Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 2, Page 207-224 (2024)

DOI:10.22092/ijmapr.2023.362560.3331

Evaluation of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system of artichoke root extract against cadmium

Shahriar saeidian[1], Nabi khaliliaqdam[2*] and Sahar Bashipor[3]

1- Biology Department, Payame Noor University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Agriculture Department, Payame Noor University, Tehran, Iran, E-mail: Nkhaliliaqdam@pnu.ac.ir
3- M.Sc. graduated of Biochemistry, Biology Department, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: June 2023 Revised: October 2023 Accepted: November 2023

Abstract

Background and objectives: Plants have many defense systems to overcome stresses, especially heavy metals. Some heavy metals are part of pigments and enzyme compounds and are also essential elements. In concentrations higher than plants' physiological needs, they are toxic for plants, but some heavy metals such as cadmium and lead are even unnecessary. At low concentrations, they harm plants, and for this reason, heavy metals are considered stressors. Based on this, it is imperative to investigate these metals' effects on plant oxidizing enzymes' activities.

Methodology: In this research, in order to investigate the reaction of oxidizing enzymes and non-oxidizing factors against the stress caused by cadmium (Cd), the required artichoke after being prepared from the mountains of Kurdistan in the presence of phosphate buffer, pH 7 and PMSF 0.02 solution as Protease inhibitor was homogenized and after centrifugation at 3000 g and 15000 g, the upper clear solution was used as a crude extract and for subsequent measurements. In the performed tests, the effect of different concentrations of cadmium chloride ($CdCl_2$) were measured on the content of proline (Pro), phenolic compounds (Ph.C) and the activity of antioxidant enzymes such as phenyl-alanine-ammonialyse (PAL), catalase CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and polyphenol oxidase (PPO) of artichoke root. This project was carried out in the form of a completely randomized design in three replications in vials containing three milliliters of artichoke root extract with seven treatments, in which the first group was treated as a control in the presence of distilled water only. The second group was exposed to 0.25 mM $CdCl_2$, the third, fourth, fifth, sixth, and seventh groups were exposed to 0.5, 1, 2, 5, and 10 mM $CdCl_2$, respectively, for 10 minutes. The samples were treated at room temperature of 20 to 25 degrees and 10 minutes of natural light. Then, the activity level of each antioxidant enzyme and the level of Pro and Ph.C was measured separately. In this research, at first, the distribution diagram of the data (enzyme or protein activity against different levels of Cd) was drawn, and then various linear and non-linear regression equations were used to fit the data. In the next step, according to the best type of equation and analysis of the response type of GPX, SOD, APX, protein, Pro and Ph.C was used from nonlinear regression analysis (power, hyperbolic, asymptotic exponential and asymptotic growth models) and to express the response of enzyme activity of PPO, CAT and PAL to different levels of Cd were used from the beta model.

Results: All models indicated Cd's stimulating effect on the studied enzymes. The research results showed that the activity of all SOD, APX, CAT, PPO, GPX, and PAL enzymes as well as the content of Pro and Ph. C increased significantly after Cd treatment. Using five non-linear regression models, the highest activity of APX enzyme at a concentration of 4.6 mM (asymptotic exponential model), GPX enzyme at a concentration of 12.3 mM (asymptotic

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

exponential and asymptotic growth models), SOD enzyme at 14.3 mM (asymptotic growth model) was interpolated. In addition, the most production of Pro and Ph. C was obtained at concentrations of 13.6 and 14.3 mM Cd using the asymptotic and asymptotic growth models, respectively. The highest activity of the PPO enzyme was at 8 mM, CAT at 4.8 mM, and the maximum activity of PAL was at 1.4 mM. The results showed that Cd, due to the induction of oxidative stress and the increase in free radical production, leads to an increase in the content of proline, phenolic compounds, and the activity of antioxidant enzymes in artichoke roots. Further changes in the activity of these enzymes during growth indicate the presence of enzymatic regulatory mechanisms in artichoke roots against heavy metals such as cadmium. Enzymatic antioxidant defense systems, Pro and Ph. C play a crucial role in the response of artichoke roots to heavy metal cadmium stress.

Conclusion: In general, results showed that Cd, due to the induction of oxidative stress and the increase in free radical production, leads to an increase in the content of proline, phenolic compounds, and the activity of antioxidant enzymes in artichoke roots. Further changes in the activity of these enzymes during growth indicate the presence of enzymatic regulatory mechanisms in artichoke roots against heavy metals such as cadmium. Enzymatic antioxidant defense systems and Pro and Ph. C are crucial in the response to heavy metal cadmium stress of artichoke roots.

Keywords: Enzyme, heavy metal, phenolic compounds, artichoke.

ارزیابی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی عصاره ریشه گیاه کنگر (*Gundelia tournefortii* L.) در مواجه با کادمیوم

شهریار سعیدیان[۱]، نبی خلیلی اقدم[۲*] و سحر بشیرپور[۳]

۱- استادیار، گروه بیولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، پست الکترونیک: Nkhaliliaqdam@Pnu.ac.ir

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: سیستم‌های دفاعی متعددی برای غلبه گیاهان در برابر تنش‌ها و به‌ویژه تنش حاصل از فلزات سنگین وجود دارد. برخی فلزات سنگین به‌عنوان بخشی از ترکیب‌های مهم رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها هستند و از عناصر ضروری می‌باشند، در غلظت‌های بالاتر از نیاز فیزیولوژیک گیاهان برای گیاه سمی بوده ولی برخی دیگر از فلزات سنگین مانند کادمیوم و سرب به‌عنوان فلزات غیرضروری حتی در غلظت‌های پایین نیز آثار سمّی روی گیاهان دارند و به‌همین علت این فلزات سنگین به‌عنوان عوامل تنش‌زا برای گیاهان محسوب می‌شوند. بر این اساس، بررسی آثار این فلزات بر فعالیت‌های آنزیم‌های اکسیدانی گیاه حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق به منظور بررسی واکنش آنزیم‌های اکسیدانی و عوامل غیراکسیدانی در برابر تنش حاصل از کادمیوم، کنگر مورد نیاز پس از تهیه از کوهستان‌های کردستان در حضور بافر فسفات، pH ۷ و محلول ۰/۰۲ PMSF به‌عنوان مهارکننده پروتئازی هموژنیزه گردید و پس از انجام سانتریفوژ در دورهای ۳۰۰۰g و ۱۵۰۰۰ g، محلول شفاف بالایی به‌عنوان عصاره خام و انجام سنجش‌های بعدی استفاده شد. در سنجش‌های انجام شده، اثر غلظت‌های مختلف کلریدکادمیوم ($CdCl_2$) بر محتوای پرولین، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های ضداُکسیدان فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) ریشه کنگر سنجش گردید. این طرح در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در ویال‌های محتوی ۳ میلی‌لیتر از عصاره ریشه کنگر با ۷ تیمار اجرا شد که در آن، گروه اول به‌عنوان شاهد بود که تنها در حضور آب مقطر تیمار گردید. گروه دوم در معرض $CdCl_2$ ۰/۲۵ میلی‌مولار، گروه سوم، چهارم، پنجم، ششم و هفتم به‌ترتیب در حضور ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار به مدت ۱۰ دقیقه قبل از سنجش آنزیمی در دمای اتاق ۲۰ تا ۲۵ درجه و شرایط ۱۰ دقیقه نور طبیعی تیمار شدند. سپس میزان فعالیت یکایک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، میزان پرولین و محتوای فنلی آن به‌طور جداگانه اندازه‌گیری و سنجش شد. در این تحقیق نیز در ابتدا نمودار پراکنش داده‌ها (فعالیت آنزیم یا پروتئین در مقابل سطوح مختلف Cd) رسم و بعد برای برازش داده‌ها از انواع معادلات رگرسیون خطی و غیرخطی استفاده شد. در گام بعدی با توجه به برازش بهترین نوع رابطه و نیز تجزیه‌وتحلیل نوع پاسخ فعالیت آنزیم‌های GPX، SOD، APX، پروتئین، پرولین و محتوای فنلی از تجزیه رگرسیون غیرخطی (مدل‌های توانی، هذلولی، نمائی مجانب و رشد مجانب) و برای بیان نحوه پاسخ فعالیت آنزیم‌های PPO، CAT و PAL به سطوح مختلف کادمیوم از مدل بتا استفاده شد. نتایج همه مدل‌ها حکایت از اثر تحریک‌کنندگی Cd روی آنزیم‌های مورد مطالعه بود.

