تأثیر عنصر کادمیوم بر برخی از فاکتورهای استرس اکسیداتیو درگیاه *Brassica oleracea* cv. saccata در محیط هیدروپونیک

معصومه برجیان[۱]، مریم خوش سخن مظفر*[۲]، معصومه خسروی رینه[۳]

تاریخ دریافت : ۹۵/۰۳/۳۰
تاریخ تصویب : ۹۵/۱۲/۱۱

چکیده

به منظور بررسی اثر عنصر کادمیوم بر برخی از فاکتورهای استرس اکسیداتیو در گیاه Brasicca oleracea L.cv saccata در محیط هیدرپونیک آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم طراحی شد.

نمونه های مورد نظر از بافت های برگ و ریشه گیاه بعد از ۱۴ روز تیمار با کلرید کادمیوم (Ca Cl۲) (۰/۵ و ۵ میکرومول در لیتر) برداشت شدند و میزان فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پلی فنول اکسیداز (PPO)، پراکسیداز محلول (SPO)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و همچنین شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اندام هوایی و ریشه و میزان فعالیت آنتوسیانین و کلروفیل a و b در اندام هوایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز در اندام هوایی در غلظت های ۰/۵ و ۵ کادمیوم و کاتالاز در اندام هوایی و ریشه در غلظت ۵ کادمیوم در مقایسه با گیاهان گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد.

۱-کارشناسی ارشد، واحد آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی ، آشتیان، ایران
*۲-استادیار گروه زیست شناسی، واحد قم ، دانشگاه آزاد اسلامی ، قم، ایران
(نویسنده مسئول m.khoshm@gmail.com)
۳- استادیار گروه زیست شناسی، واحد آشتیان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، آشتیان، ایران

پلی فنل اکسیداز افزایش معنی داری در غلظت ۵ کادمیوم و همچنین کاهش معنی داری در غلظت ۰/۵ کادمیوم در اندام هوایی در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در اندام هوایی در غلظت ۰/۵ کادمیوم و در ریشه در غلظت ۵ کادمیوم نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری یافت.

میزان آنتوسیانین کل در اندام هوایی در گیاهان تحت تیمار با غلظت های ۰/۵ و ۵ کادمیوم نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری نشان داد و بررسی میزان کلروفیل a و b برگ ها نشان داد که میزان تجمع در اندام هوایی با افزایش معنی دار برای غلظت ۵ کادمیوم همراه است. بنابراین نتایج به دست آمده نشان داد که کادمیوم در شرایط تنش اکسیداتیو بر روی برخی از فاکتورهای سیستم آنتی اکسیدان گیاه اثر داشته است.

واژه های کلیدی: سمیت کادمیوم، Brassica oleracea ، تنش اکسیداتیو، محیط هیدرو پونیک.

مقدمه

گیاه Brasicca oleracea L. cv saccata گونه گیاهی شامل بسیاری از ارقام از جمله کلم، گل‌کلم، کلم‌پیچ، کلم بروکسل می‌باشد. در فرم غیر مزروع خود آن‌را به عنوان کلم وحشی شناخته‌اند. این گیاه بومی سواحل جنوبی و غرب اروپا است. این گیاه یک گیاه دو سالانه می‌باشد و قادر به تشکیل روزت تنومند و دارای برگ بزرگ است. سازگاری این گیاه به شرایط محیطی دشوار است. این گیاه به عنوان گیاه مهم در کشاورزی به دلیل داشتن ذخایر غذایی فراوان و گیاه غنی از ویتامین‌ها از جمله ویتامین C پر اهمیت است (مظفری و همکاران، ۱۳۹۱). تنش‌های محیطی از قبیل خاک، آب و فلزات سنگین یکی از موانع اصلی در تولیدات محصولات کشاورزی و باغی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران محسوب می‌شوند. نظر به صنعتی شدن جوامع در دهه‌های اخیر و تولید مقادیر قابل توجهی پساب‌های صنعتی توسط کارخانجات و

رهاسازی آن‌ها در اکوسیستم طبیعی و روان آب‌ها، و از سوی دیگر افزایش استفاده از سوخت‌های فسیلی و احتمال بازگشت ترکیبات احتراق‌یافته به محیط خطر وقوع تنش غیرزنده تجمع فلزات سنگین را در خاک افزایش داده است (پیروز و همکاران، ۱۳۹۱).

عناصر سنگین عناصری هستند که وزن اتمی آن‌ها بین ٦٣/٥٤٦ تا ٢٠٠/٥٩٠ بوده و جرم مخصوص آن‌ها بزرگتر از ٥ گرم بر سانتیمتر مکعب است به این ترتیب عناصری از قبیل روی فلز کروم فلز کادمیوم، سرب، نیکل و نقره جز فلزات سنگین محسوب می‌شوند. عناصر سنگین اغلب به فرم اکسید، هیدروکسید، سیلیکات و سولفات و یا به صورت جذب شده یافت می‌شوند (رحیمی و رونقی، ۱۳۹۱).

در برخی گیاهان مانند چغندر قند تجمع کادمیوم در ریشه ٥ تا ١٠ برابر اندام هوایی آن بوده و در گیاه سویا نیز فقط ٢ درصد کادمیوم انباشته شده به برگ‌ها منتقل می‌شود (Ramos et al., 2002) اما تجمع کادمیوم در گیاه توتون در برگ‌های آن نیز اتفاق می‌افتد. کادمیوم اغلب در واکوئل‌های سلول‌های گیاهان عالی، همچنین در دیواره سلول و تیغه میانی بین آندودرم و دایره محیطیه گزارش شده است(Sharma et al., 2005). عوامل مهمی در جذب کادمیوم توسط گیاهان موثر می‌باشند که از جمله آن‌ها می‌توان به غلظت کادمیوم در خاک، میزان در دسترس بودن آن، تغییر شکل در حضور مواد آلی دیگر، pH خاک، پتانسیل احیا کنندگی، دما و غلظت فلزات دیگر اشاره کرد (Gardea-Torresdey et al., 2005; Blinda et al., 1997).

