M. A., Siddiqui, H., & Jahan, A. (2020). Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production: A review. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115331. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115331>.
- Al-Asmar, A., Giosafatto, C. V. L., Sabbah, M., Sanchez, A., Villalonga Santana, R., & Mariniello, L. (2019). Effect of mesoporous silica nanoparticles on the physicochemical properties of pectin packaging material for strawberry wrapping. *Nanomaterials*, 10(1), 52. <https://doi.org/10.3390/nano10010052>.
- Al-Dhabaan, F. A., Mostafa, M., Almoammar, H., & Abd-Elsalam, K. A. (2018). Chitosan-based nanostructures in plant protection applications. In *Nanobiotechnology applications in plant protection* (pp. 351–384). 10.1007/978-3-319-91161-8_13.
- Alenazi, M. M., El-Ebady, A. M., El-Shehaby, O. A., Seleiman, M. F., Aldhuwaib, K. J., & Abdel-Aziz, H. M. (2024). Chitosan and chitosan nanoparticles differentially alleviate salinity stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plants*, 13(3), 398. <https://doi.org/10.3390/plants13030398>.

- An, T., Gao, Y., Kuang, Q., Liu, S., Chao, Y., Mickan, B. S., Zhang, Y., Xu, B., Zhang, S., & Yu, M. (2024). Unveiling Si's shield: A holistic examination of Cd stress alleviation in maize through physiological and transcriptomic insights. *Environmental and Experimental Botany*, 219, 105626. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105626>.
- An, T., Kuang, Q., Wu, Y., Gao, Y., Zhang, Y., Mickan, B. S., Xu, B., Zhang, S., Deng, X., & Yu, M. (2023). Variability in cadmium stress tolerance among four maize genotypes: Impacts on plant physiology, root morphology, and chloroplast microstructure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 205, 108135. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108135>.
- Arif, Y., Siddiqui, H., & Hayat, S. (2021). Role of chitosan nanoparticles in regulation of plant physiology under abiotic stress. In M. Faizan, S. Hayat, & F. Yu (Eds.), *Sustainable Agriculture Reviews* 53 (pp. 399–413). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-86876-5_16.
- Attaran Dowom, S., Karimian, Z., Mostafaei Dehnavi, M., & Samiei, L. (2022). Chitosan nanoparticles improve physiological and biochemical responses of *Salvia abrotanoides* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 22(1), 364. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03689-4>.
- Azimi, F., Oraei, M., Gohari, G., Panahirad, S., & Farmarzi, A. (2021). Chitosan-selenium nanoparticles modulate photosynthesis, antioxidant enzymes and essential oils in *Dracocephalum moldavica* under cadmium stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.013>.
- Bandara, S., Du, H., Carson, L., Bradford, D., & Kommalapati, R. (2020). Agricultural and biomedical applications of chitosan-based nanomaterials. *Nanomaterials*, 10(10), 1903. <https://doi.org/10.3390/nano10101903>.
- Baruah, S., & Dutta, J. (2009). Nanotechnology applications in pollution sensing and degradation in agriculture: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 7, 191–204. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0228-8>.
- Chandrkrachang, S. (2002). The application of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. *Advances in Chitin Science*, 5(1), 458–462.
- de Lima, S. V. A. M., Marques, D. M., Silva, M. F. S., Bressanin, L. A., Magalhães, P. C., & de Souza, T. C. (2022). Applications of chitosan to the roots and shoots change the accumulation pattern of cadmium in *Talinum patens* (Talinaceae) cuttings. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(45), 67787–67800. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20620-4>.
- Del Buono, D., Di Michele, A., Costantino, F., Trevisan, M., & Lucini, L. (2021). Biogenic ZnO nanoparticles synthesized using a novel plant extract: Application to enhance physiological and biochemical traits in maize. *Nanomaterials*, 11(5), 1270. <https://doi.org/10.3390/nano11051270>.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Barker, J., Liu, G., Hasanuzzaman, M., Li, Y., Ramakrishnan, M., & Mokhberdoran, F. (2022). Co-application of 24-epibrassinolide and titanium oxide nanoparticles promotes tolerance to Cu and Cd toxicity. *Antioxidants*, 11(3), 451. <https://doi.org/10.3390/antiox11030451>.
- Faizan, M., Bhat, J. A., Hessini, K., Yu, F., & Ahmad, P. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviate cadmium stress in *Oryza sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112401. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112401>.