نتایج: نتایج تحقیق نشان داد که فعالیت همه آنزیم‌های SOD، APX، CAT، PPO، GPX و PAL و میزان پرولین و محتوای فنلی در نتیجه تیمار با کادمیوم به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. با استفاده از پنج مدل رگرسیون غیرخطی، بیشترین فعالیت آنزیم APX در غلظت ۴/۶ میلی‌مولار (مدل نمایی مجانب)، آنزیم GPX در غلظت ۱۲/۳ میلی‌مولار (مدل‌های نمایی مجانب و رشد مجانب) و آنزیم SOD در غلظت ۱۴/۳ میلی‌مولار (مدل رشد مجانب) درون‌یابی گردید. ضمن اینکه بیشترین تولید پرولین و محتوای فنلی نیز در غلظت‌های ۱۳/۶ و ۱۴/۳ میلی‌مولار کادمیوم با بهره‌گیری از مدل نمایی مجانب و رشد مجانب به‌ترتیب حاصل شد. بیشترین فعالیت آنزیم PPO در غلظت ۸ میلی‌مولار، CAT در غلظت ۴/۸ میلی‌مولار و بیشینه فعالیت PAL نیز مربوط به غلظت ۴/۱ میلی‌مولار بود. نتایج نشان می‌دهند که کادمیوم به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و افزایش

تولید رادیکال آزاد منجر به افزایش میزان محتوای پرولین، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه کنگر می‌گردد و در ادامه تغییرات میزان فعالیت این آنزیم‌ها در طول رشد، نشان‌دهنده وجود سازوکارهای تنظیمی آنزیمی در ریشه کنگر در برابر تنش فلزات سنگین مانند کادمیوم می‌باشد. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، پرولین و محتوای فنلی تولید شده نقش کلیدی در پاسخ گیاه ریشه کنگر به تنش فلز سنگین کادمیوم ایفاء می‌کنند.

نتیجه‌گیری: نتایج بنشان داد که کادمیوم به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال آزاد منجر به افزایش میزان محتوای پرولین، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه کنگر می‌گردد و در ادامه تغییرات میزان فعالیت این آنزیم‌ها در طول رشد، نشان‌دهنده وجود سازوکارهای تنظیمی آنزیمی در ریشه کنگر در برابر تنش فلزات سنگین مانند کادمیوم می‌باشد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، پرولین و محتوای فنلی تولید شده نقش کلیدی در پاسخ گیاه ریشه کنگر به تنش فلز سنگین کادمیوم ایفاء می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، فلز سنگین، ترکیب های فنلی، کنگر.

مقدمه

برخی فلزات سنگین مانند روی (Zn)، نیکل (Ni) و مس (Cu)، چون بخشی از ترکیب‌های مهم رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند، جزو عناصر ضروری محسوب می‌شوند و فقط در غلظت‌های بالاتر از نیاز فیزیولوژیک گیاهان آثار سمّی دارند ولی برخی دیگر از فلزات سنگین مانند کادمیوم و سرب جزء فلزات غیرضروری محسوب می‌گردند. این عناصر حتی در غلظت‌های پایین نیز آثار سمّی روی گیاهان دارند و به‌همین علت این فلزات سنگین به‌عنوان عوامل تنش‌زا برای گیاهان محسوب می‌شوند (Unyayar *et al.*, 2005). در بین فلزات سنگین، فلز کادمیوم به علت سمّیت قابل توجه، تحرک و پویایی زیاد در خاک و حلالیت بالا در آب و جذب سریع توسط سیستم ریشه‌ای بسیاری از گونه‌های گیاهی، نیمه عمر بیولوژیکی حدود ۲۰ سال و بروز عوارضی ازجمله نارسایی کبد و کلیه بیماری‌های قلبی-عروقی، استخوانی، ریوی و غیره در انسان دارای اهمیت خاصی می‌باشد (Vassilev *et al.*, 1998). منابع اصلی وجود کادمیوم در اراضی کشاورزی کاربرد درازمدت کودهای فسفاته، لجن فاضلاب و ته‌نشست اتمسفری است (Nagajyoti *et al.*, 2010). کادمیوم با انتقال از خاک به گیاه و بعد به زنجیره غذایی انسان، از سال‌ها قبل به‌عنوان یک نگرانی زیست محیطی مطرح است (Khan *et al.*, 2007). اولین پاسخ گیاهان به محض اینکه در معرض سطوح بالای فلزات سنگین از قبیل کادمیوم قرار می‌گیرند، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است. سمّیت فلزات سنگین به‌طور مستقیم از طریق واکنش هابرویس منجر به ROS و تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (Gill, 2010). سازوکارهای غیرمستقیم اثرگذاری این فلزات نیز شامل برهم‌کنش با آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اختلال در زنجیره انتقال الکترون یا اختلال در متابولیسم عناصر غذایی گیاهان است. به‌هرحال، گیاهان راهبردهایی را برای مقابله با اثرهای مخرب سمّیت فلزات سنگین در طول تکامل توسعه داده‌اند (Hayat *et al.*, 2012). گیاهان عالی برای مقابله با ROS مجهز به سیستم‌های دفاعی ضد اکسیداتیو شده‌اند (Guo *et al.*, 2004). تعادلی که بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در گیاهان وجود دارد، بر اثر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از قبیل شوری، تابش فرابنفش، خشکی، فلزات سنگین، درجه حرارت‌های بالا، کمبود عناصر غذایی، آلودگی هوا، حمله آفات و بیماری‌ها دچار اختلال شده و سبب آسیب رساندن به پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، ساختار DNA و در نهایت مرگ سلول می‌شود (Hsu & Kao, 2007) و می‌توانند ROS را از بین برده، خنثی و یا جاروب کنند. گیاهان با توسعه