سمیت کادمیوم به شکل‌های مختلف دیده شده است که شامل کاهش عملکرد، کاهش رشد ریشه و برگ، تشکیل مالون دآلدئید(Grand et al., 1998).

این آسیب ها به دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن می باشد که در شرایط تنش مولکولی ناشی از کادمیوم بوجود می‌آیند (Schutzendubel and Polle, 2001). در این زمان آنزیم های مختلفی نظیرسوپر اکسید دیسموتاز ،کاتالاز، پلی فنول اکسیداز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز وارد عمل شده و با مکانیسم های مختلف این رادیکال ها را از بین می برند.

اکسیژن به اشکال مختلف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، بخصوص به فرم آنیون رادیکال آزاد سوپراکسید و پراکسید هیدروژن احیا می‌گردد، که خود این‌ها با ترکیبات سلولی واکنش داده سبب صدمات شدید یا جبران‌ناپذیری شده و در نهایت منتج به مرگ سلول می‌گردند.

تنش‌های محیطی گوناگون و محرک‌های داخلی سبب اختلال در رداکس از طریق افزایش تولید گونه های اکسیژن واکنشی (ROS (Reactive Oxygen species یا کاهش فعالیت

آنتی‌اکسیدانی می‌گردند که به همین سبب تنش آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد. در واکنش به افزایش ROS بروز ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد. در چنین شرایطی بروز ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های سلولی نیز کاهش می‌یابد و این حالت باعث مرگ سلول می‌شود (Gallego, 1996). از آنجا که گونه‌های *Brassica oleracea* به عنوان گیاهی با قدرت بالای تجمع کادمیوم ذکر شده است، این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های فلز کادمیوم بر القا تنش اکسیداتیو و تاثیرات آن بر فرایند های بیوشیمیایی در گیاه صورت گرفت.

مواد و روشها

کشت گیاه و انجام تیمار

برای انجام تحقیق بذر گیاه *Brassica oleracea* از شرکت فلات تهیه شد و به مدت ۳ دقیقه در محلول آب ژاول ۵ درصد ضد عفونی سطحی شدند و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس بذرها در پتری هایی که از نقاط بالا و پایین توسط کاغذ صافی پوشانده شده بودند، به مدت ۷ روز کشت داده شدند. سپس دانه رست ها به مدت ۷ روز به منظور سازگاری در شرایط کشت هیدروپونیک در دمای ۳ ± ۲۷ قرار گرفتند. محلول غذایی تغییریافته هوگلند (۲/۱) دارای عناصر پرمصرف و کم مصرف به این شرح (pH=6) می‌باشند: (مقادیر بر حسب میلی مول) :Ca (NO3)2.4H2O: 2/5; KNO3: 2/5; MgSO4.7H2O: 1; KH2PO4: 0/5، (مقادیر بر حسب ppm) : Fe-EDTA: 3; H3BO3: 0/5; Mn (MnCl2.): 0/5; Zn (ZnCl2): 0/05، Cu (CuCl2.2H2O): 0/02; Mo (Na2MoO4): 0/02

نمونه ها به مدت ۱۴ روز با کلرید کادمیوم (cdcl2) در غلظت های ۰/۵و۵ میلی مولار کادمیوم تیمار داده شدند(Sandalio et al., 2001, Del Rio, 1985). محیط های کشت با پمپ هوادهی شده و هر ۵ روز یک بار تعویض می شدند و هر روز به میزانی که گیاه از محیط مصرف کرده بود به سطح ظرف اضافه می شد. تیماردهی با کادمیوم برای مدت ۱۴ روز انجام و سپس نمونه‌های شاهد و تیمارشده (هریک سه تکرار) برداشت شدند. پس از شستشو با آب مقطر، ساقه و ریشه گیاهان از محل یقه گیاه جدا و با نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

سنجش های بیوشیمیایی

برای استخراج و اندازه گیری فعایت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز از روش فتوشیمیایی Cakmak and Horst (۱۹۹۱)، آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano (۱۹۸۱)،

پراکسیداز محلول با استفاده از روش(Pandolfini et al., 1992) ، پلی فنول اکسیداز از روش Kahn (۱۹۷۵) ، سنجش میزان پراکسیدان لیپیدهای غشایی بر اساس روش Devos (۱۹۹۱)، سنجش میزان کلروفیل بافت برگ با روش Dlementina (۲۰۰۸) و اندازه گیری میزان آنتوسیانین کل با استفاده از روش Krizek (۱۹۹۸) انجام شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در طول موج ۵۶۰ نانومتر، کاتالاز در ۲۴۰ نانومتر، آسکوربات پراکسیداز در ۲۹۰ نانومتر، پراکسیداز محلول در ۴۷۰ نانومتر، پلی فنول اکسیداز در ۴۱۰ نانومتر، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر، میزان کلروفیل بافت برگ در ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر و میزان آنتوسیانین کل در ۵۳۰ نانومتر و بر حسب میلی گرم بر وزن تر گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

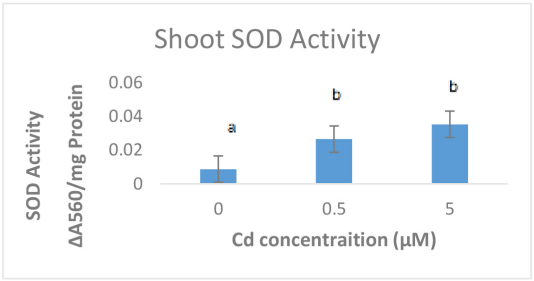
کلیه آنالیزها در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار، طراحی و انجام گرفت و سپس نتایج به دست آمده از گروه‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS ۲۱ و انجام تست آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان معنی‌دار بودن یا نبودن آن‌ها در سطح $p \leq ۰,۰۵$ بررسی شد.

