



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 15, Issue 4, No. 58, winter 2023
Document Type: Research Paper
Received: 08/07/2024 Accepted: 30/11/2024

Evaluation of activity changes of antioxidant enzymes in saffron seedlings under cadmium stress

Nabi Khalili aqdam¹, Shahriar Saeidian² ^{*}, Zahra Baghaei Far², Tahmineh Taheri²

¹Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

² Department of Basic Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Plants employ various defensive strategies to cope with heavy metal stress in their growing environment. In this study, proline content, antioxidant enzyme activities, and phenolic compound levels were analyzed in saffron corms exposed to varying concentrations of cadmium stress. Saffron corms were cultivated under cadmium stress at concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, and 20 mM, and samples were collected on days 0, 5, 10, 20, and 30 after cultivation. Antioxidant enzyme activities, proline levels, and phenolic content were measured. Statistical analysis was performed at a significance level of $P < 0.05$ using SPSS software. The results revealed significant increases in the activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), polyphenol oxidase (PPO), guaiacol peroxidase (GPX), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), as well as in proline content and phenolic compound accumulation, in response to cadmium treatments. The activity responses of PPO, CAT, APX, PAL, and GPX enzymes followed a biphasic pattern, while phenolic compound accumulation exhibited a linear regression trend. In contrast, the activities of SOD and proline accumulation conformed to a flattened exponential function. Maximum activities of PPO, CAT, APX, and PAL enzymes were observed at a cadmium concentration of 10 mM in corms harvested after 30 days of stress exposure. Similarly, the highest SOD activity and proline accumulation were recorded in 30-day-old corms, with phenolic compound accumulation significantly increasing with higher cadmium concentrations, albeit with varying rates depending on the duration of exposure. The observed changes in enzyme activities during growth suggest activating regulatory mechanisms in saffron to mitigate cadmium stress. The antioxidant roles of enzymes, proline, and phenolic compounds are critical in Saffron's response to cadmium-induced stress. Given that high cadmium levels induce the production of reactive oxygen species (ROS), the saffron plant enhances the synthesis of antioxidant enzymes to neutralize destructive radicals effectively.

Key Words: Antioxidant, Cadmium, Saffron, Oxidase, Proline

*Corresponding author: saeedyan@pnu.ac.ir



Introduction

Plants frequently encounter various environmental stresses throughout their lifecycle, with heavy metal stress being among the most significant. Environmental contamination by heavy metals adversely affects plant growth, leading to reduced crop quality and posing serious risks to human health and the well-being of other organisms. To counteract heavy metal stress, plants employ diverse defensive mechanisms. In this context, the proline content, antioxidant enzyme activities, and phenolic compound levels were examined in saffron corms exposed to different concentrations of cadmium stress.

Material and Methods

In this research, saffron corms were dropped in a 2% benomyl solution after removing the top shell and the decayed corms to prevent fungal activity. Cultivation of saffron corms was carried out in the liquid culture medium with 4 saffron corms in each pot. The corms were classified into 7 groups. The growth of corms was done at room temperature of 20 to 25 °C and conditions of 16 hours of light and 8 hours of darkness. Growing corms were extracted at time intervals of 0, 5, 10, 20, and 30 days after growth. Saffron corms were treated at different concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, and 20 mM cadmium, so extraction of corms was done on days 0, 5, 10, 20, and 30 days after cultivation, and the activity of antioxidant enzymes, proline content, and phenolic content was measured. Data analysis was done at the level of $P < 0.05$ with the help of SPSS software.

Results and Discussion

The sensitivity of GPX to cadmium concentration is higher than PPO, So, the lowest activity was observed in the absence of cadmium. Contrary to GPX and PPO, the response of SOD in the presence of cadmium followed a flat exponential function. By increasing the placement of corms in the presence of cadmium, the increase of activity has also been obtained in different slopes. The maximum activity of PPO, CAT, APX, and PAL was obtained in 30-day-old corms under 10 mM cadmium stress. The maximum SOD activity and proline accumulation based on the flat exponential function was observed in the 30-day corms exposed to stress, and the accumulation of phenolic compounds also increased with significant and different slopes at different times. PPO oxidizes phenolic compounds to quinones and as a result, reduces them in various parts of plants under stress. With increasing of cadmium, the activity of SOD increased. So, SOD destroys the destructive effects of cadmium by breaking radicals into H_2O_2 . Regulating the level of ROS by SOD is an important protection path against oxidative stress because O^{2-} is a precursor for more toxic or destructive derivatives such as nitrite peroxide or HO^{\cdot} . The activity of catalase increased under cadmium stress, which is due to the protective role of the enzyme in controlling H_2O_2 , O^{2-} and a complementarity role with SOD. Increasing PAL activity is a cellular solution to moderate the resulting stresses in the plant, by trapping oxygen radicals through phenolic compounds.

Conclusion

The results indicate that changes in enzyme activity during growth reflect the activation of regulatory mechanisms in saffron to cope with cadmium stress. In response, the plant increases the production of antioxidant enzymes to neutralize harmful radicals and mitigate their effects. Consequently, the antioxidant defense provided by enzymes and the production of proline and phenolic compounds, play a crucial role in saffron's ability to withstand cadmium-induced stress.

ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدانی در گیاهچه‌های زعفران تحت تنش کادمیوم

نبی خلیلی اقدم^۱، شهریار سعیدیان*^۱ ID، زهرا بقایی فر^۲، تهمنه طاهری^۲

^۱ دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

غلبه گیاهان در محیط رویش نسبت به تنش‌های فلزات سنگین، توسط راه کارهای دفاعی متعددی انجام می‌شود. در این راستا محتوای پرولین، فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدان و ترکیبات فنلی در بنه زعفران تحت تنش کادمیوم در غلظت‌های مختلف بررسی شد. بنه‌های زعفران در غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار کادمیوم، کشت و عصاره‌گیری از بنه‌ها در روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از کشت انجام شد و فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدان، میزان پرولین و محتوای فنلی اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها در سطح (P ≤ ۰/۰۵) با نرم‌افزار SPSS انجام شد. نتایج نشان دادند فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، پلی-فنل اکسیداز (PPO)، گایاکل پراکسیداز (GPX) و فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، محتوای پرولین و فنلی در نتیجه تیمار با کادمیوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. پاسخ فعالیت PPO، CAT، APX، PAL و GPX به سطوح مختلف کادمیوم از یک تابع دو تکه‌ای تبعیت نمود، درحالی‌که پاسخ تجمع ترکیبات فنلی از تابع رگرسیون خطی و پاسخ SOD و تجمع پرولین به صورت تابع نمائی مسطح بود. بیشینه فعالیت آنزیم‌های PPO، CAT، APX، PAL در بنه-های ۳۰ روز تحت تنش ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم به دست آمد. حداکثر فعالیت آنزیم SOD و تجمع پرولین بر اساس تابع نمائی مسطح در بنه‌های ۳۰ روز در معرض تنش مشاهده شد و با افزایش غلظت کادمیوم در محیط، تجمع ترکیبات فنلی نیز با شیب‌های معنی‌دار و البته متفاوت به تناسب زمان‌های مختلف افزایش یافت. با توجه به نتایج، تغییرات فعالیت آنزیم‌ها در طول رشد، نشان‌دهنده وجود راه کارهای تنظیمی آنزیمی در زعفران در برابر تنش کادمیوم است. از آنجایی که غلظت‌های زیاد کادمیوم با تولید ترکیبات سمی ROS همراه است، بنابراین گیاه زعفران تولید هرچه بیشتر آنزیم‌های ضد اکسیدانی را در جهت حذف رادیکال‌های تخریب‌گر و مقابله با آن در پیش می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: کادمیوم، ضد اکسیدان، زعفران، اکسیداز، پرولین

*Corresponding author: saedyan@pnu.ac.ir



مقدمه

مقدمه گیاهان همواره با انواع مختلفی از تنش‌های محیطی در طول زندگی خود روبرو هستند که در این میان تنش فلزات سنگین از برجسته‌ترین آن‌ها محسوب می‌شود. فلزات سنگین به عنوان مضرترین آلوده‌کننده‌های محیطی، در رسوبات خاکی سطح زمین به وفور دیده می‌شوند (Bafeel et al., 2010). آلودگی محیط رشد گیاهان تحت تاثیر فلزات سنگین متنوع محیطی با کاهش کیفیت محصول همراه بوده و سلامتی افراد جامعه و موجودات زنده را نیز با خطر مواجه می‌سازد (Hou et al., 2007; María et al., 2005). با وجود نیکل، مس و روی به عنوان عناصر حیاتی در ساختار رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها، غلظت‌های فراتر از نیاز فیزیولوژیکی این عناصر برای گیاهان سمی محسوب می‌شود. کادمیوم و سرب به عنوان عناصر غیرضروری در غلظت‌های پائین قابلیت تخریب گیاهان به لحاظ فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را دارند. بر همین اساس فلزات سنگین جز عوامل اصلی تنش‌زای گیاهان به شمار می‌آیند (Damien et al., 2006). فلزات سنگین با کاهش عملکرد اجزای مختلفی از جمله غشای تیلاکوئید در کلروپلاست، لیپیدها و پروتئین‌ها، رشد گیاه را محدود می‌کنند. در میان تمام فلزات سنگین، اهمیت کادمیوم به علت نقش آن در آلودگی زنجیره غذایی و نیز جذب راحت آن توسط سلول‌های گونه‌های مختلف گیاهی است، به طوری که پس از حل شدن در آب با انتقال فعال وارد غشای نیمه تراوا سلول‌های ریشه می‌شوند (Mahmoudi et al., 2023). کادمیوم به کار گرفته شده در صنایع تولید لاستیک‌سازی، ساخت