یک سازوکار دفاعی ضدمیکروبی، می‌توانند خود را در مقابل آسیب‌های تنش اکسیداتیو محافظت نمایند. این سیستم شامل آنزیم‌های ضداکسیداسیون مانند CAT، SOD، APX، POX، GPX و نیز سیستم آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی مانند آسکوربات (Asc)، آلفا-توکروفرول (α-TOH)، کاروتنوئیدها و ترکیب‌های فنلی (phenolic contents)، پرولین و گلوتاتیون (GSH) می‌باشد (Shahid *et al.*, 2014). از لحاظ نقش مهم تنش‌های فلز سنگین در محیط ریشه، در این تحقیق عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی ریشه گیاه کنگر در مقابل حضور فلز سنگین کادمیوم آزمایش شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، کنگرهای خودروی بهاره از کوهستان کلی‌خان، شهرستان بانه در استان کردستان، در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور مرکز سنندج در سال ۱۴۰۰، پس از شستشو و جداسازی بخش ریشه‌ای برای عصاره‌گیری استفاده شدند. به این منظور بخش‌های ریشه کنگر در اردیبهشت‌ماه خریداری شده و پس از جدا کردن زوائد برگی، در محلول بنومیل ۲٪ به منظور جلوگیری از فعالیت قارچی ضدعفونی شدند. ریشه کنگر را با آب مقطر شسته و در حضور بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷ و محلول ۰/۰۲ PMSF به‌عنوان مهارکننده پروتئازی به کمک مخلوط‌کن هموژنیزه گردید. مخلوط هموژنیزه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفوژ شد. رسوب بالایی به مدت نیم ساعت در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شد و محلول شفاف بالایی به‌عنوان عصاره خام و انجام سنجش‌های بعدی یعنی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD، APX، GPX، PAL و PPO استفاده شد. برای اندازه‌گیری کمّی پروتئین نمونه‌ها از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). اساس روش برادفورد بر اتصال کوماسی برلیانت بلو G250 به پروتئین در محیط اسیدی و قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر بود. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و برحسب میلی‌مول بر گرم محاسبه گردید. میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر با غلظت پروتئین نسبت مستقیم دارد.

این طرح در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در ویال‌های محتوی ۳ میلی‌لیتر از عصاره ریشه کنگر با ۷ تیمار اجرا شد که در آن تیمارها شامل: گروه اول به‌عنوان شاهد که تنها در حضور آب مقطر تیمار شد. گروه دوم در معرض کلرید کادمیوم ($CdCl_2$) ۰/۲۵ میلی‌مولار، گروه سوم، چهارم، پنجم، ششم و هفتم به‌ترتیب در حضور ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار $CdCl_2$ به مدت ۱۰ دقیقه قبل از سنجش آنزیمی تیمار شدند. تیمار عصاره در دمای اتاق ۲۰ تا ۲۵ درجه و شرایط ۱۰ دقیقه نور طبیعی آزمایشگاه انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم با استفاده از روش Polle و همکاران (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱۸ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از H_2O_2 و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در لوله آزمایش ریخته شد. جذب نمونه براساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenway ساخت کشور انگلستان) به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده شد. از محلول واکنش بدون عصاره برای صفر کردن دستگاه استفاده شد.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO): برای اندازه‌گیری آنزیم PPO مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره

آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر متیل کاتکول ۰/۰۲ میلی‌مولار در ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی‌مولار با pH ۶/۷ می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم براساس شدت رنگ نارنجی متیل کاتکول تولید شده و در طول موج ۴۱۰ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی به‌ازای تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در دقیقه در میلی‌گرم بیان شد.

فعالیت کاتالاز (CAT): فعالیت سینتیکی آنزیم CAT به کمک روش Cakmak و همکاران (۱۹۹۳) اندازه‌گیری شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به همراه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر H_2O_2 مخلوط و در طول موج ۲۴۰ نانومتر سرعت حذف H_2O_2 به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان جذب H_2O_2 در بافر فسفات ۰/۴ تنظیم گردید که نقطه شروع برای اندازه‌گیری سینتیک سرعت بود. در این آزمایش ۲ میلی‌لیتر از بافر حاوی H_2O_2 فاقد عصاره آنزیمی به‌عنوان نمونه شاهد به منظور صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Jenway استفاده شد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت آنزیم SOD براساس روش پیشنهادی Giannopolitis و Ries (۱۹۹۷) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیترو بلو تترازولیوم کلراید (NBT) اندازه‌گیری شد. اساس اندازه‌گیری فعالیت SOD، اثر بازدارندگی این آنزیم با احیای نوری NBT است. مخلوط واکنش شامل ۲ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH 50 میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH ۱۰/۲، L-methionine ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در شدت نور تقریباً ۸۰۰۰ لوکس (در زیر نور خورشید) قرار گرفت. سپس در طول موج ۵۶۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Jenway جذب نمونه‌ها قرائت گردید.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (POX): فعالیت آنزیم POX به روش Nakano و Asada (۱۹۹۲) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار، آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار، پراکسیدهیدرژن ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم APX براساس میزان اکسیدشدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ۲/۸ بر سانتی‌متر بر میلی‌مولار تعیین گردید.

آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL): سنجش فعالیت PAL با استفاده از غلظت محصول حاصل یعنی اسید سینامیک انجام شد (Wang *et al*., 2007). بدین منظور ۳۰۰ میلی‌گرم از عصاره ریشه کنگر با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار حاوی بتامرکاپتواتانول ۱۵ میلی‌مولار در هاون سرد شده سائیده شد. سپس عصاره حاصل با دور ۵۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول بالایی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید. بدین‌منظور، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۶۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با pH ۸ و ۳۰۰ میکرولیتر محلول فنیل‌آلانین ۲۰ میلی‌مولار اضافه شد. مخلوط بدست آمده به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر HCl (۰/۵ مولار) متوقف گردید و محصول بوجود آمده با ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات استخراج و بعد اتیل استات بخار شد. ماده جامد باقیمانده در ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار حل شد و غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در

طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی برابر ۹۵۰۰ تعیین گردید.

ترکیب‌های فنلی کل: محتوای ترکیب‌های فنلی کل با استفاده از روش Velioglu و همکاران (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم از نمونه‌ها با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ حاوی اسید کلریدریک ۱٪ سائیده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر عصاره‌گیری کامل شد. سپس این مخلوط در ۳۰۰۰g سانتریفوژ و از محلول رویی برای تعیین ترکیب‌های فنلی کل استفاده شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر معرف فولین اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۶٪ به آن اضافه گردید. پس از ۹۰ دقیقه جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیب‌های فنلی کل، با استفاده از اسید گالیک منحنی استاندارد رسم گردید و غلظت ترکیب‌های فنلی برحسب میلی‌گرم بر گرم گزارش شد.

پرولین: برای تعیین مقدار پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. بدین‌منظور ۵ گرم از نمونه‌های عصاره ریشه کنگر در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به‌وسیله هاون هموژن شده و عصاره بدست آمده صاف گردید. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده حاصل ۲ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲ میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین (۰/۵ گرم نین‌هیدرین، ۲/۱ میلی‌لیتر اسید استیک و ۰/۸ میلی‌لیتر اسید اُرتوفسفریک ۶ مولار) اضافه شد. محلول بدست 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 ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تولوئن با استفاده از اسکپتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها برحسب میکرومول بر گرم محاسبه شد.

در این تحقیق برای تعیین بهترین ترکیب تیمار کادمیوم و حداکثر فعالیت آنزیم و دیگر ترکیب‌های مورد مطالعه با توجه به کمّی بودن تیمارها از تجزیه رگرسیون غیرخطی استفاده شد. بدین‌منظور توابع رگرسیون غیرخطی مورد استفاده در این تحقیق به‌صورت زیر بود.