نتایج

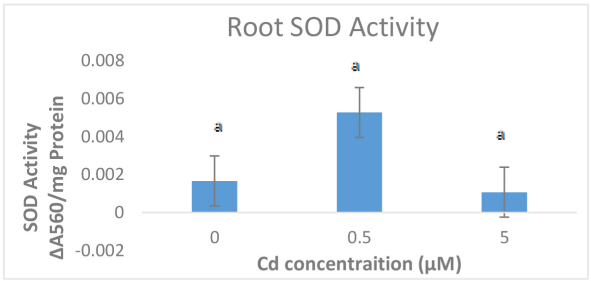
فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدان

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز(SOD)

نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از تیمار دو غلظت فلز سنگین کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاه *Brassica oleracea* نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در غلظت های ۰/۵ و ۵ اندام هوایی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری داشته است. در حالی که در این دو غلظت در ریشه، تاثیر کادمیوم معنی دار نیست (شکل ۱: الف و ب).



(الف)



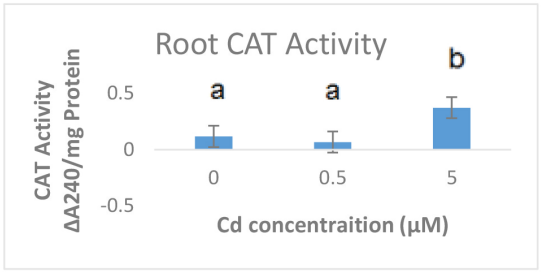
(ب)

شکل ۱: الف-فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تیمار با دوز های ۰/۵ و ۵ کادمیوم در ساقه تحت شرایط کنترل و تیمار.

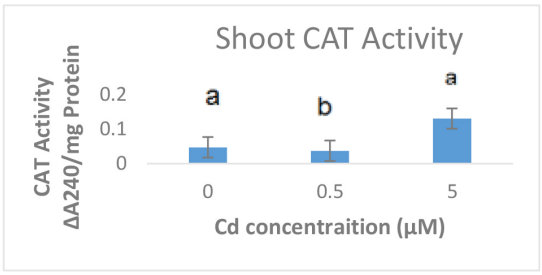
ب- فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در تیمار با دوز های ۰/۵و ۵ کادمیوم در ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار. داده ها میانگین سه تکرار و میله های عمودی نشان دهنده ی انحراف معیار می باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز(CAT)

تنش فلز سنگین کادمیوم باعث افزایش معنی دار در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی و ریشه تحت غلظت ۵ کادمیوم شده است (شکل۲: الف و ب).



(ب)

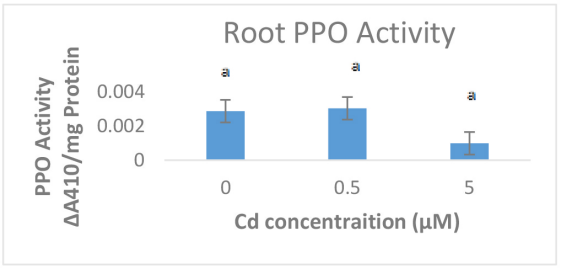


(الف)

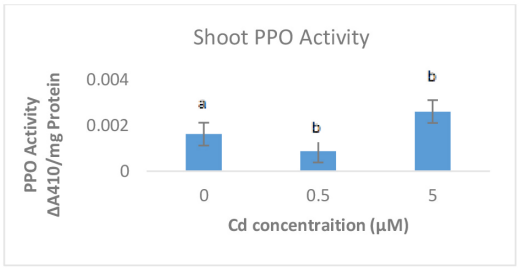
شکل ۲: الف – فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار با دوز های ۰/۵ و ۵ کادمیوم در ساقه تحت شرایط کنترل و تیمار. ب ـ فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار با دوز های ۰/۵ و ۵ کادمیوم در ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار. داده ها میانگین سه تکرار و میله ها ی عمودی نشان دهنده ی انحراف معیار می باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز (PPO)

نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از اثر دو غلظت ۰/۵ و ۵ کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز اندام هوایی گیاه *Brassica oleracea* با افزایش معنی داری در غلظت ۵ کادمیوم و کاهش معنی دار در غلظت ۰/۵ کادمیوم همراه بود در حالی که در غلظت ۰/۵ کادمیوم در ریشه این افزایش معنی دار نبود (شکل ۳: الف و ب).



(ب)



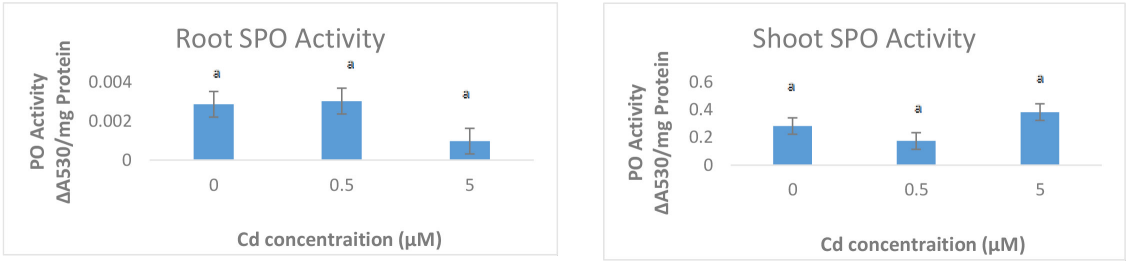
(الف)

شکل ۳ : الف-فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در تیمار با دوزهای ۰/۵و ۵ کادمیوم در ساقه تحت شرایط کنترل و تیمار.ب ـ فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در تیمار با دوزهای ۰/۵ و

۰/۵ کادمیوم در ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول (OP)

نتایج تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول گیاه *Brassica oleracea* تحت دو تیمار متفاوت کادمیوم نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در غلظت ۰/۵ کادمیوم در اندام هوایی و غلظت ۰/۵ کادمیوم در ریشه افزایش یافت در حالی که این افزایش در سطح ۰/۵ درصد معنی دار نبود (شکل ٤: الف و ب).