رنگ، تولید باطری و نیز در کودهای کشاورزی می‌تواند با مواد خوراکی و تنفس وارد بدن شده و با دخالت در متابولیسم، شخص را با عوارض کم خونی، استخوانی، کبدی و کلیوی درگیر نماید (Salvato et al., 2003; Vassilev et al., 1998; John et al., 2008). کادمیوم دارای تمایل بالا با گروه‌های عملکردی مهم و مختلف از جمله سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاند‌های نیتروژن‌دار، آنزیم‌های مهم متابولیسم را تغییر و غیرفعال نموده و منجر به ایجاد اختلال در فتوسنتز، تنفس و مسیرهای متابولیسمی در گیاه می‌شود (Torres et al., 2000). تنش فلزات سنگین با تاثیر منفی بر ساختار پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها بر واکنش‌های جایگزینی یون‌های فلزی ضروری با مولکول‌های زیستی تاثیرگذار است که نتیجه آن اختلال در یکپارچگی غشاءها و نیز تغییر در واکنش‌های متابولیسمی اساسی، از جمله هموستاز، تنفس و فتوسنتز است (Karimi et al., 2024). مقادیر بالای کادمیوم به علت ایجاد اختلالات متابولیسمی، تولید انواع اکسیژن فعال را در سلول افزایش داده و منجر به وقوع تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود (Goncalvez et al., 2007; Iannelli et al., 2002). اکسیژن فعال با حمله به ترکیبات حیاتی یاخته مانند اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک منجر به تغییر ویژگی‌های حیاتی از جمله سیالیت غشاء، انتقال یونی، فعالیت آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها شده و با تخریب هسته‌ای، میتوکندریایی، در نهایت مرگ یاخته یعنی آپوپتوز را ایجاد خواهد کرد (Zhang et al., 2003). رادیکال‌ها با تغییر ماهیت پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع، سبب

کادمیوم، محتوای پرولین، میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD، PPO، GPX، APX و PAL و نیز ترکیبات فنلی در گیاهچه‌های زعفران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور استان کردستان (مرکز سفز) انجام شد. در این پژوهش، بنه‌های زعفران از سایت دهکده گشتا خریداری شده و پس از برداشتن پوشش فیبری، بنه‌های ۳ تا ۶ گرمی جمع‌آوری و برای کشت مورد استفاده قرار گرفتند. به این منظور بنه‌های زعفران در خرداد ماه تهیه شده و پس از جدا کردن پوسته رویی و بنه‌های تحلیل رفته، در محلول بنومیل ۲ درصد برای جلوگیری از فعالیت قارچی ضد عفونی شدند. کشت بنه‌ها در محیط کشت مایع به تعداد ۴ بنه زعفران در هر گلدان انجام شد، طوری که با افزودن ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، تنها بخش پایه بنه در زیر سطح آب قرار گرفت. بنه‌ها در ۷ گروه طبقه‌بندی شدند. گروه اول به عنوان شاهد تنها در حضور آب مقطر رشد کردند. گروه دوم در معرض کلرید کادمیوم ۰/۲۵ میلی‌مولار، گروه سوم، چهارم، پنجم، ششم و هفتم به ترتیب در حضور کلرید کادمیوم ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار رشد کردند. رشد بنه‌ها در دمای اتاق ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. عصره-گیری از بنه‌های در حال رشد در فواصل زمانی ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از رشد صورت گرفت. برای تهیه عصره از بنه‌های در حال رشد، بنه‌ها را در روزهای مختلف و مشخص از رشد یعنی

تحریک واکنش‌های زنجیره پراکسیداسیون شده که منجر به تخریب اسیدهای چرب و به عبارتی پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها در جایگاه ویژه‌ای از آمینواسیدها در پروتئین می‌شوند (Gomez et al., 2004; Shah et al., 2001). برای مقابله با تنش اکسیداتیو، سیستم حفاظتی ضد اکسیدانی با راندمان بالا در گیاهان وجود دارد که در برگیرنده آنزیم‌های ضد اکسیدانی مانند کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، فنل پراکسیداز (POX) و گایاکل پراکسیداز (GPX) و نیز سیستم ضد اکسیدان غیر آنزیمی شامل آسکوربات، آلفاتوکوفرول، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی، پرولین و گلوکاتیون است که قادرند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا بی اثر کنند (Shahid et al., 2014, Grill et al., 1985). ترکیبات فنلی با ویژگی ضد اکسیدانی با جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی یاخته ممانعت نموده و از بروز تنش اکسیداتیو در یاخته‌های گیاه جلوگیری می‌کند (Myung Min et al., 2009; Iannelli et al., 2002). آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، به عنوان آغازگر مسیر فنیل پروپانوئید، فنیل آلانین را با دامیناسیون به ترانس-سینامیک اسید تبدیل کرده که این آنزیم نقش کلیدی در ایجاد ترکیبات فنلی و به کارگیری سازوکار دفاعی غیر آنزیمی به عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی دفاعی گیاه در مقابل تنش‌های محیطی بر عهده دارد. در این پژوهش جهت بررسی عملکرد سامانه حفاظتی ضد اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاه زعفران در مواجهه با سمیت

دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده شد. از محلول واکنش بدون عصاره جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد.

آنزیم پلی فنل اکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) از روش Cho & Ahn (۱۹۹۳) استفاده شد. برای اندازه گیری آنزیم پلی فنل اکسیداز مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی مولار و ۵۰۰ میکرولیتر متیل کاتکول ۰/۰۲ میلی مولار در ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی مولار با $\text{pH}=6/7$ است. افزایش فعالیت آنزیم بر اساس شدت رنگ نارنجی متیل کاتکول تولید شده، در طول موج ۴۱۰ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در دقیقه در میلی گرم بیان شد.

فعالیت کاتالاز: فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز به کمک روش Cakmak و همکاران (۱۹۹۳) اندازه گیری شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار و ۳۰۰ میکرولیتر H_2O_2 مخلوط و در طول موج ۲۴۰ نانومتر سرعت حذف H_2O_2 به مدت ۲ دقیقه اندازه گیری شد. میزان جذب H_2O_2 در بافر فسفات ۰/۴ تنظیم شد که نقطه شروع برای اندازه گیری سینتیک سرعت بود. در این آزمایش ۲ میلی لیتر از بافر حاوی H_2O_2 فاقد عصاره آنزیمی به عنوان نمونه شاهد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

روزهای ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز به طور جداگانه پس از خارج کردن از محیط رشد با آب مقطر شسته و در حضور بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH}=7$ و محلول ۰/۰۲ فنیل متان سولفونیل فلوراید به عنوان مهارکننده پروتئاز هموژنیزه شد. مخلوط هموژنیزه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوب بالایی به مدت نیم ساعت در ۱۵۰۰۰g سانتریفیوژ شد و محلول شفاف بالایی به عنوان عصاره خام و انجام سنجش های بعدی یعنی اندازه گیری فعالیت آنزیم های SOD، CAT، APX، GPX، PAL و PPO مورد استفاده قرار گرفت. جهت اندازه گیری کمی پروتئین نمونه ها از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. اساس روش برادفورد بر اتصال کوماسی برلیانت بلو G250 به پروتئین در محیط اسیدی و خواندن جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenway ساخت کشور انگلستان) انجام شد. غلظت پروتئین با منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی گرم بر گرم محاسبه شد. میزان جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر با غلظت پروتئین نسبت مستقیم دارد.

سنجش فعالیت آنزیم ها

آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم با روش Polle و همکاران (۱۹۹۷) اندازه گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱۸ میلی-مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از H_2O_2 و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در لوله آزمایش بود. جذب نمونه بر اساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از

ترکیبات فنلی کل: محتوای ترکیبات فنلی کل با روش Velioglu و همکاران (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم از نمونه‌ها با پنج میلی لیتر متانول ۸۰ درصد حاوی اسیدکلریدریک یک درصد سائیده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی همزن عصاره‌گیری کامل شد. سپس مخلوط حاضر در ۳۰۰۰ سانتیفریوژ و از محلول رویی جهت تعیین ترکیبات فنلی کل استفاده شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه و مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۶ درصد به آن اضافه و پس از ۹۰ دقیقه جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیبات فنلی کل با اسیدگالیک منحنی استاندارد رسم و غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم بر گرم گزارش شد.

آنزیم فنیل آلانین آمونیاایاز: سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاایاز از غلظت محصول حاصله یعنی اسیدسینامیک انجام شد (Wang et al., 2007). ابتدا ۳۰۰ میلی گرم از عصاره ریشه کنگر با ۶/۵ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار حاوی بتامرکاپتواتانول ۱۵ میلی مولار در هاون سرد شده سائیده شد. سپس عصاره حاصله با دور ۶۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتیفریوژ شد. محلول بالایی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. برای انجام آن، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۸ و ۳۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۲۰ میلی مولار اضافه شد. مخلوط به دست آمده به

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (EC: 1.15.1.1) بر اساس روش پیشنهادی Giannopolitis و همکاران (۱۹۹۷) با اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید (NBT) اندازه‌گیری شد. اساس اندازه‌گیری فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، اثر بازدارندگی این آنزیم با احیای نوری NBT است. مخلوط واکنش شامل، ۲ میلی لیتر بافر HEPES-KOH 50 میلی مولار با اسیدیته برابر ۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیته برابر ۱۰/۲، L-methionine ۱۲ میلی مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریوفلاوین ۱ میکرومولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در شدت نور تقریباً ۸۰۰۰ لوکس (در زیر نور خورشید) قرار گرفت. سپس در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Jenway جذب نمونه‌ها خوانده شد.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Nakano & Asada (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار، آسکوربات ۱۰ میلی مولار، پراکسیدهیدرژن ۱۰ میلی مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسیدشدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با ضریب خاموشی $2/8 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ تعیین شد.