مدل توانی

رابطه این مدل عبارت است از:

$$Y=aX^{\beta}$$ رابطه ۱:

که در آن a عبارت است از مقدار Y وقتی x=۱ باشد. شکل دقیق این مدل، به مقادیر و علامت ضرایب a و β بستگی دارد. شروط این تابع نیز عبارتند از: 1>β>0، a>0.

مدل رشد مجانب (Asymptotic growth model)

رابطه این مدل عبارت است از:

$$y=a-bc^{x}$$ رابطه ۲:

که در آن a، b و c ضرایب مدل هستند. a مقدار حداکثر (مجانب) y یا همان میزان فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد. مقادیر a و b همیشه مثبت هستند و مقدار c نیز بین صفر و یک است، با افزایش در مقدار x (غلظت کادمیوم)، مقدار y افزایش یافته و به مقدار a نزدیک می‌شود.

مدل بتا (Beta Model)

$$y = E_{max}\left[\left(\frac{c_e-x}{c_e-c_{max}}\right)\left(\frac{x-c_b}{c_{max}-c_b}\right)^{\frac{c_{max}-c_b}{c_e-c_{max}}}\right]^{\delta}$$ رابطه ۳:

که در آن x: غلظت کادمیوم، y: میزان فعالیت آنزیم، E_{max}: حداکثر فعالیت آنزیم، c_{max}: غلظت کادمیوم در زمان حداکثر فعالیت آنزیم، c_b: غلظت کادمیوم در زمان شروع فعالیت آنزیم و c_e: غلظت کادمیوم در زمان توقف فعالیت آنزیم است. عامل دلتا نیز از ضرایب مدل است.

مدل هذلولی (Hyperbolic model)

رابطه این مدل عبارت است از:

رابطه ۴: $$Y = aX/(k + X)$$

که در آن a و k ضرایب مدل هستند. a حداکثر مقدار Y (فعالیت آنزیم) است که با افزایش x (غلظت کادمیوم)، Y به آن نزدیک می‌شود. K ثابت میکائیلیس- منتن است و در ارزیابی آنزیم‌ها کاربرد فراوان دارد و عبارت است از مقداری از x (غلظت کادمیوم) که در آن Y (فعالیت آنزیم) به ۵۰٪ حداکثر سرعت اضافه شدن به مقدار a می‌رسد.

مدل نمایی مجانب (Asymptotic exponential model)

مدل نمایی مجانب یا مدل مونومولکولار در شرایطی استفاده می‌شود که مقدار متغیر تابع (فعالیت آنزیم) با گذشت زمان یا در اثر افزایش مقدار یک نهاده یا ماده تحریک‌کننده (غلظت کادمیوم) افزایش می‌یابد. تغییر در مقدار Y ابتدا سریع رخ می‌دهد ولی همان‌طور که Y به یک مقدار حداکثر نزدیک می‌شود، به‌تدریج کاهش می‌یابد. فرم این مدل عبارت است از:

رابطه ۵: $$Y = a\left[1 - e^{-k(x-x_0)}\right]$$

که در آن، a مقدار یا سطح مجانب (حداکثر) است که با افزایش در مقدار X، Y به آن نزدیک می‌شود. K سرعت نزدیک شدن Y به a و x_0 مقداری از x است که در آن مقدار Y صفر می‌باشد. برای برازش مدل‌های رگرسیون غیرخطی و مدل‌های توانی از رویه Proc nlin در محیط نرم‌افزار (SAS, 2009)، از روش مطلوب‌سازی تکراری استفاده شد (Khaliliaqdam & Talebzade, 2022). در این روش با هر بار وارد کردن مقادیر اولیه پارامترها، مقادیر نهایی آنها با روش کمترین توان‌های دوم تخمین زده می‌شود و تغییر مقادیر اولیه تا زمانی انجام می‌شود که بهترین برآورد از پارامتر بدست بیاید. برای سنجش دقت توابع و مقادیر شبیه‌سازی شده مدل‌های توانی و غیرخطی نیز از آماره‌های ریشه میانگین مربعات خطا، ضریب تبیین، ضریب تغییرات و شاخص AICc استفاده شد که رابطه آن برابر است با:

رابطه ۶: $$AICc = n\log(RSS/n) + 2k + (2k(k+1))/(n-k-1) \qquad \Delta_i = AICc_i - AICc_{\min}$$

که در آن AICc: شاخص آئیک تصحیح شده، RSS: مجموع مربعات باقیمانده‌ها، k: تعداد پارامترهای مدل، n: تعداد نمونه‌ها، $AICc_i$: شاخص آئیک برای هر مدل، $AICc_{min}$: کمترین مقدار شاخص آئیک محاسبه شده در بین مدل‌ها و مربوط به مدلی است که بهترین برازش را نشان داده است. Δ_i نیز اختلاف شاخص‌های آئیک هر مدل با کمترین مقدار شاخص بدست آمده است. اگر مقدار کمتر از ۱۰ باشد، به مفهوم عدم اختلاف در برازش مدل‌ها است و چنانچه بزرگتر از ۱۰ باشد، مدل با شاخص AICc بزرگتر مناسب نبوده و برازش خوبی بدست نمی‌آید (Khaliliaqdam, 2019).

نتایج

نتایج تجزیه رگرسیون غیرخطی فعالیت آنزیم‌های GPX براساس مدل توانی حکایت از معنی‌دار بودن رابطه رگرسیونی بین فعالیت آنزیم با سطوح مختلف کادمیوم بود

(جدول ۱). در تابع توانی، مقدار b یا شیب اولیه افزایش فعالیت آنزیم GPX، ۰/۱۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌مولار غلظت کادمیوم است. در این مدل بیشتر بودن توان مدل یا همان ضریب b، حکایت از بیشتر بودن شیب افزایش فعالیت آنزیم و نزدیکی خط تابع به مبدأ می‌باشد. به بیان ساده‌تر، بیشتر بودن مقدار این ضریب، بالا بودن سرعت افزایش فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد.

در مدل هذلولی (hyperbolic model) یا مدل میکائیل–منتن (Michaelis-Menten Model)، بیشترین فعالیت آنزیم GPX ۴/۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌مولار غلظت کادمیوم درون‌یابی شد. نتایج همچنین نشان داد که این بیشینه فعالیت آنزیم در غلظت ۱۸/۱۲ میلی‌مولار کادمیوم به‌وقوع پیوسته است. برازش تابع هذلولی به داده‌های فعالیت آنزیم در برابر سطوح مختلف کادمیوم نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۲).