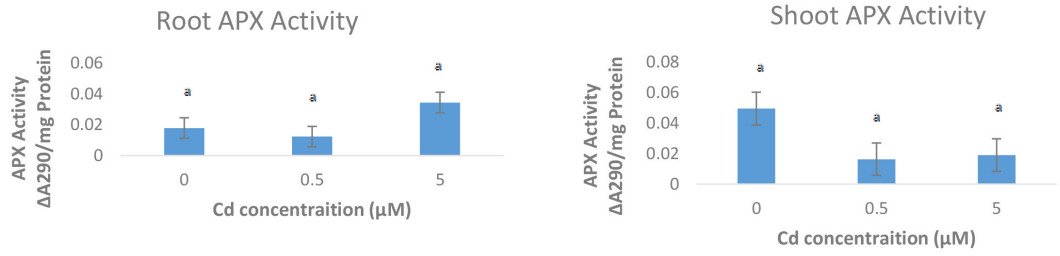


(ب) (الف)

شکل ٤: الف – فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار با دوزهای ۰/۵و ۵کادمیوم در ساقه تحت شرایط کنترل و تیمار. ب ـ فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار با دوزهای ۰/۵و۵ کادمیوم در ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(XPA)

نتایج حاصل از تیمار دو غلظت متفاوت فلز کادمیوم بر تجمع این فلز در ریشه و ساقه گیاه *B. oleracea* فقط با افزایش در غلظت ۰/۵ کادمیوم همراه بود که این افزایش در سطح ۰/۵ درصد معنی دار نبود (شکل ۵: الف و ب).

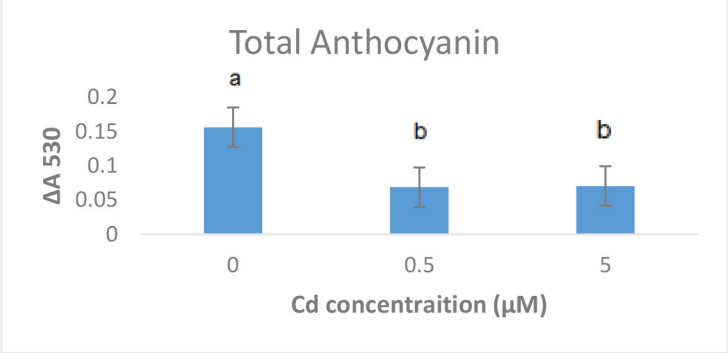


(ب) (الف)

شکل ۵ : الف – فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار با دوزهای ۰/۵و ۵ کادمیوم در اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تیمار، ب– فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار با دوزهای ۰/۵و ۵ کادمیوم در ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

آنتوسیانین کل اندام هوایی

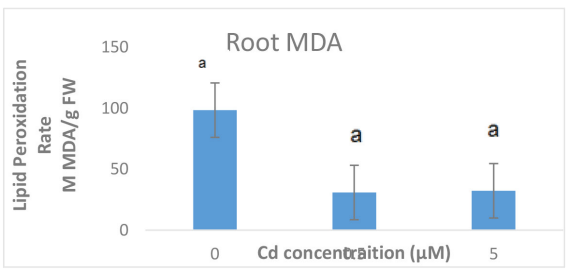
نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از اثر فلز سنگین کادمیوم بر میزان تجمع این فلز در اندام هوایی گیاه *B. oleracea* نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محلول های تیمار، تجمع آنتوسیانین کل در برگ های گیاه کاهش یافته است و این کاهش برای هر دو غلظت ۰/۵ و ۵ میکرومولار کادمیوم معنی دار بوده است (شکل ٦).



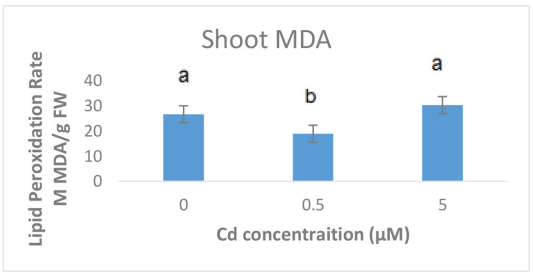
شکل ٦: میزان آنتوسیانین کل در تیمار با دوزهای ۰/۵ و ۵ کادمیوم در اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تیمار، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

میزان مالون دی آلدهید اندام هوایی و ریشه (ADM)

نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از تنش فلز سنگین کادمیوم بر میزان مالون دی آلدهید در اندام هوایی گیاه *B. oleracea* نشان داد که میزان این ترکیب سمی در اندام هوایی تحت تیمار غلظت ۰/۵ کادمیوم کاهش معنی داری یافت (شکل ۷:الف).



(ب)

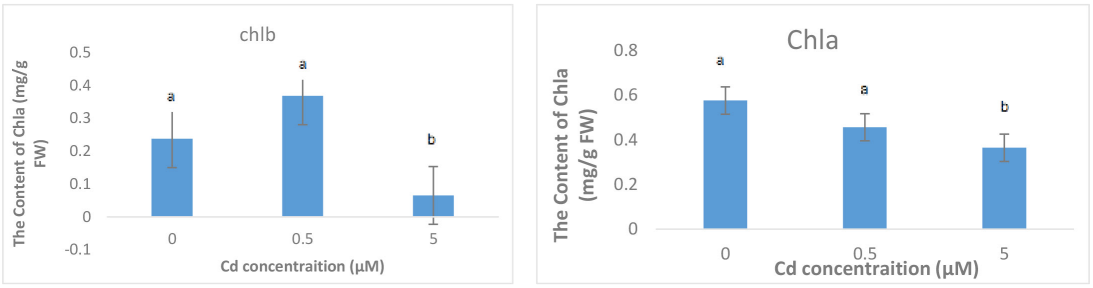


(الف)

شکل ۷: الف – میزان مالون دی آلدهید در تیمار با دوزهای ۰/۵ و ۵ کادمیوم در اندام هوایی تحت شرایط کنترل و تیمار،ب – ADM در تیمار با دوزهای ۰/۵ و ۵ کادمیوم در ریشه تحت شرایط کنترل و تیمار داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

میزان کلروفیل a و b

نتایج آنالیز واریانس داده های حاصل از اثر تیمار ۲ غلظت فلز سنگین کادمیوم بر محتوای کلروفیل a و b نشان داد که میزان کلروفیل a و b گیاه با افزایش غلظت کادمیوم کاهش یافت که این روند کاهش در غلظت ۵ کادمیوم معنی دار بوده است (شکل۸ : الف و ب).