بهره گرفته شد. بدین منظور توابع رگرسیون غیرخطی مورد استفاده در پژوهش حاضر عبارت بودند از:

روش تجزیه و تحلیل: در این پژوهش برای تعیین بهترین سطح پاسخ آنزیم آسکوربات پراکسیداز به سطوح مختلف تیمارهای مورد بررسی با توجه به کمی بودن تیمارها از تجزیه رگرسیون خطی و غیرخطی بهره گرفته شد. توابع رگرسیون مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از:

مدل رگرسیون ساده خطی، که در آن intercept عبارت است از مقدار Y وقتی $x=0$ باشد. Slope نیز شیب تغییرات متغیر Y در برابر متغیر X است. تابع این مدل عبارت است از

$$\text{intercept} + \text{slope} \times x = Y$$

مدل دو تکه ای: که در آن a ، عرض از مبدا، b_1 و b_2 شیب مدل دو طرف نقطه چرخش Break point و x_0 ، نقطه چرخش مدل یا حداکثر مقدار عددی y است. مقادیر a و b_1 همیشه مثبت و مقدار b_2 نیز همیشه منفی است. تابع این مدل عبارت است از:

رابطه (۲):

$$\begin{aligned} \text{if } x < x_0 \\ y &= a + b_1 x \\ \text{if } x > x_0 \text{ then } y &= a + b_1 x_0 + b_2 (x - x_0) \end{aligned}$$

مدل نمائی مسطح: این مدل در شرایطی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک کننده کاهش می‌یابد. تغییر در مقدار Y معمولاً در ابتدا سریع رخ می‌دهد ولی همچنانکه

مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر HCl (۰/۵M) متوقف و محصول حاصل با ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج و سپس اتیل استات بخار شد. ماده جامد باقیمانده در سه میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار حل شد و غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با ضریب خاموشی معادل ۹۵۰۰ تعیین شد.

پرولین: برای تعیین مقدار پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ابتدا پنج گرم از نمونه‌های عصاره ریشه کنگر در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک سه درصد توسط هاون هموژن شده و عصاره بدست آمده صاف شد. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده حاصله ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲ میلی‌لیتر اسید ناینهیدرین (۰/۵ گرم ناینهیدرین، ۲/۱ میلی‌لیتر اسید استیک و ۰/۸ میلی‌لیتر اسید اورتوفسفریک ۶ مولار) اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت یک ساعت در حمام آب و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، در ادامه برای پایان یافتن واکنش، لوله‌های آزمایش در داخل یک بستر یخی قرار گرفتند و چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تولوئن با اسکپتروفوتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها بر حسب میکرومول بر گرم محاسبه شد.

در این پژوهش برای تعیین حداکثر فعالیت بهینه آنزیمی در ترکیب تیماری کادمیوم با توجه به کمی بودن تیمارها از تجزیه رگرسیون غیرخطی

تا غلظت ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم با شیب‌های متفاوت افزایش و سپس در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم پس از رسیدن به بیشینه مقدار خود، روند نزولی به خود گرفت. بدین ترتیب که بیش‌ترین شیب کاهش فعالیت آنزیم در زمانی ایجاد شد که بنه ۳۰ روز در معرض کادمیوم قرار گرفت و میزان کاهش ۰/۱۲۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم بود (جدول ۱). فعالیت آنزیم در غلظت ۵ میلی‌مولار کادمیوم نسبت به شاهد کمتر بود و در مقابل در سایر غلظت‌ها، افزایش فعالیت PPO مشاهده شد. برخی مطالعات نمایانگر آن است که عملکرد این آنزیم با واکنش‌های مرتبط با فتوسنتز، تنفس و سنتز ترکیبات فنلی در ارتباط است. تصور می‌شود که PPO در مقابله گیاه با تنش کادمیوم نقش دارد. PPO سبب اکسایش ترکیبات فنلی به کوئینون‌ها و در نتیجه کاهش میزان این ترکیبات در بخش‌های مختلف گیاهان تحت تنش می‌شود. این عمل با تغییر سینتیک پراکسایش، منجر به کاهش سیالیت غشاء و ممانعت از انتشار رادیکال‌های آزاد شده و در نتیجه مقاومت گیاه نسبت به تنش کادمیوم افزایش می‌یابد (Unsal et al., 2020).

تأثیر کادمیوم بر فعالیت GPX نیز به مانند PPO از یک تابع دوتکه‌ای پیروی می‌کند (شکل ۲)، با این تفاوت که بیشینه فعالیت GPX در غلظت ۵ میلی‌مولار کادمیوم به دست آمد و این بدان معنی است که حساسیت فعالیت GPX به سطوح غلظتی کادمیوم بیشتر از PPO است. با افزایش غلظت کادمیوم تا غلظت ۵ میلی‌مولار فعالیت آنزیم در روزهای مختلف نمونه‌برداری به ترتیب با شیب‌های ۰/۰۰۱۱، ۰/۰۰۱۶، ۰/۰۰۱۴ و ۰/۰۰۱۸ واحد بر

Y به یک مقدار حداقلی نزدیک می‌شود، شیب کاهش در مقدار Y نیز به تدریج کاهش می‌یابد. فرم این مدل عبارت است از رابطه (۳):

$$Y = Y_m + (Y_0 - Y_m) \times \exp(-k \times X)$$

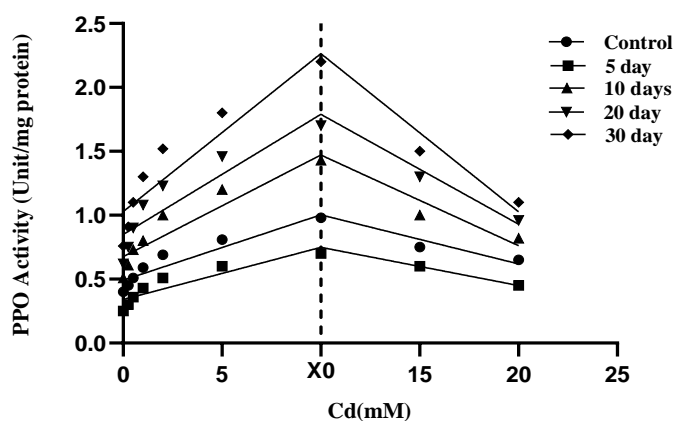
که در آن، Y_0 حداقل مقدار Y است که با افزایش در مقدار X، Y به آن نزدیک می‌شود، Y_m حداکثر مقدار Y و k، شیب کاهش مدل است. برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی و از رویه Proc nlin در محیط نرم افزار SAS (SAS, 2009) از روش مطلوب‌سازی تکراری و نرم افزار GraphPadPrism (Motulsky, 1999) بهره گرفته شد. در این روش با هر بار وارد کردن مقادیر اولیه فاکتورها، مقادیر نهائی آنها با روش کم‌ترین توان‌های دوم تخمین زده می‌شود و تغییر مقادیر اولیه تا زمانی انجام می‌شود که بهترین برآورد از فاکتورها به دست آید.

نتایج و بحث

در بررسی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسیدان در حضور کادمیوم، آنزیم‌های مورد بررسی، رفتارهای مختلفی را در طول زمان رشد از مرحله بنه تا مرحله گلدهی نشان دادند. دسته اول در برگیرنده آنزیم‌های PPO و CAT، دسته دوم شامل آنزیم PAL و دسته سوم شامل آنزیم‌های APX و SOD و دسته چهارم شامل آنزیم GPX است. بررسی کمی تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در زمان‌های متفاوت عصاره‌گیری از بنه زعفران نشان دادند پاسخ فعالیت این آنزیم به سطوح مختلف کادمیوم در همه زمان‌های عصاره‌گیری از یک تابع دو تکه‌ای تبعیت می‌کند (شکل ۱). فعالیت آنزیم در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری

مربوط به عصاره‌گیری پس از ۳۰ روز مشاهده شد (جدول ۲). در کل کمترین فعالیت آنزیمی در بنه هائی مشاهده شدند که در معرض تیمار با کادمیوم قرار نداشتند.

میلی گرم پروتئین بازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم، برای روزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ افزایش پیدا کرد و پس از رسیدن به غلظت ۵ میلی مولار، واکنش فعالیت آنزیم به افزایش غلظت کادمیوم نزولی شد و بیشینه شیب کاهش همچنان در تیمار



شکل ۱- تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز گیاهچه‌های زعفران.

Figure 1- The effect of cadmium on the activity of polyphenol oxidase enzyme in saffron seedlings.