نتایج استفاده از مدل‌های رشد مجانب و نمایی مجانب در استخراج نقطه حداکثر فعالیت آنزیم کاملاً مشابه و برابر ۴/۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود که این بیشینه فعالیت آنزیم در غلظت ۱۲/۳ میلی‌مولار کادمیوم بدست آمد. از دیگر ضرایب دارای کاربرد بیولوژیکی در مدل نمایی مجانب، ضریب K یا همان سرعت نزدیک شدن Y به a (سرعت نزدیک شدن فعالیت آنزیم به حداکثر مقدار خود) است که در این تابع مقدار آن ۰/۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر هر میلی‌مولار کادمیوم بود (جدول ۴). پر واضح است که بالا بودن مقدار این ضریب بیانگر پاسخ سریع‌تر آنزیم به ماده محرک بکار برده شده است. از مقدار این ضریب می‌توان در مقایسه انواع محرک‌ها برای فعال‌سازی یک آنزیم خاص استفاده کرد. نتایج تجزیه رگرسیون غیرخطی فعالیت آنزیم‌های APX براساس مدل توانی نیز حکایت از معنی‌دار بودن رابطه رگرسیونی بین فعالیت آنزیم با سطوح مختلف کادمیوم بود (جدول ۱). در تابع توانی، مقدار b یا شیب اولیه افزایش فعالیت آنزیم APX، ۰/۰۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌مولار غلظت کادمیوم بدست آمد. ضریب b، در رابطه استخراجی برای بیان فعالیت آنزیم در مقابل سطوح مختلف غلظت کادمیوم کمتر از مقدار درون‌یابی شده برای آنزیم GPX و SOD است که همین مورد حکایت از حساسیت اولیه کمتر آنزیم APX به حضور کادمیوم در محیط نسبت به دو آنزیم دیگر است. بررسی مدل هذلولی نیز نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم GPX ۴/۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌مولار غلظت کادمیوم درون‌یابی شد که همین بیشینه فعالیتی آنزیم در غلظت ۵ میلی‌مولار کادمیوم به‌وقوع پیوسته است. ثابت میکائیل–منتن (K_m) نیز در این مدل برابر ۰/۱ محاسبه شد. همچنین برازش تابع هذلولی به داده‌های فعالیت آنزیم در برابر سطوح مختلف کادمیوم در سطح ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۱– ضرائب مدل توانی در پاسخ فعالیت آنزیم‌های GPX، SOD و APX و محتوای پرولین و ترکیب‌های فنلی ریشه کنگر (*Gundelia tournefortii*) به سطوح مختلف کادمیوم

Table 1. Power model coefficients in response of GPX, SOD, and APX enzymes activity and proline or phenolics content of *Gundelia tournefortii* roots to different cadmium levels

Enzyme	a±se	b±se	P_{model}
GPX	3.49 ±0.07	0.11 ±0.011	0.001
SOD	3.65 ±0.04	0.16 ±0.0006	0.001
APX	3.18 ±0.05	0.07 ±0.007	0.001
Proline content	46.54 ±1.39	0.2 ±0.01	0.001
Phenolics content	46.76 ±0.34	1.24 ±0.15	0.001

GPX: Guaiacol peroxidase, SOD: Superoxide dismutase, APX: Ascorbate peroxidase; $Y=aX^b$

جدول ۲- ضرائب مدل هذلولی در پاسخ فعالیت آنزیم‌های GPX، SOD و APX و محتوای پرولین و ترکیب‌های فنلی ریشه کنگر (*Gundelia tournefortii*) به سطوح مختلف کادمیوم

Table 2. Hyperbolic model coefficients in response of GPX, SOD, and APX enzymes activity and proline or phenolics content of *Gundelia tournefortii* roots to different cadmium levels

Enzyme	a±se	k±se	P_{model}
GPX	5.45 ±0.33	0.186 ±0.09	0.001
SOD	3.24 ±0.15	0.34 ±0.109	0.001
APX	4.5 ±0.317	0.11 ±0.06	0.001
Proline content	79.26 ±3.90	0.57 ±0.12	0.001
Phenolics content	59.45 ±4.44	0.16 ±0.08	0.001

GPX: Guaiacol peroxidase, SOD: Superoxide dismutase, APX: Ascorbate peroxidase; Y=aX/(K+X)

نتایج بررسی فعالیت آنزیم APX در سطوح مختلف غلظتی کادمیوم برای هر دو مدل رشد مجانب و نمایی مجانب نشان داد که رابطه رگرسیون غیرخطی هر دو مدل در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲). معنی‌دار بودن رابطه رگرسیون غیرخطی حکایت از برازش مطلوب داده‌های فعالیت آنزیم در سطوح مختلف تیمار دارد. بر پایه این نتایج بالاترین فعالیت آنزیم APX در هر دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب، ۴/۷ میکروگرم در دقیقه در میلی‌گرم درون‌یابی شد که همین حداکثر فعالیت آنزیم مصادف با غلظت ۴/۶ میلی‌مولار کادمیوم بود. به‌عبارت دیگر، افزایش غلظت کادمیوم در محیط ریشه از مقدار شاهد (غلظت صفر تیماری) تا غلظت ۴/۶ میلی‌مولار سبب حداکثر فعالیت آنزیم APX گردید و افزایش غلظت کادمیوم از این سطح غلظتی به بعد تأثیری بر فعالیت آنزیم APX نداشت. مقادیر b و c در مدل رشد مجانب نیز از ضرایب مدل به‌حساب آمده و فاقد مفهوم بیولوژیکی خاصی هستند. اما در مدل نمایی مجانب دو ضریب دیگر تابع یعنی: k و x_0 دارای مفاهیم بیولوژیکی بوده و مقادیر آنها مهم می‌باشند.

سرعت نزدیک شدن به حداکثر فعالیت آنزیم بر پایه مدل نمایی مجانب، ۱/۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین به‌ازای هر میلی‌مولار کادمیوم درون‌یابی گردید که نسبت به دو آنزیم SOD و GPX بیشتر است و این بیانگر حساسیت بالاتر این آنزیم به حضور کادمیوم در محیط پیرامون خود است. بیشتر بودن این ضریب، در واقع بیانگر ضریب حساسیت بالاتر آنزیم به ماده محرک در است (جدول ۴).

SOD نیز یکی دیگر از آنزیم‌های بسیار مهم آنتی‌اکسیدان گیاهی است که حضور آن برای دفع اثرهای مخرب اکسیدکننده‌ها و رادیکال‌های آزاد بسیار حیاتی است. بررسی پاسخ سطح فعالیت این آنزیم به سطوح مختلف غلظتی کادمیوم با مدل توانی نشان داد که شیب اولیه افزایش فعالیت آنزیم (ضریب b) نسبت به دو آنزیم APX و GPX بیشتر بوده و این نشان‌دهنده حساسیت بالاتر این آنزیم به حضور کادمیوم است (جدول ۱).

در مدل هذلولی نیز بیشینه فعالیت SOD، ۵/۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود که این مقدار مشابه با ضریب b در مدل توانی از دو آنزیم دیگر (APX و GPX) بیشتر بود. ازاین‌رو، می‌توان گفت که حساسیت بیشتر آنزیم به حضور ماده محرک (کادمیوم)، افزایش بیشینه فعالیت آنزیم را در پی خواهد داشت (جدول ۲). به‌طور مشابه با دو آنزیم APX و GPX، مقادیر ضریب a یا همان حداکثر فعالیت آنزیم SOD در دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب مشابه و برابر ۵/۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۳) که این بیشینه فعالیت آنزیم دقیقاً مصادف با غلظت ۱۴/۳ میلی‌مولار کادمیوم بود. به بیان دیگر، آنزیم SOD در غلظت ۱۴/۳ میلی‌مولار کادمیوم به حداکثر فعالیت خود رسیده و افزایش غلظت کادمیوم در محیط بیشتر از این حد غلظتی، اثری بر

افزایش فعالیت آنزیم نخواهد داشت. همچنین مقدار عددی برآورد شده بیشینه فعالیت آنزیم SOD در دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب بیشتر از آنزیم‌های GPX و APX بود. سرعت نزدیک شدن به حداکثر فعالیت آنزیم SOD نیز بر پایه مدل نمایی مجانب ۰/۳۷ واحد بر میلی‌گرم پروتئین به‌ازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم بدست آمد (جدول ۴). شیب کمتر نزدیک شدن به حداکثر فعالیت آنزیم SOD نسبت به دو آنزیم GPX و APX با وجود شیب اولیه بیشتر این آنزیم نسبت به دو آنزیم یادشده می‌تواند بیانگر حساسیت کمتر آنزیم SOD به کادمیوم با افزایش غلظت در محیط رشد باشد. افزایش تولید و سنتز پرولین در طی بروز تنش‌های مختلف زیستی یا غیرزیستی در سلول‌های گیاهی یکی از نشانه‌های پاسخ گیاه به تنش است.