(ب) (الف)

شکل ۸ : الف – میزان کلروفیل a در تیمار با دوزهای ۰/۵و۵ کادمیوم در برگ تحت شرایط کنترل و تیمار، ب- کلروفیل b در تیمار با دوزهای ۰/۵و۵ کادمیوم در برگ تحت شرایط کنترل و تیمار، داده‌ها میانگین سه تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد. حروف غیریکسان نشان دهنده ی معنی داری و حروف یکسان نشان دهنده ی عدم معنی داری است.

ظاهر گیاه

همانطور که در شکل ۹ نشان داده شده است، در تیمار با انتراسن، ظاهر گیاه از حالت عادی خارج شده و از میزان شادابی، رنگیزه های کلروفیل و آنتوسیانین کاسته شده است.

الف

ب

ج

شکل ۹: الف- گیاهان شاهد، ب- گیاهان تحت تیمار با دوز ۵,۰ کادمیوم ج- گیاهان تحت تیمار با دوز ۵ کادمیوم

بحث

علی رغم این که مطالعات متعددی در ارتباط با سمیت کادمیوم صورت گرفته است، به دلیل کشاورزی بودن و مصرف بالای گیاه کلم قرمز، اثر این عنصر در سیستم آنتی اکسیدانی و ایجاد ترکیبات SOR در گیاه مذکور ضروری به نظر می رسد. گونه های فعال اکسیژن در فرایندهای انتقال الکترون در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم ها تشکیل می شوند. گیاهان در شرایط فیزیولوژیک با فعالیت متابولیت ها و آنزیم های مختلف آنتی اکسیدان غلظت گونه های فعال اکسیژن را کنترل می کند افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدان در تیمار کادمیوم در گیاه *Brassica oleracea* نشان می دهد که در مکانیسم تحمل در آن، سرکوب تخریب اکسیداتیو با تحریک آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز است. دیسموتاسیون آنیون های سوپراکسید توسط SOD و به دنبال آن افزایش کاتالاز و جاروب کردن H2O2 سبب تنظیم فعالیت پراکسیدازهای مختلف سلول مانند APX می شود (Dat et al., 2000). SOD اولین سد دفاعی را تشکیل می دهد که رادیکال های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می کند. سپس پرواکسید هیدروژن می تواند توسط آنزیم آسکوربات پرواکسیداز در سیکل آسکوربات-گلوتاتیون که در کلروپلاست عمل می کند یا توسط پرواکسیداز در دیواره سلولی و سیتوپلاسم و یا توسط کاتالاز در پراکسی زوم و میتوکندری به آب و اکسیژن ملکولی تجزیه گردد (Mishra et al., 2006, Chen et al., 2003). نتایج حاصل از دو تیمار ۵,۰ و ۵ مختلف کادمیوم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه Brassica oleracea بیانگر افزایش معنی دار فعالیت SOD به منظور حذف رادیکال سوپراکسید ناشی از تیمار کادمیوم در اندام هوایی در غلظت ۵ و ۵,۰ کادمیوم می باشد (شکل ۱: الف). Sharma و Dubey در سال ۵۰۰۲ نشان دادند که تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار کادمیوم سبب افزایش فعالیت SOD در گیاه گندم می شود.

یکی از آنزیم‌های دفاعی مهم کاتالاز است که در همه‌ی موجودات زنده تحت تنش تولید می‌شود. این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسید هیدروژن، سبب کاهش اثرهای سمی آن می‌شود (Wang, 2008). در این آزمایش تیمار کادمیوم سبب افزایش فعالیت کاتالاز شد به طوری که این افزایش در غلظت ۵ کادمیوم در اندام هوایی و غلظت ۵ کادمیوم در ریشه معنی دار بود (شکل ۲ : الف و ب). افزایش فعالیت این آنزیم بیانگر پاسخ گیاه به افزایش میزان H2O2در جهت حذف آن می باشد (Mishra et al., 2006). که این امر همسو با تحقیقی است که توسط Weisang و همکارانش در سال ۲۱۰۲ در گیاه سویا Glysine max صورت گرفت و افزایش میزان کاتالاز تحت شرایط تنش شوری را نشان داد (Weisang et al., 2012).

فلاونوئیدها یا ترکیبات فنلی در سیتوپلاسم و نیز سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی اکسیدانی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش حفاظتی دارند. اکسیداسیون فلاونوئیدها (بویژه – o دی فنل‌ها) در شرایط تنش سبب تولید ترکیبات جاروب‌کننده H2O2 مانند سمی کوئینون‌ها و کوییونون‌ها می‌گردد (Dai et al., 2006). پلی فنل اکسیداز در مجاورت مولکول اکسیژن کاتالیز نوعی کوئینون

از فنل‌ها را انجام می دهد. البته، هم شرایط رشد مانند بروز شرایط تنش و هم نوع ژنوتیپ بر فعالیت پلی فنل اکسیداز اثر می‌گذارد (Winkel-Shirley, 2002; Mayer, 2006). نتایج نشان داد که با افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنزیم PPO با دوز ۰/۵ کادمیوم در ریشه و با دوز ۵ در اندام هوایی افزایش یافت (شکل ۳: الف وب) که این امر نشان‌دهنده افزایش ترکیبات فنولی به ویژه فلاوونوئیدها در شرایط تنش می‌باشد. بنا بر گزارش Aksoy و همکارانش در سال ۲۱۰۲ افزایش پلی فنول اکسیداز در اندام هوایی و ریشه گیاه سویا Glysin max تحت تیمار کادمیوم و تنش شوری گزارش کرده اند (Aksoy et al., 2012). درعین حال در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم PPO در اندام هوایی در دوز ۰/۵ کادمیوم کاهش معنی داری نشان داد. مطالعه Rivero و همکارانش در سال ۵۰۰۲ کاهش PPO در برگ گوجه تحت تنش گرما گزارش کردند (Rivero et al., 2003). Chen و همکارانش نیز در سال ۰۰۰۲ کاهش فعالیت پلی فنل اکسیداز در ریشه گیاهان تحت تنش مس و کادمیوم گزارش کردند(Chen et al., 2003) که احتمالاً کاهش در میزان PPO در این تحقیق نیز به دلیل غیر فعال شدن آنزیم پلی فنول اکسیداز تحت تیمار فلز سنگین کادمیوم می باشد.