جدول ۱- ضرایب برازش مدل دو تکه‌ای به تغییرات پلی فنل اکسیداز در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی

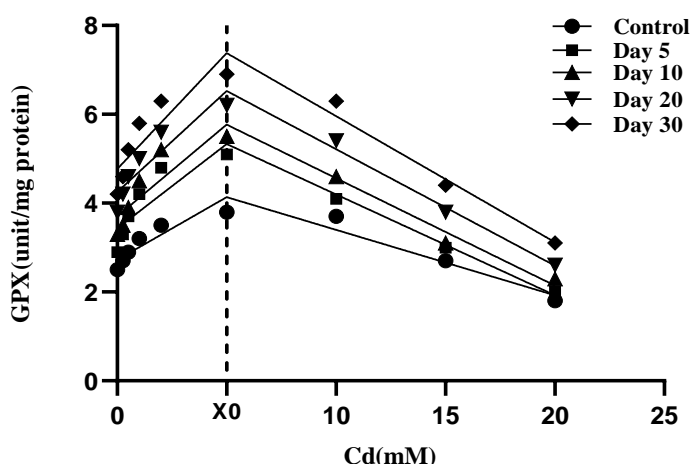
Table 1- Fitted Segmented model coefficients of PPO activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	intercept	b_1	b_2	X_0	R^2
Control	0.489	0.053	0.037	10	91
5	0.342	0.039	0.030	10	85
10	0.675	0.079	0.070	10	86
20	0.849	0.093	0.085	10	87
30	1.02	0.127	0.123	10	89

جدول ۲- ضرایب برازش مدل دو تکه‌ای به تغییرات گایاکل پراکسیداز در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی

Table 2- Fitted Segmented model coefficients of GPX activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	intercept	b_1	b_2	X_0	R^2
Control	2.90	0.282	0.147	5.0	90
5	3.76	0.380	0.227	5.0	96
10	4.06	0.419	0.241	5.0	98
20	4.60	0.455	0.262	5.0	97
30	5.10	0.522	0.289	5.0	98

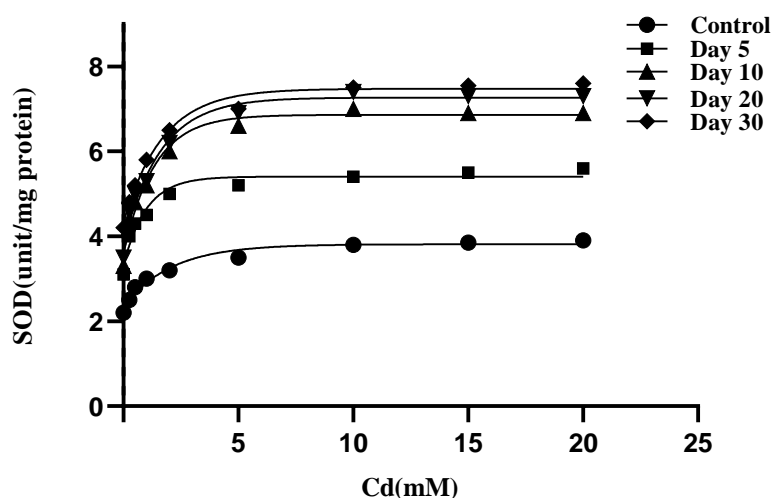


شکل ۲- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز گیاهچه‌های زعفران.

Figure 2- The effect of cadmium on the activity of guaiacol peroxidase enzyme in saffron seedlings.

گیاهان همواره در طول رشد خود، اکسیژن‌های فعال واکنش‌گر (ROS) را طی انجام فرایندهای متابولیکی در داخل یاخته‌ها، به وجود آورده که برای مقابله با آن‌ها بایستی از مسیرها و سازوکار-های ضد اکسیدانی پیچیده‌ای جهت حذف آنها بهره بگیرند. زیرا درصد تولید اکسیژن‌های واکنش‌گر فراتر از میزان نرمال بوده که مقابله با آن توسط گیاه سخت خواهد بود. عدم حذف اکسیژن‌های واکنش‌گر می‌تواند به انواع آسیب‌های اکسیداتیو از جمله اکسید شدن رنگدانه‌های فتوسنتزکننده و نیز خسارت به لیپیدها و پروتئین-های غشایی و تخریب اسیدهای نوکلئیک منجر شود (Laspina et al, 2005). بر این اساس آنزیم-های ضد اکسیدان وظیفه مهمی در سازگار نمودن و حفظ گیاهان در طول تنش بر عهده دارند که میزان فعالیت این آنزیم‌ها بسته به زمان ایجاد تنش و نوع تنش، گونه، تیره گیاه و این که در کدام بخش گیاه ایجاد شده، متفاوت است (Dinakar et al, 2009).

برعکس واکنش دو آنزیم GPX و PPO به سطوح مختلف کادمیوم در زمان‌های متفاوت در معرض تیماردهی، پاسخ آنزیم SOD به حضور کادمیوم در محیط در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری از یک تابع نمائی مسطح پیروی کرد (شکل ۳). بر همین اساس کمینه فعالیت آنزیم در تیمار شاهد و بیشینه فعالیت آنزیم در زمان ۳۰ روز پس از تیماردهی مشاهده شد (جدول ۳). ضریب K در مدل، بیانگر شیب افزایش فعالیت آنزیم در مقابل افزایش غلظت کادمیوم در محیط است. بیشترین شیب افزایش فعالیت SOD در غلظت ۱۰ میلی‌مولار و کمترین فعالیت آنزیم مربوط به تیمار شاهد بود. مقادیر بالای ضریب تبیین نیز موید برازش (Curve fitting) مطلوب مدل به داده‌های فعالیت آنزیم در سطوح مختلف کادمیوم هستند. همچنین نتایج نشان داد با افزایش قرارگیری بنه‌ها در محیط حاوی کادمیوم، افزایش فعالیت آنزیم نیز به تناسب زمان-های مختلف در شیب‌های مختلف به دست آمده است.



شکل ۳- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز گیاهچه های زعفران

Figure 3- The effect of cadmium on the activity of superoxide dismutase enzyme in saffron seedlings.

جدول ۳- ضرایب برازش مدل نمائی مسطح به تغییرات سوپر اکسید دسموتاز در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی

Table 3- Fitted Segmented model coefficients of SOD activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	Y_m	Y_0	K	R^2
Control	3.18	2.23	0.480	97
5	5.41	3.30	1.105	96
10	6.86	3.57	0.744	98
20	7.26	3.82	0.621	98
30	7.47	4.32	0.586	99

پلاسمایی و فعالیت های SOD و APX آپوپلاستی و سیم پلاستی را در برگ های هر دو گیاه فوق افزایش داد (Zhang et al., 2003). SOD اولین و مهمترین آنزیم در فرآیند سمیت زدایی ترکیبات ROS است که با تبدیل رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) به H_2O_2 در سیتوزول، کلروپلاست و میتوکندری، نقش مهمی در سازوکارهای دفاعی یاخته در مقابل خطر ایجاد رادیکال هیدروکسیل (OH) بر عهده دارد. آنزیم SOD حمایت کننده گیاهان در شرایط تنش فلزات سنگین، برای مقابله با گونه های فعال اکسیژن تولیدی در شرایط تنش

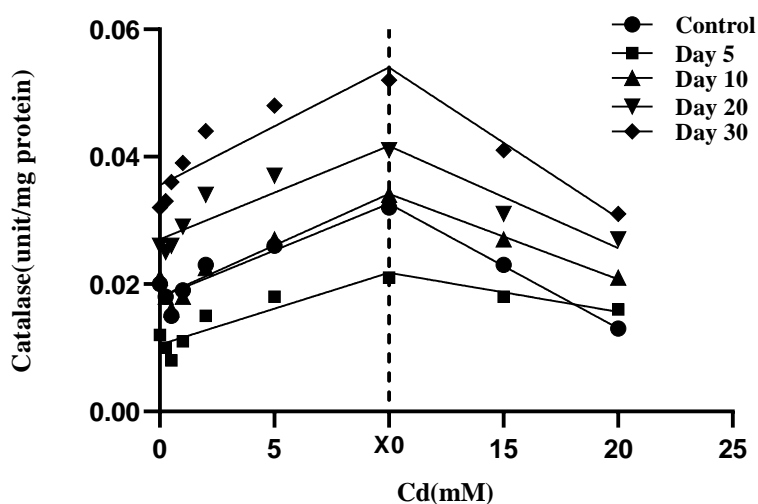
آنچه مشخص است این است که در حضور غلظت های کادمیوم بالاتر از ۰/۵ میلی مولار، تولید ترکیبات سمی ROS افزایش یافته و گیاه زعفران به منظور حذف رادیکال های تخریب گر و مقابله با آن، رویکرد افزایش تولید و القاء هر چه بیشتر آنزیم های ضد اکسیدانی را در پیش گرفته است (Tian et al., 2007). نتایج آزمایشات Zhang و همکاران (۲۰۰۳) بر گیاهان ماش علوفه ای و ماش سبز نشان دادند غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم تولید آنیون پراکسید، پراکسید هیدروژن و همچنین فعالیت NADH اکسیداز پیوند یافته با غشای