پرولین به‌عنوان یکی از رایج‌ترین اسمولیت‌های انباشته شده در شرایط تنش عمل می‌کند و به‌عنوان یک محافظ شیمیایی باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از بهم خوردن فرم طبیعی ترکیب‌های آنزیمی ممانعت می‌کند (Hayat *et al*., 2012). در مدل توانی شیب اولیه افزایش تولید پرولین ۰/۲ میلی‌گرم پروتئین به‌ازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم بدست آمده‌است. بیشینه تولید پرولین بر پایه مدل هذلولی نیز در غلظت ۱۸/۶ میلی‌مولار کادمیوم و برابر ۷۹/۳ میلی‌گرم مشاهده شد. ضمن اینکه مدل رگرسیون غیرخطی توانی و هذلولی برای این پروتئین نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول‌های ۱ و ۲). این در حالی بود که در توابع نمایی مجانب و رشد مجانب حداکثر تولید پرولین ۷۶/۶ میلی‌گرم و در سطح غلظتی ۱۳/۶ میلی‌مولار بدست آمده است که با مقدار احتسابی در مدل هذلولی دارای اختلاف است. سرعت نزدیک شدن Y به a (سرعت تولید پرولین و نزدیک شدن آن به بیشنه مقدار خود) در مدل نمایی مجانب نیز ۰/۵۴ میلی‌گرم محاسبه شد (جدول ۴). یکی از سازوکارهای حفاظتی غیرآنزیمی تحریک شده تحت تنش‌های غیرزیستی ازجمله تنش فلزات سنگین، بیوسنتز محتوای فنلی است. این ترکیب‌ها در شرایط مطلوب محیطی در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، اما تنش‌های محیطی مقدار آنها را در سلول تغییر می‌دهند.

در این تحقیق نیز حضور کادمیوم در عصاره ریشه کنگر منجر به افزایش سرعت تولید محتوای فنلی گردید. به‌نحوی که براساس مدل توانی میزان تولید این ترکیب‌ها در مراحل اولیه تولید، از پرولین و دیگر ترکیب‌های آنزیمی هم بیشتر بوده و برابر ۱/۲ میلی‌گرم به‌ازای هر واحد افزایش در غلظت کادمیوم بوده‌است (جدول ۱). براساس مدل هذلولی نیز بیشینه تولید این ترکیب‌ها در سطح غلظتی ۱۱/۵ میلی‌مولار کادمیوم بوقوع پیوست و برابر ۵۹/۶ میلی‌گرم بود (جدول ۲). در مدل‌های نمایی مجانب و رشد مجانب نیز بیشینه تولید محتوای فنلی با هم برابر بود و حدود ۶۱/۵ میلی‌گرم درون‌یابی گردید که مصادف با سطح غلظتی ۱۴/۳ میلی‌مولار کادمیوم بود (جدول‌های ۳ و ۴). نقطه حداکثر تولید این ترکیب‌ها در مدل هذلولی با مدل‌های نمایی مجانب و رشد مجانب دارای تفاوت بود و این به دقت توابع در استاج نقاط بستگی دارد. شیب نزدیک شدن تولید محتوای فنلی به حداکثر مقدار خود نیز در مدل نمایی مجانب، ۰/۴ میلی‌گرم به‌ازای افزایش در هر واحد غلظت کادمیوم بود (جدول ۴).

جدول ۳- ضرائب مدل رشد مجانب در پاسخ فعالیت آنزیم‌های **GPX**، **SOD** و **APX** و محتوای پرولین و ترکیب‌های فنلی ریشه کنگر (***Gundelia tournefortii***) به سطوح مختلف کادمیوم

Table 3. Growth exponential curve model coefficients in response of GPX, SOD, and APX enzymes activity and proline or phenolics content of *Gundelia tournefortii* roots to different cadmium levels

Enzyme	a±se	b±se	c±se	P_{model}
APX	4.46 ±0.029	1.74 ±0.05	0.72 ±0.02	0.001
GPX	4.56 ±0.10	1.93 ±0.15	0.55 ±0.07	0.001
SOD	5.62 ±0.13	3.09 ±0.16	0.69 ±0.04	0.001
Proline	76.56 ±0.95	52.30 ±1.34	0.65 ±0.04	0.001
Phenolic content	61.45 ±1.12	24.01 ±1.43	0.72 ±0.02	0.001

GPX: Guaiacol peroxidase, SOD: Superoxide dismutase, APX: Ascorbate peroxidase; $Y=a-bc^{x}$

جدول ۴- ضرائب مدل نمائی مجانب در پاسخ فعالیت آنزیم‌های **GPX**، **SOD** و **APX** و محتوای پرولین و ترکیب‌های فنلی ریشه کنگر (***Gundelia tournefortii***) به سطوح مختلف کادمیوم

Table 4. Asymptotic exponential model coefficients in response of GPX, SOD, and APX enzymes activity and proline or phenolics content of *Gundelia tournefortii* roots to different cadmium levels

Enzyme	X0±se	a±se	k±se	P_{model}
APX	-0.76 ±0.06	4.46 ±0.02	1.22 ±0.09	0.001
GPX	-1.47 ±0.37	4.56 ±0.1	0.58 ±0.12	0.001
SOD	-1.62 ±0.3	5.62 ±0.13	0.36 ±0.05	0.001
Proline	-0.76 ±0.06	76.56 ±0.95	0.54 ±0.04	0.001
Phenolic content	-2.24 ±0.44	61.45 ±1.12	0.41 ±0.07	0.001

GPX: Guaiacol peroxidase, SOD: Superoxide dismutase, APX: Ascorbate peroxidase; $Y=a[1-e^{-k(x-x0)}]$

در این تحقیق دقت مدل غیرخطی بتا بیشتر از سایر مدل‌های خطی و غیرخطی بدست آمد (جدول ۴). از ویژگی‌های این تابع منحنی سیگموئیدی اهمیت ضرایب استخراجی و مفهوم بیولوژیکی کاربردی این ضرایب است (Yin *et al.*, 2003). پارامتر E_{max} بیانگر حداکثر فعالیت آنزیم‌ها در غلظت خاصی از کادمیوم است (c_{max}). حداکثر فعالیت آنزیم PPO در غلظت ۸ میلی‌مولار کادمیوم بدست آمد (E_{max}=۲/۷). ضمن اینکه شروع فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۱۷ میلی‌مولار و پایان فعالیت آن در غلظت ۲۰/۶ میلی‌مولار کادمیوم پیش‌بینی شد. مقدار بتا نیز مؤید حد انحنای تابع سیگوئیدی ذکرشده بوده و در محدوده غلظت‌های بزرگتر یا کوچکتر از c_{max} دارای مقدار است (Yin *et al.*, 2003).