پراکسیدازها گروه بزرگ دیگری از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شوند. آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROS ها جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROS قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوزول، واکوئل، کلروپلاست و آپولاست وجود دارند (Levitt, 2009). به طور کلی بخش محلول پراکسیداز که از گایاکول به عنوان انتقال الکترون استفاده می کند در پاسخ های گیاه به شرایط تنش نقش دارد (Peng and Kuc, 1992). در تحقیق حاضر نیز به نظر می رسد افزایش فعالیت PO به طور غیر معنی دار در ریشه تیمار با دوز ۰/۵ کادمیوم و در تیمار ۵ کادمیوم در اندام هوایی نسبت به گروه شاهد متناسب با افزایش میزان H2O2 و ویژگی آنتی اکسیدانی این آنزیم در شرایط تنش مربوط می باشد (شکل ٤ : الف وب). بنا به گزارش Prasad and Strzalkaدر سال ۲۰۰۲ در گیاه خردل هندی و Erdei در گیاه جو تحت تیمار روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی به علت تولید H2O2 ناشی از تیمار روی دارای افزایش است که با نتایج کار ما مطابقت دارد (Prasad and Strzalka, 2002, Erdei et al., 2002). آنزیم آسکوربات پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسی زوم سلول‌های گیاهی به آب تبدیل می‌کند و پتانسیل هیدروژن لازم را از آسکوربات احیا می‌کند(Pignocchi and Foyer, 2003; Conklin, 2001). فعالیت APX در ریشه در دوز ۵ تیمار شده با کادمیوم به طور غیر معنی داری افزایش می یابد (شکل ۵ـ ب) که می تواند ناشی از توانایی سلول های ریشه در مواجهه با پراکسید هیدروژن ایجاد شده از فعالیت آنزیم SOD باشد. بنا به گزارش قناتی و نعمتی در سال ۹۸۳۱ افزایش APX در ریشه گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandifelora*) تحت تیمار آلومینیوم گزارش شد که مطابق با تحقیقات حاضر می باشد. بنابراین به نظر می

رسد آسکوربیک اسید به عنوان یک مکانیسم دفاع غیر آنزیمی نقش کلیدی در ایجاد مقاومت *Brassica oleracea* در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط فلز کادمیوم ایفا کرده است.

در این تحقیق نتایج حاصل از دو غلظت مختلف کادمیوم بر تولید مالون دی آلدهید در اندام هوایی گیاه *Brassica oleracea* در غلظت ۰/۵ کادمیوم کاهش معنی داری نسبت به گروه شاهد نشان داد (شکل ۷: الف) که بیانگر اینست که سیستم آنتی اکسیدانی گیاه توانایی از بین بردن رادیکال های آزاد را داشته و توانسته بر کمپلکس تیوباربیوتیک اسید TBA با مالون دی آلدهید غلبه کند و از خسارت اکسیداتیو به گیاه جلوگیری کند (Mamdouh, 2007). که این نتایج با یافته های قناتی و نعمتی در سال ۹۸۳۱ مبنی بر کاهش میزان مالون دی آلدهید در ریشه گیاه لیسیانتوس تحت تأثیر عنصر کادمیوم، به دنبال افزایش کاتالاز و کاهش H2O2 و در نتیجه کاهش آسیب به غشای پلاسمایی مطابقت دارد (قناتی و نعمتی، ۹۸۳۱).گزارش شده است در گیاه گندم *Triticum aestivum* نیز تحت تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت های تنش شوری فرایند پرواکسیداسیون لیپیدها آغاز شده و محتوای مالون دی آلدهید (MDA) گیاه کاهش یافته است (دولت-آبادیان و همکاران.، ۱۳۸۷).

از جمله فرآیندهایی که تحت تأثیر تنش ناشی از فلزات سنگین قرار می‌گیرد فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسنتزی است. فلزات سنگین کاهش فتوسنتز را ممکن است از طریق آسیب به سازماندهی فراساختاری کلروپلاست، تغییر در متابولیت‌های فتوسنتزی، جایگزینی یون‌هایی مانند منیزیم و منگنز و غیره با سرب در کلروپلاست و ممانعت از ساختن یا تجزیه رنگیزه‌های فتوسنتزی القاء کند (Reddy et al., 2005).

به دلیل تاثیر فلزات بر بیوسنتز کلروفیل و ایجاد تنش اکسیداتیو محتوای کلروفیل در برگ می‌تواند معیاری برای سنجش بروز سمیت محسوب شود. گزارش های متعددی مبنی بر اثر فلز کادمیوم بر محتوای رنگیزه های فتوسنتزی مانند کلروفیل a و b در بسیاری از گونه های گیاهی وجود دارد. که این کاهش به اثر بازدارنده کادمیوم بر جذب آهن و منگنز و نیز مهار آنزیم های گروه سولفیدریل شرکت کننده در مسیر بیوسنتز رنگیزه ها توسط کادمیوم عنوان شده است (Prasad and Strzalka, 2002). غلظت بالای کادمیوم، سنتز کلروفیل را از طریق مختل کردن جذب دیگر یون‌های اساسی مانند منیزیم و یا با افزایش آنزیم تخریب کننده کلروفیل (کلروفیلاز) کاهش می‌دهد (Van Assche and Clijsters, 1990).

فلزات سنگین به وسیله مهار آنزیم‌های گاما – آمینو لوالونیک اسید دهیدوژناز و پروتوکلروفیلد ردوکتاز سبب مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل می شوند (Khatib et al., 2008). در این پژوهش محتوای کلروفیل a و b تحت غلظت ۵ کادمیوم کاهش معنی داری با گیاهان گروه شاهد نشان داد (شکل ۸ : الف و ب، شکل ۹).