تا غلظت ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم با شیب‌های متفاوت افزایش و سپس در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم پس از رسیدن به بیشینه مقدار خود، روند نزولی بخود گرفت. بدین ترتیب که بیش‌ترین شیب کاهش فعالیت آنزیم در زمانی ایجاد شد که بنه ۳۰ روز در معرض کادمیوم قرار گرفت و میزان کاهش ۰/۰۰۲۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم بود (جدول ۱). فعالیت آنزیم کاتالاز به طور مشابه با پلی‌فنل اکسیداز در غلظت ۵ میلی‌مولار کادمیوم نسبت به شاهد کمتر بود و در مقابل در سایر غلظت‌ها، افزایش فعالیت کاتالاز مشاهده شد. پراکسید هیدروژن حاصله در مرحله بعدی توسط آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز حذف می‌شود (María et al., 2005). در ادامه فعالیت آنزیم CAT بعنوان آنزیم تاثیرگذار در تجزیه پراکسید هیدروژن، تحت تنش کادمیوم در بنه زعفران افزایش پیدا کرد. در نتیجه با افزایش فعالیت CAT، پراکسید هیدروژن با شکستن آن به آب و اکسیژن، حذف می‌شود. هر چند که پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا از خود سمیت نشان می‌دهد و به واسطه CAT و APX و سیکل ضد اکسیدانی آسکوربات گلوکاتیون از بین می‌رود، ولی در غلظت‌های کم، سیگنالی جهت فعال کردن ژن‌های وابسته به مقاومت در گیاه را بر عهده دارد (Unyayar et al., 2005). آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز با روش ANOVA یک‌طرفه نشان داد که فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های زعفران تیمار شده با کادمیوم در مقایسه با کنترل معنی‌دار ($P \leq 0/05$) است. تیمار با غلظت‌های مختلف کادمیوم موجب افزایش فعالیت

می‌باشد (Barandeh & Kavousi, 2016). با توجه به شکل ۱ با افزایش میزان کادمیوم، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافته که نشان‌دهنده تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه است، بنابراین SOD با تجزیه رادیکال‌های فعال اکسیژن به H_2O_2 تأثیر سمیت و تخریب‌کنندگی آن‌ها را از بین می‌برد. تنظیم سطح گونه‌های فعال اکسیژن توسط SOD، مسیر حفاظتی با اهمیتی در برابر تنش اکسیدی در یاخته است، زیرا O_2^- به عنوان پیش‌ساز برای مشتقات سمی‌تر یا مخرب‌تری مانند پر اکسید نیتريت یا HO^{\cdot} است (Khatun et al., 2008). افزایش غلظت فلز سنگین کادمیوم در محیط‌های رشد گیاهانی مانند *Achnatherum inebrians* (Zhang et al., 2010)، توت سفید (Tewari et al., 2008) و نیز لوبیا (Ahmadvand et al., 2013) با افزایش فعالیت و القاء فعالیت سوپراکسید دیسموتاز همراه است (Barandeh & Kavousi, 2016) در مجموع، SOD، از منابع تولید پراکسید هیدروژن در یاخته‌های گیاهی است که از مسیر دیسموتاسیون سوپراکسید منجر به تولید H_2O_2 می‌شود. نتایج حاصله از پژوهش Jafarhaddadian و همکاران (۲۰۲۱) نقش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کنترل میزان ROS و افزایش تحمل گیاه به تنش کادمیوم را نشان دادند که پژوهش انجام شده تأییدکننده این مهم است. نتایج تأثیر سطوح مختلف کادمیوم بر میزان فعالیت کاتالاز در زمان‌های متفاوت عصاره‌گیری از بنه زعفران نیز نشان دادند پاسخ فعالیت این آنزیم به سطوح مختلف کادمیوم در همه زمان‌های عصاره‌گیری از یک تابع دو تکه‌ای تبعیت می‌کند (شکل ۴). فعالیت آنزیم در تمامی زمان‌های نمونه برداری

بیشتر کادمیوم از ۱۰ تا ۲۰ میلی مولار با کاهش شدید فعالیت CAT در روزهای مختلف همراه بود و در روز ۳۰ ام، فعالیت آنزیم به $U/mg \text{ Protein}$ 0.03 کاهش داشت. با توجه به نتایج، کاتالاز با غلبه بر تنش اکسیداتیو به واسطه سم زدایی H_2O_2 ، از تولید رادیکال هیدروکسیل ممانعت و از پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها در برابر ROS محافظت می‌کند (Rastgoo & Alemzadeh, 2011). در این پژوهش فعالیت کاتالاز در معرض تنش کادمیوم افزایش داشت که علت آن نقش حفاظتی آنزیم در کنترل و تنظیم O_2^{2-} ، H_2O_2 و مکمل بودن نقش کاتالاز در کنار نقش سوپر اکسید دیسموتاز در متابولیسم یاخته است. افزایش در فعالیت کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به واسطه سمیت کادمیوم در یونجه یک ساله توسط Mohammadi و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش شده است.

CAT نسبت به کنترل شد. در بررسی تأثیر کادمیوم بر فعالیت CAT (شکل ۲) در روزهای مختلف صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، پروفایل یکسانی را نشان می‌دهد. طوری که در بنه زعفران در روز صفر و در عدم حضور کادمیوم، فعالیت $U/mg \text{ Protein}$ 0.02 را نشان می‌دهد و فعالیت CAT در روز ۵ ام از کشت به $U/mg \text{ Prot.}$ 0.011 کاهش داشت. به تدریج با گذشت زمان رشد بنه و ایجاد ساقه در روز دهم، فعالیت CAT دوباره افزایش داشت و به $U/mg \text{ Prot.}$ 0.021 رسید. فعالیت CAT در روز ۳۰ ام رشد یعنی زمان گلدهی به بیشترین میزان یعنی $U/mg \text{ Protein}$ 0.032 رسید. با افزایش غلظت کادمیوم از 0.25 تا 10 میلی مولار در روزهای مختلف، فعالیت CAT افزایش یافت، طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در روز سی ام و در حضور غلظت 10 میلی مولار کادمیوم و تا اندازه $U/mg \text{ Protein}$ 0.052 پروتئین به دست آمد، در حالی که افزایش



شکل ۴- تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهچه‌های زعفران.

Figure 4- The effect of cadmium on the activity of catalase enzyme in saffron seedlings.

جدول ۴- ضرایب برازش مدل دو تکه ای به تغییرات کاتالاز در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی
Table 4- Fitted Segmented model coefficients of CAT activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	intercept	b ₁	b ₂	X ₀	R ²
Control	0.017	0.0014	0.0019	10	91
5	0.010	0.0011	0.0006	10	85
10	0.017	0.0016	0.0013	10	92
20	0.027	0.0014	0.0016	10	87
30	0.035	0.0018	0.0023	10	88

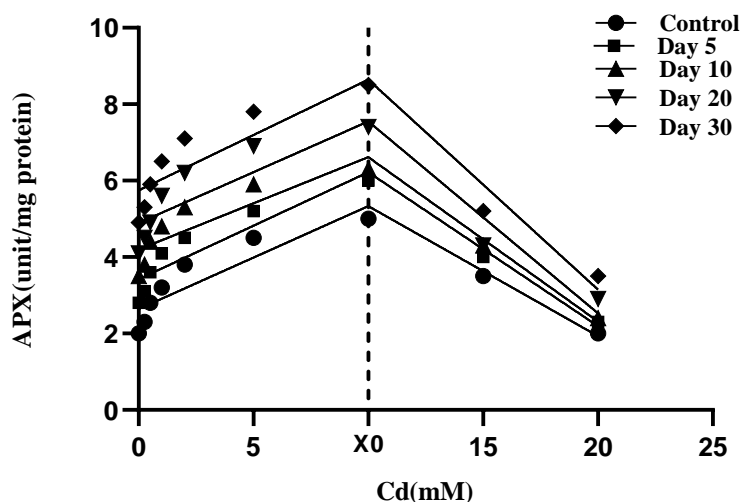
حذف H₂O₂ از محیط است. بنابراین H₂O₂ تولید شده در اندامک‌های دیگر یاخته و سیتوزول به وسیله APX از محیط حذف می‌شوند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان دادند به موازات افزایش فعالیت آنزیم SOD، فعالیت آنزیم APX نیز افزایش می‌یابد (Mittler et al., 2002). APX از آسکوربات به عنوان پیش ماده احیاکننده استفاده نموده و H₂O₂ را از روش سیکل آسکوربات-گلوتاتیون تجزیه می‌کند. در این سیکل با فعالیت آنزیم APX، آسکوربات به مونو دهیدروآسکوربات اکسید شده و برای ادامه چرخه، سنتز مجدد آسکوربات ضروری است. بنابراین طی این فرایند، آنزیم‌های مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز فعالیت نموده و با از NAD(P)H و گلوتاتیون، مجدداً در یاخته آسکوربات را سنتز می‌کنند (Mittler et al., 2002). افزایش در فعالیت CAT و APX در گیاهچه‌های زعفران قابل انتظار بود، به این علت که افزایش در فعالیت SOD سبب تولید H₂O₂ شده که در ادامه باید به کمک این آنزیم‌ها برای سمیت زدایی از محیط حذف شوند، تا وضعیت پتانسیل و احیای یاخته حفظ شود. بنابراین در

در این پژوهش، تأثیر کادمیوم بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز نیز به مانند پلی فنل اکسیداز، گایاکل پراکسیداز و کاتالاز از یک تابع دوتکه‌ای پیروی کرد (شکل ۵). با افزایش غلظت کادمیوم تا غلظت ۱۰ میلی‌مولار فعالیت آنزیم در روزهای مختلف نمونه‌برداری به ترتیب با شیب‌های: ۰/۲۶۹، ۰/۲۸۰، ۰/۳۱۴ و ۰/۲۶۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم، برای روزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ افزایش پیدا کرد و پس از رسیدن به غلظت ۱۰ میلی‌مولار، واکنش فعالیت آنزیم به افزایش غلظت کادمیوم نزولی بود و بیشینه شیب کاهش مربوط به عصاره‌گیری پس از ۳۰ روز حاصل آمد (جدول ۵). در کل کمترین فعالیت آنزیمی در بنه‌هایی مشاهده شد که در معرض تیمار با کادمیوم قرار نداشتند.