برای آنزیم CAT، حداکثر فعالیت آنزیم در غلظت ۴/۸ میلی‌مولار کادمیوم درون‌یابی گردید و مقدار آن برابر ۰/۵ میکروگرم در دقیقه در میلی‌گرم بود (جدول ۳). شروع فعالیت این آنزیم نیز در غلظت (نزدیک به غلظت محرک آنزیم PPO) ۰/۱۵ میلی‌مولار بدست آمد. پایان فعالیت CAT با ۲ میلی‌مولار افزایش نسبت به آنزیم PPO در غلظت ۲۷/۵ میلی‌مولار کادمیوم بود. مقادیر ضرایب مدل بتا برای آنزیم PAL به‌طور نسبی مشابه مقادیر ضرایب برازش مدل برای فعالیت آنزیم CAT است. بدین صورت که حداکثر فعالیت آنزیم برابر ۰/۳ میکروگرم در دقیقه در میلی‌گرم در غلظت ۴/۱ میلی‌مولار کادمیوم بدست آمد. همچنین غلظت‌های محرک شروع و پایان فعالیت PAL نیز به‌ترتیب برابر ۰/۰۴ و ۲۸/۱ میلی‌مولار بودند (جدول ۳). به بیان ساده‌تر، برای دستیابی به حداکثر فعالیت آنزیم CAT، PAL و PPO فقط نیاز به غلظت‌های به‌ترتیب ۴/۸، ۴/۱ و ۸ میلی‌مولار کادمیوم است و الزاماً غلظت‌های بالاتر عنصر، فعالیت بیشتر آنزیم را به‌دنبال ندارد. از نتایج دیگر این تابع

سیگموئیدی، درون‌یابی غلظت‌های محرک شروع و پایان فعالیت آنزیم‌هاست. سطح احتمال تابع برای هر سه آنزیم ذکرشده نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۵). معنی‌دار بودن مدل، یکی از دلایل قابل قبول برای استفاده از تابع است.

ضرایب عرض از مبدأ ضریب تبیین، جذر میانگین مربعات خطا، ضریب تغییرات و شیب رگرسیون در جدول ۶ بیانگر مقدار انحراف خط رگرسیون از مبدأ مختصات و مقدار انحراف یا خطای خط رگرسیون هستند که در حالت ایده‌آل باید عرض از مبدأ برابر صفر و شیب ۴۵ درجه برابر یک باشد (Soltani, 2009؛ Khaliliaqdam & talebzade, 2022). مقادیر عرض از مبدأ برای آنزیم‌های CAT، PAL و PPO به‌ترتیب برابر ۰/۰۲۹، ۰/۰۷ و ۰/۳۴ بدست آمد. نزدیک بودن مقادیر عرض از مبدأ به صفر برای هر سه آنزیم ذکرشده، بیانگر برازش مطلوب داده‌ها با استفاده از مدل بتا است. ضمن اینکه مقادیر شیب رگرسیون برازش داده‌های مشاهده شده در مقابل داده‌های پیش‌بینی شده متغیرهای ذکرشده نیز برای هر سه آنزیم CAT، PAL و PPO نزدیک به یک بدست آمدند (جدول ۶).

نتایج گزینش بهترین مدل برای برازش داده‌های سطح فعالیت آنزیم GPX در مقابل سطوح مختلف غلظت کادمیوم در عصاره ریشه کنگر برای شناخت نحوه پاسخ فعالیت این آنزیم به حضور کادمیوم در محیط رشد نشان داد که هر دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب با داشتن ضریب تبیین بالا، ضریب تغییرات پایین و ریشه میانگین مربعات خطای کم، از دقت یکسانی در پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم برخوردار بوده‌اند. به‌نحوی که بهترین مدل با استفاده از شاخص AICc (آئیک تصحیح شده) نیز هر دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب با کمترین مقدار شاخص AICc بودند (Δ_iبرابر صفر). دو مدل دیگر توانی و هذلولی با داشتن مقادیر Δ_iبالاتر دارای اختلاف معنی‌داری با دو مدل مجانب بودند و از صحت لازم برخوردار نبودند (جدول ۶). برازش داده‌های مشاهده شده و پیش‌بینی شده میزان فعالیت

جدول ۵- ضرائب مدل بتا در پاسخ فعالیت آنزیم‌های PPO، CAT و PAL ریشه کنگر (*Gundelia tournefortii*) به سطوح مختلف کادمیوم

Table 5. Beta model coefficients in response of PPO, CAT, and PAL enzymes activity and proline or phenolics content of *Gundelia tournefortii* roots to different cadmium levels

Enzyme	Delta±se	C_e±se	C_{max}±se	C_b±se	Emax±se	P_{model}
PPO	0.22 ±0.12	20.58 ±1.00	8.00±1.51	0.17 ±0.05	2.68 ±0.041	0.001
CAT	1.17 ±0.2	27.51 ±5.6	4.81 ±0.4	0.15 ±0.05	0.446 ±0.009	0.001
PAL	2.1 ±1.4	28.11 ±2.80	4.09 ±0.16	0.04 ±0.017	0.32 ±0.004	0.001

PPO, polyphenol oxidase; CAT, Catalase; PAL, phenylalanine amonialyase

جدول ۶- جذر میانگین مربعات خطا (RMSE)، ضریب تبیین (R^2)، عرض از مبدأ (a)، شیب رگرسیون (b) و ضریب تغییرات (CV) در مدل بتا براساس نتایج فعالیت آنزیم‌های PPO، CAT و PAL ریشه کنگر (*Gundelia tournefortii*) در برابر سطوح مختلف کادمیوم

Table 6. Root mean square error (RMSE), coefficient of determination (R^2), intercept (a), regression slope (b), and coefficient of variation (CV) in Beta model based on PPO, CAT, and PAL activity results of *Gundelia tournefortii* roots under different cadmium levels

Enzyme	a±Se	b±Se	R^2	RMSE	CV	P_{value}
PPO	0.34±0.17	0.83±0.08**	0.83	0.18	8.95	0.0001
CAT	0.029±0.01	0.95±0.095**	0.94	0.02	9.4	0.0001
PAL	0.07±0.03	0.87±0.15**	0.87	0.03	14.30	0.003

**: significant at 1% probability level; PPO: Polyphenol oxidase, CAT: Catalase, PAL: Phenylalanine amonialyase

آنزیم SOD با استفاده از چهار مدل توانی، هذلولی، رشد مجانب و نمایی مجانب نیز نشان داد که مدل رشد مجانب با دارا بودن شاخص AICc کمتر و Δ_i پایین‌تر، بهتر از سه مدل دیگر عمل کرد و با سه مدل دیگر دارای اختلاف معنی‌داری است. ضمن اینکه مقادیر ضریب تبیین بالا، ضریب تغییرات پایین و ریشه میانگین مربعات خطای کم از دیگر صفات بارز مدل رشد مجانب بود. از بین چهار مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی نحوه پاسخ APX به سطوح مختلف کادمیوم، نتایج دلالت بر مطلوب بودن مدل نمایی مجانب داشت، این در حالی بود که برای آنزیم SOD مدل رشد نمایی از مطلوبیت قابل قبول برخوردار بود. برای آنزیم APX مدل نمایی مجانب با دارا بودن Δ_i کمتر، بهتر از سه مدل دیگر عمل کرد و حتی دارای اختلاف معنی‌داری با هر سه مدل ذکرشده بود. از سویی، این مدل دارای ضریب تبیین بالا، ضریب تغییرات پایین و ریشه میانگین مربعات خطای کمتر نسبت به سه مدل توانی، هذلولی و رشد مجانب بود. برای دو ترکیب غیرآنزیمی پرولین و محتوای فنلی نیز نتایج از عدم اختلاف معنی‌دار بین دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب باهم و اختلاف معنی‌دار این دو مدل با دو مدل هذلولی و توانی، حکایت داشت. با این توضیح که مقدار Δ_i برای پرولین در مدل رشد مجانب و برای محتوای فنلی برای مدل نمایی مجانب کمتر بود. بااین‌حال، به لحاظ آماری استفاده از هر دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب برای پیش‌بینی میزان تولید پرولین و محتوای فنلی در حضور یک ماده محرک مانند کادمیوم، قابل قبول است (جدول ۷).