این نتایج با نتایج Yordanova و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در مورد کاهش محتوای کلروفیل a و b و به ویژه کلروفیل b بر روی گیاه ذرت تحت تنش غرقابی مطابقت دارد (Yordanova et al., 2003).

همچنین در مطالعات Mauchampa در سال ۴۰۰۲ دیده شده که فتو سیستم II یک جزء حساس فتوسنتز بوده که تحت تأثیر تنش‌های محیطی بوده و چون کلروفیل b بیشتری در این فتوسیستم موجود است، مقدار تخریب کلروفیل b بیشتر است (Mauchamp and Methy, 2004). به نظر می رسد کاهش میزان کلروفیل a و b در این تحقیق احتمالاً به دلیل افزایش کلروفیلاز، مهار بیوسنتز پروتوکلروفیلد و یا اختلال در جذب یون های اساسی مانند منیزیم و آهن به دلیل تنش ناشی از تیمار کادمیوم باشد. سیستم دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان سنتز برخی از ترکیبات آنتی اکسیدان مانند آنتوسیانین، کاروتنوئید، توکوفرول، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنولی مانند فلاوونوئیدها را القا می کند. این ترکیبات آنتی اکسیدان با رادیکال های آزاد واکنش داده، با دادن الکترون به این رادیکال های واکنش پذیر آنها را به شکل پایدار خود تبدیل می کند (Tripathi et al., 1999). آنتوسیانین ها به احتمال زیاد سبب تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول ها و جمع آوری آنها از سایر بخش ها می شوند (Tripathi et al.,2006). در این تحقیق با افزایش غلظت کادمیوم میزان آنتوسیانین در غلظت های ۰/۵و ۵ کادمیوم نسبت به گیاهان گروه شاهد کاهش معنی داری یافته است (شکل ٦ و ۹). کاهش میزان آنتوسیانین در این پژوهش بیانگر این مطلب است که در غلظت های استفاده شده فلز کادمیوم به دنبال کاهش میزان کلروفیل a و b و کاهش ساخت قند در گیاه *Brassica oleracea* ، در ادامه کاهش میزان آنتوسیانین را به همراه داشته است.

کاهش میزان آنتوسیانین در شرایط تنش با کاهش میزان قند بر روی دو رقم گیاه کلزا *Brassica napos* نیز اثبات شده است تخریب ساختار کلروپلاست و ناپایداری کمپلکس‌های رنگدانه–پروتئین، تجزیه کلروفیل‌ها توسط آنزیم تخریب کننده‌ی کلروفیل (کلروفیلاز) موجب کاهش میزان کلروفیل و در نتیجه میزان قند می‌شود (Bertrand and Schoefs, 1999).

نتیجه‌گیری کلی

افرایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان در این مطالعه، می‌تواند باعث کاهش تولید و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) شده که قادرند با ایجاد تنش اکسیداتیو، تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی و رشد را مهار کند. در واقع با افزایش اثر آنزیم کاتالاز مخصوصا در غلظت ۵ و از بین رفتن H2O2 های موجود در گیاه، شاخص پراکسیداسیون لیپید کاهش می‌یابد. همچنین به دلیل تأثیر تنش کادمیوم بر آنزیم‌های تولید کلروفیل و فتوسیستم I و II، کلروفیل و به دنبال آن میزان قند و در نتیجه آنتوسیانین کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه در اکثر غلظت‌های کادمیوم در ریشه معنی‌داری در داده‌ها مشاهده نشد می‌توان نتیجه گرفت که عنصر کادمیوم سریعا از ریشه به ساقه انتقال پیدا می‌کند و تاثیر خودش را با تغییر در فاکتورهای استرس اکسیداتیو نشان می‌دهد. بر طبق یافته های حاصل از این پژوهش در غلظت های ۵,۰ و ۵ عنصر کادمیوم، گیاه Brasicca oleracea L. cv saccata مانند بعضی از گیاهان دیگر قدرت نگه‌داری عنصر سنگین کادمیوم را در ریشه خود ندارد و آن را به اندام هوایی انتقال می‌دهد.

منابع

پیروز، پ.، منوچهری کلانتری، خ.، نصیبی، ف. (۱۳۹۱) بررسی فیزیولوژیک گیاه آفتابگردان تحت تنش کروم. زیست گیاهی. سال ٤. شماره ۱۱. ٦٨ – ۳۷.

دولت آبادیان، آ.، مدرس ثانوی، ع.م.، اعتمادی، ف. (۱۳۸۷) اثر پیش تیمار اسید سالیسیلیک بر جوانه‌زنی بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش شوری. مجله زیست‌شناسی ایران جلد ۱۲. شماره ٤. ٥۱ – ٦۲.

قناتی،ف .، نعمتی ،ف. (۱۳۸۹) تأثیر مثبت آلومینیم در فعال کردن سیستم آنتی اکسیدان ریشه های گیاه لیسیانتوس(*Eustoma grandiflora* L.).شماره ۲. جلد ٤ .۱٤-۳٥.

رحیمی، طیبه.، رونقی، عبدالحمید. (۱۳۹۱) اثر کاربرد منابع مختلف روی بر غلظت کادمیوم و برخی عناصر کم مصرف در گیاه اسفناج در یک خاک اهکی. مجله علوم و فنون کشت‌های گلخانه ای جلد ۳. شماره ۲، صفحات۱۱۲-۱۰۱.

مظفری، ا.، حبیبی، د.، ملکی، ع.، بابایی، ف. (۱۳۹۱) ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم. مجله زراعت و اصلاح نباتات جلد ۸. شماره ۳. ۱-٤۱.

Aksoy, M., Seckİn Dİnler, B. (2012) Changes in Physiological Parameters and Some Antioxidant Enzymes Activities of Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Leaves Under Cadmium and Salt Stress. Journal of Stress Physiology & Biochemistry 8(4), 179-190

Bertrand, M. and Schoefs, B. (1999) Photosyntetic pigment metabolism in plants during stress. In: Handbook of plant and crop stress (ed. Pessarakli, M.). Marcel Dekker, New York 527-543.