- Faizan, M., Rajput, V. D., Al-Khuraif, A. A., Arshad, M., Minkina, T., Sushkova, S., & Yu, F. (2021). Effect of foliar fertigation of chitosan nanoparticles on cadmium toxicity in tomato. *Biology*, 10(7), 666. <https://doi.org/10.3390/biology10070666>.
- Fooladi Vanda, G., Shabani, L., & Razavizadeh, R. (2019). Chitosan enhances rosmarinic acid production through methyl jasmonate induction. *Botanical Studies*, 60, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0274-x>.
- Gerami, M., Ghorbani, A., & Karimi, S. (2018). Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium toxicity. *Journal of Plant Biological Sciences*, 10(1), 81–96. 10.22108/ijpb.2018.108633.1069. (In Farsi with English abstract).
- Ghouri, F., Shahid, M. J., Liu, J., Lai, M., Sun, L., Wu, J., Liu, X., Ali, S., & Shahid, M. Q. (2023). Polyploidy and ZnO nanoparticles alleviate Cd toxicity in rice. *Journal of Hazardous Materials*, 448, 130991. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130991>.
- Haider, F. U., Liqun, C., Coulter, J. A., Cheema, S. A., Wu, J., Zhang, R., Wenjun, M., & Farooq, M. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>.
- Hamid, Y., Tang, L., Sohail, M. I., Cao, X., Hussain, B., Aziz, M. Z., Usman, M., He, Z.-L., & Yang, X. (2019). Soil amendments to reduce cadmium phytoavailability. *Science of the Total Environment*, 660, 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.085>.
- Hassan, F., Ali, E., Gaber, A., Fetouh, M., & Mazrou, R. (2021). Chitosan nanoparticles combat salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.004>.
- Heidari, M., Esmailzadeh Bahabadi, S., & 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), 646–657. 10.22108/ijpb.2018.108633.1069. (In Farsi with English abstract).
- Hoagland, D. R., & Snyder, W. C. (1933). Effects of deficiencies of boron and certain other elements: (b) Susceptibility to injury from sodium salts. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). Technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>.
- Khallouki, F., Breuer, A., Akdad, M., Laassri, F. E., Attaleb, M., Elmoulaj, B., Mzibri, M., Benbacer, L., & Owen, R. W. (2020). Cytotoxic activity of Moroccan *Melissa officinalis* leaf extracts and HPLC-ESI-MS analysis of its phytoconstituents. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00037-x>.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.04.009>.
- Koleva, L., Umar, A., Yasin, N. A., Shah, A. A., Siddiqui, M. H., Alamri, S., Riaz, L., Raza, A., Javed, T., & Shabbir, Z. (2022). Iron oxide and silicon nanoparticles under cadmium stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 806781. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.806781>.
- Majidian, P., Gerami, M., Ghorbanpour, A., & Alipour, Z. (2020). Morphological responses of stevia to chitosan under salt stress. *Journal of Plant Research*, 12(33), 150–161. 10.22108/ijpb.2018.108633.1069. (In Farsi with English abstract).
- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255–260.
- Meftahizade, H., Sargsyan, E., & Moradkhani, H. (2010). Antioxidant capacity of *Melissa officinalis*. *Journal of Medicinal Plant Research*, 4(14), 1391–1395.
- Orgaz, B., Lobete, M. M., Puga, C. H., & Jose, C. S. (2011). Effectiveness of chitosan against mature biofilms. *International*

- Journal of Molecular Sciences, 12(1), 817–828. <https://doi.org/10.3390/ijms12010817>.
- Panahirad, S., Gohari, G., Mahdavinia, G., Jafari, H., Kulak, M., Fotopoulos, V., Alcázar, R., & Dadpour, M. (2023). Chitosan-putrescine nanoparticles alleviate Cd toxicity in grapevine. *BMC Plant Biology*, 23(1), 411. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04319-1>.
- Pinto, D., Fernandes, A., Fernandes, R., Mendes, I., Pereira, S., Ferreira da Vinha, A., Herdeiro, T., Santos, E., & Machado, M. (2011). Heavy metals in waters, soils and medicinal plants. *Science Against Microbial Pathogens*, 1, 303–309.