فعالیت آنزیم ضد اکسیدان آسکوربات پراکسیداز (APX) در اثر تنش کادمیوم به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. به‌طور معمول فعالیت آنزیم APX به موازات سایر آنزیم‌های ضد اکسیدان در پاسخ به عوامل تنش‌زای محیطی افزایش می‌یابد. آنزیم CAT و APX هر دو در حذف سمیت پراکسید هیدروژن نقش دارند با این تفاوت که CAT در پراکسیزوم یاخته‌ها واقع شده و قادر به

پژوهش‌های انجام شده دیگر بر روی گیاه گلرنگ، نتایج نشان‌دهنده افزایش فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسیددیسموتاز تحت تنش نیتراکادمیوم است (Badpa et al., 2015).

شرایط ایجاد تنش در حضور کادمیوم افزایش فعالیت SOD به تنهایی قادر به حفاظت از گیاه در برابر خطر رادیکال‌های اکسیژن نخواهد بود و افزایش فعالیت دیگر آنزیم‌ها مانند CAT و APX جهت حذف سمیت H_2O_2 ضروری است.



شکل ۵- تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گیاهچه‌های زعفران

Figure 5- The effect of cadmium on the activity of ascorbat peroxidase enzyme in saffron seedlings.

جدول ۵- ضرایب برازش مدل دو تکه ای به تغییرات آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از

تیماردهی

Table 5- Fitted Segmented model coefficients of APX activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

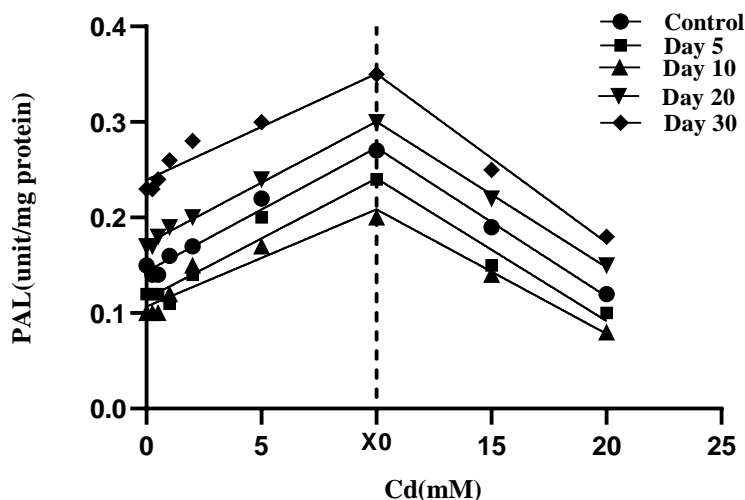
Day	intercept	b ₁	b ₂	X ₀	R ²
Control	2.64	0.269	0.340	10	90
5	3.42	0.280	0.402	10	95
10	4.41	0.314	0.545	10	95
20	4.89	0.265	0.502	10	92
30	5.74	0.289	0.549	10	86

رسید، اما میزان این فعالیت در زمان‌های مختلف عصاره‌گیری متفاوت بود و بیشینه آن در بنه‌ها، پس از ۳۰ روز قرارگیری در معرض کادمیوم مشاهده شد. شیب افزایش فعالیت این آنزیم نیز در همین زمان نمونه‌برداری بیشتر از سایر بنه‌هایی

نتایج حاصل از تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم PAL موید پاسخ دو تکه ای این آنزیم به سطوح مختلف کادمیوم در محیط بود (شکل ۶). فعالیت PAL در بنه‌های قرار گرفته در غلظت ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم اگرچه به بیشینه فعالیت خود

بود که کمتر در معرض تنش فلز سنگین کادمیوم قرار گرفته بودند (جدول ۶). شیب کاهش فعالیت آنزیم پس از نقطه چرخش مدل در غلظت ۱۰ میلی‌مولار، در بنه‌های قرار گرفته به مدت ۳۰ روز در معرض کادمیوم نیز بیشتر از دیگر زمان‌های نمونه‌برداری بود و این نشانگر حساسیت بیشتر فعالیت PAL به حضور کادمیوم در محیط پس از عبور از غلظت ۱۰ میلی‌مولار در محیط است. پژوهش‌های انجام شده بر روی گیاه بابونه تحت تنش کادمیوم و مس نشان دادند با افزایش فعالیت PAL همراه بوده است (Kovacic & Backor, 2007). در واقع آنزیم PAL بعنوان آغازگر مسیر فنیل پروپانویید، فنیل آلانین را با دآمینه کردن به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند (Solecka, 1997). بنابراین می‌توان گفت افزایش فعالیت آنزیم PAL راهکاری سلولی در جهت واکنش و مقابله با تنش‌های حاصله در گیاه است، زیرا ویژگی به دام‌اندازی رادیکال‌های اکسیژن را از ترکیبات فنلی تولید شده از خود بروز می‌دهد (Tian & Lee, 2007).

شکل ۶- تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز گیاهچه‌های زعفران.



شکل ۶- تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا-لیاز گیاهچه‌های زعفران.

Figure 6- The effect of cadmium on the activity of Phenylalanine ammonia-lyase enzyme in saffron seedlings.

جدول ۶- ضرایب برازش مدل دو تکه‌ای به تغییرات فنیل آلانین آمونیا-لیاز در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی

Table 6- Fitted Segmented model coefficients of PAL activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	intercept	b ₁	b ₂	X ₀	R ²
Control	0.143	0.0129	0.015	10	98
5	0.115	0.0125	0.014	10	94
10	0.106	0.0101	0.013	10	92
20	0.172	0.0127	0.015	10	99
30	0.239	0.0111	0.017	10	95

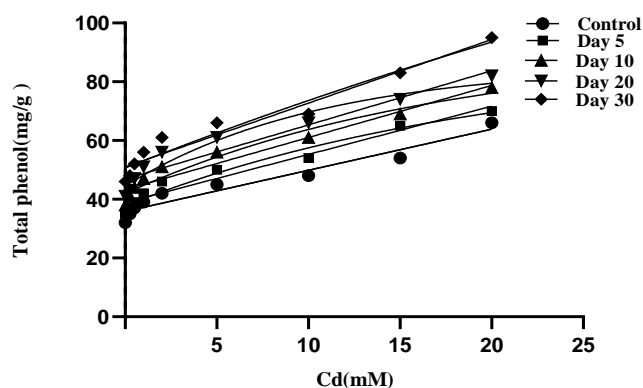
میزان محتوای ترکیبات فنلی در زمان گلدهی افزایش بیشتر و قابل توجهی را نسبت به سایر روزها از خود بروز می‌دهد. همچنین افزایش ترکیبات فنلی از غلظت صفر کادمیوم تا غلظت ۱۰ میلی‌مولار کادمیوم با شیب یکسانی در حال افزایش است، در حالی که در غلظت ۲۰ میلی-مولار میزان ترکیبات فنلی افزایش شدیدتری را نشان می‌دهند. افزایش میزان ترکیبات پلی‌فنلی در گیاه *Albizia procera* و گیاه چمن شور (*Aeluropus littoralis*) قرار گرفته در معرض تنش کادمیوم گزارش شده است (Pandey & Tripathi, 2011; Rastgoo & Alemzadeh, 2011). براساس نتایج این پژوهش یعنی از یک طرف افزایش تولید ترکیبات فنلی و رشد فعالیت PAL در گیاهچه‌های زعفران در معرض تنش کادمیوم و از سوی دیگر افزایش ترکیبات مختلف فنلی حاصل از فعالیت PAL به واسطه مسیر فنیل پروپانوئید، می‌توانند به عنوان عوامل ضد اکسیدان غیرآنزیمی، نقش مهمی در جهت مقابله گیاه زعفران در برابر تنش کادمیوم بر عهده داشته باشند. در واقع وقتی غلظت کادمیوم کم باشد، تولید اکسیژن واکنش‌گر در زعفران از طریق افزایش فعالیت پراکسیدازها خنثی شده که احتمالاً یک راهکار دفاعی عمومی برای جلوگیری از سمیت حاصل از متابولیت‌های حدواسط خواهد بود. زمانی که غلظت کادمیوم از غلظت ۱۰ تا ۲۰ میلی‌مولار باشد، گیاه در این شرایط با کاهش فعالیت ضد اکسیدانی مواجه خواهد بود. زیرا کادمیوم در غلظت بالا، به علت تولید ترکیبات ROS، کارکرد سیستم دفاع ضد اکسیدانی آنزیمی را کاسته و سبب تداخل در

آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی نیز نشان دادند پاسخ میزان تجمع این ترکیبات به سطوح مختلف کادمیوم از یک تابع رگرسیون خطی ساده پیروی می‌کند (شکل ۷). بدین معنی که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط بر میزان محتوای فنلی بنه افزوده می‌شود و بیشترین شیب افزایش در تیمار ۳۰ روزه تحت تنش کادمیوم بود. این افزایش برابر ۲/۱۶ میلی‌گرم در گرم بازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم حاصل آمد. این افزایش، وابسته به غلظت و وابسته به زمان رشد گیاهچه‌های زعفران بود، طوری که مقدار ترکیبات فنلی در ۲۰ میلی‌مولار به بالاترین مقدار خود رسید. کمترین افزایش تجمع ترکیبات فنلی نیز در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۷). محتوای ترکیبات فنلی در زمان گلدهی افزایش بیشتر و قابل توجهی نسبت به سایر روزها از خود بروز می‌دهد. ترکیبات فنلی به عنوان یکی از ترکیبات ضد اکسیدان دارای سازوکارهای مختلفی از جمله ربایش رادیکال‌های آزاد، خاموش کردن اکسیژن‌های فعال، شلات نمودن یون‌های فلزی هستند (Barandeh & Kavousi, 2016). این ترکیبات فنلی به عنوان پیش‌ماده آنزیم‌های پراکسیداز، با نقش ضد اکسیدانی خود با انتقال سریع هیدرژن به رادیکال‌های لیپیدی، از ادامه زنجیره پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کنند (Chu et al., 2000). سنتز ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در یاخته صورت می‌گیرد، هرچند که تنش‌های محیطی مقدار آن‌ها را در یاخته تغییر می‌دهد. نتایج این پژوهش نشان داد

کادمیوم در محیط است. مقدار آن برعکس آنزیم SOD در تیمار شاهد بیشترین بود. این نشان می‌دهد که میزان تجمع پرولین در زمان‌های اولیه قرارگیری در معرض کادمیوم بیشتر از زمان‌هایی بوده است که بنه به مدت بیشتری در معرض تنش کادمیوم قرار گرفته است. به عبارت دیگر سطح تجمع پرولین به محض قرارگیری بنه در معرض تنش کادمیوم، افزایش سریع یافته و تداوم قرارگیری آن در معرض کادمیوم با شیب کمتری سبب افزایش پرولین خواهد شد.

ظرفیت متابولیکی گیاه می‌شود (Javad Hassan et al., 2020)

تغییرات در میزان پرولین تحت تنش کادمیوم مشابه با ترکیبات فنلی و نیز پاسخ آنزیم SOD به حضور کادمیوم در محیط در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری و متفاوت با سایر آنزیم‌ها از یک تابع نمائی مسطح پیروی می‌کند (شکل ۷). بر همین اساس کمینه فعالیت آنزیم در تیمار شاهد و بیشینه فعالیت آنزیم در زمان ۳۰ روز پس از تیماردهی مشاهده شد (جدول ۷). مقدار ضریب K در مدل بیانگر شیب افزایش فعالیت آنزیم در مقابل افزایش غلظت



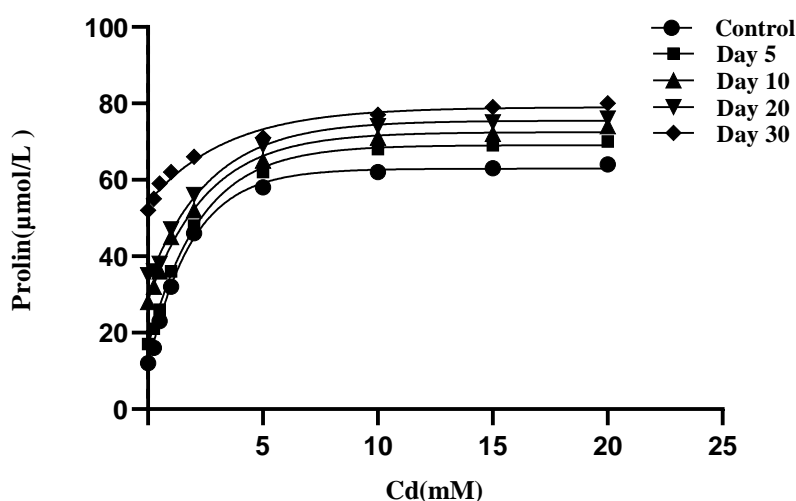
شکل ۷- تأثیر کادمیوم بر میزان محتوای ترکیبات فنلی گیاهچه‌های زعفران.

Figure 7- The effect of cadmium on the content of phenolic compounds in saffron seedlings.

جدول ۷- ضرایب برازش مدل رگرسیون خطی ساده به تغییرات کل محتویات فنلی در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی

Table 7- Fitted Linear regression model coefficients of total phenol activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	intercept	slope	R ²	Pvalue
Control	35.86	1.40	94	0.001
5	38.88	1.63	96	0.001
10	43.30	1.77	95	0.001
20	46.88	1.84	93	0.001
30	51.06	2.16	96	0.001



شکل ۸- تأثیر کادمیوم بر میزان محتوای پرولین گیاهچه‌های زعفران.

Figure 8-The effect of cadmium on the proline content of saffron seedlings.

جدول ۸- ضرایب برازش مدل نمائی مسطح به تغییرات پرولین در سطوح مختلف کادمیوم در روزهای مختلف پس از تیماردهی

Table 8- Fitted Segmented model coefficients of Proline activity vs. different level of Cd on various days level after treatment.

Day	Y_m	Y_0	K	R^2
Control	62.93	11.01	0.524	99
5	69.06	16.37	0.44	99
10	72.48	28.47	0.39	99
20	75.49	33.13	0.37	99
30	79.01	53.96	0.30	98

ساختاری ترکیبات آنزیمی ممانعت کند. همچنین پرولین به عنوان یک شلاته کننده (chelating agents)، فلزات از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری و غشاء را محافظت می کند (Matysik et al., 2002; Siripornadulsil et al., 2002; Hayat et al., 2012). نتایج مشابه پژوهش حال حاضر توسط آزمایشات Zhang و همکاران (2003) بر گیاهان ماش علوفه‌ای و ماش سبز تأیید شد که نتایج این پژوهشگران نیز افزایش فعالیت GPX آپوپلاستی در برگ‌های هر دو گونه به طور معنی داری نشان می‌دهد، به نحوی

تجمع پرولین به عنوان یک اسمولیت، جاروب کننده رادیکال‌ها، تثبیت کننده ماکرومولکول‌ها در گیاهانی که در معرض تنش هستند با کاهش دادن صدمات غشایی در یاخته و کاستن پتانسیل اسمزی سیتوپلاسمی مرتبط است (Smirnoff & Cumbes, 1989; Barandeh & Kavousi, 2016; Wallace, 1987; Levitt, 1980; Jain et al., 2001).

پرولین در زمان تنش در گیاهان توسط فلزات سنگین، افزایش یافته تا نقش حفاظت از فرم طبیعی پروتئین‌ها را انجام دهد و از تغییر ماهیت

زعفران است که خود حاصل متابولیسم هوازی یاخته‌ای هستند. پاسخ فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لاز و گالایکل پراکسیداز به سطوح مختلف کادمیوم از یک تابع دو تکه‌ای، پاسخ تجمع ترکیبات فنلی از تابع رگرسیون خطی و پاسخ سوپراکسید دسموتاز و تجمع پرولین به صورت تابع نمائی مسطح بود. براساس نتایج این پژوهش یعنی افزایش تولید ترکیبات فنلی و رشد فعالیت PAL در گیاهچه‌های زعفران در معرض تنش کادمیوم و همچنین افزایش ترکیبات مختلف فنلی حاصل فعالیت PAL به واسطه مسیر فنیل پروپانوئید، می‌تواند به عنوان یک بخش ضد اکسیدان غیر آنزیمی، نقش مهمی در جهت مقابله گیاه زعفران در برابر تنش کادمیوم بر عهده داشته باشد. در واقع وقتی غلظت کادمیوم کم باشد، تولید اکسیژن واکنش‌گر در زعفران با افزایش فعالیت پراکسیدازها خنثی شده که احتمالاً یک راهکار دفاعی عمومی برای جلوگیری از سمیت حاصل از متابولیت‌های حدواسط خواهد بود.

که در ماش سبز (غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم)، فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده مثل GPX، APX و گلوکاتیون ردوکتاز افزایش نشان دادند (Pietrini et al., 2003). نتایج Manzoor و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند در حضور کادمیوم، میزان فتوستتیز در پاسخی به کاهش کلروفیل در گیاهان مورد تیمار کادمیوم کاهش می‌یابد، زیرا کادمیوم در فعالیت آنزیم‌های مسیره‌ها و چرخه‌های مختلف آنابولیمی و کاتابولیمی و تثبیت سولفات اختلال ایجاد نموده و سبب تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود. این رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده احتمالاً با حمله به آنزیم‌های ضد اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو موجب مهار فعالیت GPX می‌شوند (Manzoor et al., 2022).

نتیجه گیری

در پژوهش حال حاضر تنش به وجود آمده در زعفران توسط فلز سنگین کادمیوم با افزایش فعالیت تمامی آنزیم‌ها به طور متفاوت تا غلظت-های خاصی همراه بود که این افزایش حاکی از ایجاد رادیکال‌های واکنش‌گر در گیاهچه‌های

References

- Ahmadvand, S., Bahmani, R., Habibi, D., & Forouzes, P. (2013). Investigation of cadmium chloride effect on growth parameters and some physiological characteristics in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 8(4), 167-182.
- Badpa, K., Movahhedi Dehanvi, M., & Yadavi, A. (2015). Interaction of cadmium nitrite and salicylic aside on antioxidant enzyme activity and leaf soluble protein and malondialdehyde of safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv. *Soffe*). *Journal of Plant Process and Function*, 3(9), 21-32. <https://jispp.iut.ac.ir/article-1-144-fa.html> [In Persian].
- Bafeel S. (2010). Physiological and biochemical aspects of tolerance in *Lepidium sativum* (cress) to Lead toxicity. *Catrina (Egyptian Society for Environmental Sciences)*, 5(1), 1-7.