Blinda, A., Koch, B., Ramanjulu, S., & Dietz, K. (1997) De novo synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. Plant, Cell & Environment 20(8), 969-981.

Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant 83(3), 463-468

Chen, Y., He, Y., Yang, Y., Yu, Y., Zheng, S., Tian, G., Wong, M. (2003) Effect of cadmium on nodulation and N2-fixation of soybean in contaminated soils. Chemosphere 50(6), 781-787.

Chen, Y., He, Y., Yang, Y., Yu, Y., Zheng, S., Tian, G., Wong, M. (2003) Effect of cadmium on nodulation and N2-fixation of soybean in contaminated soils. Chemo-

sphere 50(6), 781-787.

Conklin, P. (2001) Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant, Cell and Environment 24: 383-394.

Dai, L.P., Xiong, Z.T., Huang, Y., & Li, M.J. (2006) Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. Environmental toxicology 21(5), 505-512.

De Vos C.H.R., Schat H., De Waal M.A.D., Vooijs R., Ernst W.H.O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of root plasma membranein copper tolerant Cilene cucubalus. *Physiol. Plant* 82: 523-528.

Krizek, D. T., Britz, S. J., & Mirecki, R. M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. Physiologia Plantarum 103(1), 1-7.

Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Yanez, J., Gomez, M. (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. Journal of Inorganic Biochemistry 24. 25 - 34.

Erdei, S., Hegedûs, A., Hauptmann, G., Szalai, J., & Horváth, G. (2002) Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system. Acta Biologica Szegediensis 46(3-4), 89-90.

Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. plant sci 121: 151 – 159.

Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., De La Rosa, G., & Parsons, J. (2005) Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. Coordination Chemistry Reviews, 249(17) 1797-1810.

Grant, C., Buckley, W., Bailey, L., & Selles, F. (1998) Cadmium accumulation in crops. Canadian Journal of Plant Science 78(1), 1-17.

Hegedus, A., Erdei, S., & Horvath, G. (2001) Comparative studies of H2O2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Science 160(6) 1085-1093.

Khatib, M., Rashed Mohasel, M., Ganjali, A., & Lahouti, M. (2008) The effects of different nickel concentrations on some morpho-physiological characteristics of parsley (petroselinum crispum). Iranian journal of field crops research 2: 295-302.

Kahn V. (1975) Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties, Journal of the Science of Food and Agriculture 51: 145-161.

Levitt, J. (2009) Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses: Academic Press 2: 283-364.

Mamdouh, F. A. (2007) Chromium in receiving environment in Egypt (Overview). Electronical Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry 6: 2178-2198.

Mauchamp, A., & Methy, M. (2004) Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in Phragmites australis. Environmental and Experimental Botany 51(3), 227-235.

Mayer, A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. Phytochemistry 67(21), 2318-2331.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Govindarajan, R., Kuriakose, S., & Prasad, M. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiology and Biochemistry 44(1), 25-37.

Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinsch chloroplasys, Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry 95(2), 351-358.

Pandolfini F., Gabbrielli R., Comparini C. (1992) Nickel toxicity andperoxidase activity in seedlings of Triticum aestivum L., Plant and Cell Physiology 15: 719-725..

Pandey, N., Singh, A., Pathak, G., & Sharma, C. (2002) Effect of zinc on antioxidant response in maize (Zea mays L.) leaves. Indian journal of experimental biology 40(8), 954-956.

Peng, M., & Kuc, J. (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. Phytopathology 82(6),

696-699.

Pignocchi, C., & Foyer, C. H. (2003) Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. Current opinion in plant biology 6(4) 379-389.

Prasad, M., & Strzalka, K. (2002) Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants Springer 432.

Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. J., & Gárate, A. n. (2002) Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction. Plant science162(5) 761-767.

Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., & Sudhakar, C. (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). Chemosphere 60(1), 97-104.

Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Romero, L. (2003) Can grafting in tomato plants strengthen resistance to thermal stress? Journal of the Science of Food and Agriculture. Journal of the Science of Food and Agriculture 83:1315–1319.

Sandalio, L. M., & Del Río, L. A. (1988) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). Plant physiology 88(4), 1215-1218.

Schutzendubel, A. & Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stress: heavy metal – induced oxidative stress and protection by mycorhization. Exprimental Botany 53:1351-1365.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. and Polle, A. (2001) Cadmium-Induced Changes in Sharma Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in scots pine roots. Plant Physiology 127(3): 887-898.

Sharma, P., & Dubey, R. S. (2005) Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17(1), 35-52.

Sharma, S. S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K. C., Finkemeier, I., & Dietz, K.-J. (2004) Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. Plant science 166(5), 1287-1295.

Tripathi, B., Mehta, S., Amar, A., & Gaur, J. (2006) Oxidative stress in Scenedesmus sp. during short-and long-term exposure to Cu2+ and Zn2+. Chemosphere 62(4), 538.

Tripathi, A. K., Sadhna, T. and Tripathi, S. (1999) Changes in some physiological and biochemical characters in Albizia lebbek as bio-indicators of heavy metal toxicity. Journal of Environmental Biology 20: 93-98.

Van Assche, F., & Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant, Cell & Environment 13(3), 195-206.

Vassilev, A., & Yordanov, I. (1997) Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: a review. Bulgarian Journal of Plant Physiology 23(3-4), 114-133.

Wang, J. p., Raman, H., Zhang, G. p., Mendham, N., & Zhou, M. x. (2006) Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. Journal of Zhejiang University Science B 7(10), 769-787.

Weisany, W., Sohrabi, Y., Heidari, Gh., Siosemardeh, A and Ghassemi- Golezan, K. (2012) Changes in antioxidant enzymes activity and plant performances by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine mac* L.). POJ 5(2): 60-67.

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current opinion in plant biology 5(3), 218-223.

Wu, F., & Zhang, G. (2002) Alleviation of cadmium-toxicity by application of zinc and ascorbic acid in barley. Journal of plant nutrition 25(12), 2745-2761.

Yordanova, R. Y., Christov, K. N., & Popova, L. P. (2003) Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. Environmental and experimental botany 51(2), 93-101.