- Prasad, S., Yadav, K. K., Kumar, S., Gupta, N., Cabral-Pinto, M. M., Rezaia, S., Radwan, N., & Alam, J. (2021). Chromium contamination and remediation. *Journal of Environmental Management*, 285, 112174. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112174>.
- Rajput, V., Minkina, T., Sushkova, S., Behal, A., Maksimov, A., Blicharska, E., Ghazaryan, K., Movsesyan, H., & Barsova, N. (2020). ZnO and CuO nanoparticles: Environmental risks. *Environmental Geochemistry and Health*, 42, 147–158. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00360-4>.
- Razavi Nia, S. M. B., Pourghasemian, N., & Najafi, F. (2021). Investigating the effect of cadmium and lead on growth parameters and quality characteristics of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Horticultural Science*, 35(2), 235–251. <https://doi.org/10.22067/jhs.2021.61820.0>
- Rombel-Bryzek, A., Rajfur, M., Żuk, O., & Zajac, P. (2018). Effect of cadmium on oxidative stress in *Beta vulgaris*. *Ecological Chemistry and Engineering*, 25(3), 457–467. <https://doi.org/10.1515/eces-2018-0031>.
- Saleem, M. H., Parveen, A., Khan, S. U., Hussain, I., Wang, X., Alshaya, H., El-Sheikh, M. A., & Ali, S. (2022). Silicon fertigation attenuates cadmium toxicity in maize. *Sustainability*, 14(3), 1462. <https://doi.org/10.3390/su14031462>.
- Sari, A. O., & Ceylan, A. (2002). Yield and essential oil composition of lemon balm. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26(4), 217–224.
- Shah, A. A., Aslam, S., Akbar, M., Ahmad, A., Khan, W. U., Yasin, N. A., Ali, B., Rizwan, M., & Ali, S. (2021). Combined effect of *Bacillus fortis* IAGS 223 and zinc oxide nanoparticles to alleviate cadmium phytotoxicity in *Cucumis melo*. 158, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.011>.
- Shakirova, F., Allagulova, C. R., Maslennikova, D., Klyuchnikova, E., Avalbaev, A., & Bezrukova, M. (2016). Salicylic acid-induced protection against cadmium toxicity. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.002>.
- Sharafzadeh, S., Khosh-Khui, M., & Javidnia, K. (2011). Aroma profile of lemon balm. *Advances in Environmental Biology*, 547–551.
- Song, X., Chen, Y., Zhao, G., Sun, H., Che, H., & Leng, X. (2020). Effect of molecular weight of chitosan on antitumor activities. *Carbohydrate Polymers*, 231, 115689. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115689>.
- Taie, H. A., Seif El-Yazal, M. A., Ahmed, S. M., & Rady, M. M. (2019). Polyamines modulate growth under heavy metal stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 22338–22350. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05555-7>.
- ur Rahman, S., Xuebin, Q., Zhao, Z., Du, Z., Imtiaz, M., Mehmood, F., Hongfei, L., Hussain, B., & Ashraf, M. N. (2021). Silicon alleviates cadmium stress in wheat roots. *Scientific Reports*, 11(1), 1958. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80808-x>.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of grape cultivars. *Food Chemistry*, 119(4), 1557–1565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.003>.
- Yaghoubian, S., Seyedat, A., Talavat, M., Pirdashti, H., & Andaleh, H. (2016). Quantification of vegetative growth responses and chlorophyll fluorescence components of *Melissa officinalis* L. to cadmium concentration in soil. *Plant Production Research*, 23(2), 165–185. 20.1001.1.23222050.1395.23.2.8.4.(In Farsi with English abstract).
- Yan, J., Wu, X., Li, T., Fan, W., Abbas, M., Qin, M., Li, R., Liu, Z., & Liu, P. (2023). Effect and mechanism of nanomaterials on cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 266, 115576. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115576>.
- Zhai, X., Li, Z., Huang, B., Luo, N., Huang, M., Zhang, Q., & Zeng, G. (2018). Remediation of heavy metal-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 635, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.310>.
- Zong, H., Li, K., Liu, S., Song, L., Xing, R., Chen, X., & Li, P. (2017). Improvement in cadmium tolerance of *Brassica rapa* by chitoooligosaccharide. *Chemosphere*, 181, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.087>.
- Zong, H., Liu, S., Xing, R., Chen, X., & Li, P. (2017). Protective effect of chitosan on photosynthesis under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.009>.