- https://journals.ekb.eg/article_18476.html
- Barandeh, F & Kavousi, H. R. (2016). Effect of Cadmium on changes of some enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems in lentil seedlings (*Lens culinaris Medik.*). *Iranian Journal of Pulses Research*, 7(2), 125-137. <https://doi.org/10.22067/ijpr.v7i2.45542> [In Persian].
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cakmak, I., Strbac, D., & Marschner, H. (1993). Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany*, 44(1), 127-132. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.1.127>
- Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid contents of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Science*, 80, 561-566. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5<561:AID-JSFA574>3.0.CO;2.%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<561:AID-JSFA574>3.0.CO;2.%23)
- Damien, L. Callahan., Alan, J. M. B., Spasm, D. K., & Anthony, G. W. (2006) Metal ion ligands in hyper accumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11, 2-12. <https://doi.org/10.1007/s00775.005.0056.7>
- Dinakar, N., Nagajyothi, P. C., Suresh, S., Damodharam, T., & Suresh, C. (2009). Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea L.* *Journal of Environmental Biology*, 30(2), 289-294. <https://B2n.ir/y15727>
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1997). Superoxid dismutase. I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Goncalvez, J., Beker, A., Cargnelutti, D., Tabaldi, L., Pereira, L., Battisti, V., Spanevello, R., Morsch, V., Nicoloso, F., & Schetinger, M. (2007). Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedling. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 19, 223-232. <https://doi.org/10.1590/S167704202007000300006>
- Grill, E., Winnacker, E. L., & Zenk, M. H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 230, 674-676. <https://doi.org/10.1126/science.230.4726.674>
- Gomez, M., del Rio, L. A., & Sandalio, L. M. (2004). Cadmium induced subcellular accumulation of O₂- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell and Environment*, 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.13653040.2004.01217.x>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signaling and Behavior*, 7(11), 1456-1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., & Chang, C. (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted

- water body restoration by duckweed (*Lemnaminor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.12.005>
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., & Massacci, A. (2002). Antioxidant response to cadmium in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 977-982. [http://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01455-9](http://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01455-9)
- Jafarhaddadian, E., Zoufan, P., & 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. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2021.12.2156.1204> [In Persian].
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., & Sarin, N. B. (2001). Ameliorative effects of proline on salt stress induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis Hypogaea*L.). *Plant Cell Reports*, 20, 463-8. <https://doi.org/10.1007/s002990100353>
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2008). Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant, Soil and Environment*, 54(6), 262-270. <https://doi.org/10.17221/2787-PSE>
- Karimi, H., Mahdavi, S., Hasanzadeh, N., & Karimi, R. (2024). The effect of nano hydroxyapatite on physiological indices and enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of two grape cultivars under cadmium stress in soil. *Journal of Plant Biological Sciences*, 15(4), 1-22. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2024.14.1130.1363> [In Persian].
- Khatun, S., Babar Ali, M., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2008). Copper toxicity in *Withania somnifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 279-285. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.02.004>
- Kovacik, J., & Backor, M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. *Water, Air and Soil Pollution*, 185, 185-193. <http://doi.org/10.1007/s11270.007.9441.x>
- Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L., & Benavides, M. P. (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sciences*, 169(2), 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.007>
- Levitt, J. (1980). Responses of plant to environmental stress. water, radiation, salt and other stresses. *Academic Press New York*, 102, 4203-4208. <https://doi.org/10.1016/B978.0.12.445501.6.50016.6>
- Mahmoudi, F., Shikhzadehmosadegh, P., Zare, N., & Esmailpour, B. (2023). Effect of seed pretreatment with salicylic acid on seed germination, growth and biochemical indices of *Quinoa* seedlings (*Chenopodium quinoa* willd.) under cadmium stress. *Journal of Plant Biological Sciences*, 15(1), 1-26. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2024.13.8548.1330> [In Persian].
- Manzoor, H., Mehwish, Bukhat, S., Rasul, S., Rehmani, M. I. A., Noreen, S., Athar, H. U., Zafar, Z. U., Skalicky, M., Soufan, W., Brestic, M., Habib-Ur-Rahman, M., Ogbaga, C. C., & El Sabagh, A. (2022). Methyl jasmonate alleviated the adverse effects of cadmium stress in Pea (*Pisum*

- sativum* L.): A nexus of photosystem II activity and dynamics of redox balance. *Frontiers in Plant Science*, 13, 860664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860664>
- María, P., Benavides, Susana, M., Gallego & María, L. Tomaro. (2005). Cadmium toxicity in plants. *The Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 131-136. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>
- Matysik, J., Alia Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82(5), 525-532. <https://www.jstor.org/stable/24105959>
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/s1360.1385\(02\)02312.9](https://doi.org/10.1016/s1360.1385(02)02312.9)
- Mohammadi, M., Habibi, D., Ardakani, M., & Asgharzadeh, A. (2011). Effect of biologic fertilizers, humic acid and super absorbent polymer on chlorophyll content, membrane and superoxide dismutase and catalase activity in annual *Medicago* species under cadmium toxicity. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 6(2), 79-65. <https://www.sid.ir/paper/618276/en> [In Persian].
- Motulsky H. (1999). Analyzing data with GraphPad Prism, *A companion to GraphPad Prism version 3*, GraphPad software, Inc.
- Myung Min, H., Trick, H. N., & Rajasheka, E. B. (2009). Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166, 180-191. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.015>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in *spinach* chloroplast: in inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydro ascorbate radical. *Plant Cell Physiology*, 28, 131-140. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournal.s.pcp.a077268>
- Pandey, P., & Tripathi, A. K. (2011). Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* benth seedlings. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(5), 1009-1018. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20123244256>
- Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., & Massacci, A. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of (*Cav.*) *Trin. ex Steudel*. *Plant Physiology*, 133, 829-837. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026518>
- Polle, A., Eiblmeier, M., Sheppard, L., & Murray, M. (1997). Responses of antioxidative enzymes to elevated CO₂ in leaves of beech (*Fagus Sylvatica* L.) seedlings grown under a range of nutrient regimes. *Plant, Cell and Environment*, 20, 1317-1321. <https://doi.org/10.1046/j.13653040.1997.d01.23.x>
- Rastgoo, L., & Alemzadeh, A. (2011). Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science*, 5(4), 375-383. <https://B2n.ir/h77501>
- Salvato, J. A., Nemerow, N. L., & Agardy, F. J. (2003). *Environmental*

- Engineering. John Wiley and Sons, Inc.
- SAS. (2009). *Statistical analysis system, Version: 9.2*. Carry NC.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., & Pinelli, E. (2014). Heavy metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 232, 1-44.
<https://doi.org/10.1007/978.3.319.06746.9.1>
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D. S., & Sayre, R. T. (2002). Molecular mechanisms of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*, 14, 2837-47.
<https://doi.org/10.1105/tpc.004853>
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., & Dubey, R. S. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161, 1135-1144.
[https://doi.org/10.1016/S0168.9452\(01\)00517.9](https://doi.org/10.1016/S0168.9452(01)00517.9)
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057-60.
[https://doi.org/10.1016/0031.9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031.9422(89)80182-7)
- Solecka, D. (1997). Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factor. *Plant Physiology*, 19, 257-268.
<https://doi.org/10.1007/s11738.997.0001.1>
- Tewari, R. K., Kumar, P., & Sharma, P. N. (2008). Morphology and physiology of zinc stressed mulberry plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171, 286-294.
<https://doi.org/10.1002/jpln.200700222>
- Tian, X., & Li, Y. (2007). Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 50, 775-778.
<http://doi.org/10.1007/s10535.006.0129.7>
- Torres, E., Cid, A., Herrero, C., & Abalde, J. (2000). Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultra structure in the marine diatom *Bohlin*. *Water, Air and Soil Pollution*, 117, 1-14.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1005121012697>
- Unsal, V., Dalkıran, T., Çiçek, M., & Kölükçü, E. (2020). The role of natural antioxidants against reactive oxygen species produced by cadmium toxicity: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 184-202.
<https://doi.org/10.34172/apb.2020.023>
- Unyayar, S., Kele, Y., & Cekic, F.O. (2005). The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. *Plant Soil Environment*, 51(2), 57-64.
<http://dx.doi.org/10.17221/3556.PSE>
- Vassilev, A., Tsonev, T., & Yordanov, I. (1998). Physiological response of barley plants to cadmium contamination in soil during ontogenesis. *Environmental Pollution*, 103, 287-293.
[https://doi.org/10.1016/S0269.7491\(98\)00110.9](https://doi.org/10.1016/S0269.7491(98)00110.9)
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
<https://doi.org/10.1021/jf9801973>

- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., & Tan, R. X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low energy ultrasound in cell suspension cultures. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*, 15, 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.04.261>
- Wallace, D. M. (1987). Large and small scale phenol extraction methods in enzymology. *Academic Press, New York*. 33-41. [https://doi.org/10.1016/0076.6879\(87\)52007.9](https://doi.org/10.1016/0076.6879(87)52007.9)
- Zhang, F., Shi, W., Jim, Z., & Shen, Z. (2003). Response of antioxidative enzymes in *cucumber* chloroplasts to cadmium toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, 26, 1779-1788. <http://dx.doi.org/10.1081/PLN.120023282>
- Zhang, X., Fan, X., Li, C., & Nan, Z. (2010). Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. *Plant Growth Regulation*, 60, 91-97. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725.009.9422.8>