جدول ۷- جذر میانگین مربعات خطا (RMSE)، و ضریب تبیین (R^2)، عرض از مبدأ (a)، شیب رگرسیون (b) و ضریب تغییرات (CV) در مدل‌های هذلولی، توانی، رشد مجانب و نمایی مجانب براساس نتایج فعالیت آنزیم‌های GPX، SOD و APX و محتوای پرولین و ترکیبات فنلی ریشه کنگر (*Gundelia tournefortii* L.) به سطوح مختلف کادمیوم

Table 7. Root mean square error (RMSE), Coefficients of determination (R^2), Intercept (a), Regression slope (b), Correlation coefficient (r) and Coefficient variation (CV) in Hyperbolic, Power, Asymptotic growth curve and asymptotic exponential models in according to results of activity of GPX, SOD or APX and content of proline or phenolics of Gunnera to different cadmium levels

Enzyme	Models	a±Se	b±Se	RMSE	R^2	CV	P_{value}	AICc	Δ_i
GPX	Hyperbolic	-1.93±0.88**	1.43±0.23	0.89	63	26.55	0.0001	4.14	24.56
	Power	-2.1±0.84*	1.47±0.22**	0.38	67	25.23	0.0001	3.70	25.0
	Asymptotic growth curve	0.31±0.25*	0.91±0.06**	0.25	89	6.9	0.0001	-20.86	0.0
	Asymptotic exponential	0.31±0.25	0.91±0.06**	0.25	89	6.9	0.0001	-20.86	0.0
SOD	Hyperbolic	-1.49±0.55*	1.31±0.13**	0.78	81	20.62	0.0001	1.78	20.82
	Power	-1.45±0.50**	1.28±0.11**	0.25	84	18.87	0.0001	0.39	19.43
	Asymptotic growth curve	0.25±0.19**	0.93±0.04**	0.27	95	6.74	0.0001	-19.04	0.0
	Asymptotic exponential	1.88±0.17**	0.49±0.04**	0.24	89	6.29	0.0001	-0.56	18.48
APX	Hyperbolic	-4.12±0.87	1.98±0.22**	0.69	78	19.33	0.0001	3.71	47.68
	Power	-3.13±0.78	1.56±0.19**	4.86	73	23.04	0.0001	7.73	51.70
	Asymptotic growth curve	-0.07±0.39	0.92±0.09**	0.30	80	8.75	0.0001	-8.74	35.22
	Asymptotic exponential	-0.01±0.11	1.0±0.02**	0.09	98	2.30	0.0001	-43.96	0.0
Proline	Hyperbolic	-15.42±4.43**	1.22±0.07**	7.69	92	15.52	0.001	51.30	25.98
	Power	-10.31±5.47	1.13±0.09**	2.75	86	19.05	0.001	52.55	27.05
	Asymptotic growth curve	-0.98±1.39	0.98±0.02**	4241	99	4.54	0.0001	25.05	0.0
	Asymptotic exponential	-0.03±1.40	0.99±0.02**	2.44	99	4.64	0.0001	25.13	0.08
Phenolic content	Hyperbolic	-33.36±12.46*	1.58±0.24**	11.46	65	25.29	0.0001	58.05	31.49
	Power	-37.55±11.36**	1.66±0.22**	4.86	71	21.17	0.0001	57.50	30.49
	Asymptotic growth curve	4.70±2.81**	0.92±0.05**	2.59	92	5.11	0.0001	28.55	1.99
	Asymptotic exponential	2.17±2.79	0.94±0.05**	2.56	93	5.21	0.0001	26.56	0.0

* and **: significant at 5 and 1% probability levels, respectively; AICc:Corrected AIC coefficient ; Δ_i: Difference between AICs of models

بحث

در تحقیقات، در مواردی که سطوح تیمارها کمّی باشند، در صورت کافی بودن تعداد سطوح و در صورتی‌که واکنش صفت اندازه‌گیری شده به دامنه‌ای از سطوح تیمار کمّی وجود داشته باشد، راه درست، استفاده از تجزیه رگرسیون و بعد شرح و بحث براساس تجزیه رگرسیون است (Rezaei & Soltani, 1998). در صورت استفاده از این روش، باید خاطرنشان شود که بکارگیری این روش شامل چند مرحله اساسی است: ۱- بررسی نمودار پراکنش داده‌ها و حدس برازش نوع رابطه مناسب، ۲- برازش یک یا چند رابطه امیدبخش به داده‌ها و انتخاب رابطه بهتر و ۳- توضیح و تفسیر نتایج با استفاده از تجزیه رگرسیون (Soltani, 2006). در این تحقیق نیز در ابتدا نمودار پراکنش داده‌ها (فعالیت آنزیم یا پروتئین در مقابل سطوح مختلف کادمیوم رسم و بعد برای برازش داده‌ها از انواع معادلات رگرسیون خطی و غیرخطی استفاده شد. در گام بعدی، با توجه به برازش بهترین نوع رابطه (دید چشمی) برای تجزیه‌وتحلیل نوع پاسخ فعالیت آنزیم‌های SOD، APX، GPX، پرولین و محتوای فنلی از تجزیه رگرسیون غیرخطی (مدل‌های توانی، هذلولی، نمایی مجانب و رشد مجانب) و برای بیان نحوه پاسخ فعالیت آنزیم‌های CAT، PAL و PPO به سطوح مختلف کادمیوم از مدل بتا استفاده شد.

نتایج همه مدل‌ها حکایت از اثر تحریک‌کنندگی کادمیوم روی آنزیم‌های مورد مطالعه بود و پاسخ غیرخطی میزان تجمع کادمیوم در ریشه نیز منطبق با نتایج Amani و Alizade-Salteh (۲۰۲۰) بود. نتایج برخی محققان نشان داده است که فلزات سنگین و به‌ویژه کادمیوم به‌دلیل تحرک و پویایی زیاد در خاک و جذب توسط گیاه، ممکن است منجر به تغییراتی در فرایندهای فیزیولوژیکی در سطح سلولی و مولکولی شوند (Khatamipour *et al*., 2011). Eskandari و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان انباشت آن در گیاه افزایش پیدا کرده است. همسو با نتایج این بررسی، نتایج نشان داده است که فلز کادمیوم با دخالت در فرایندهای پراکسیداسیون لیپید در غشاءهای فتوسنتزی و ایجاد اختلالات متابولیسمی (از طریق تغییر در سطح فعالیت آنزیم‌ها)، تولید انواع اکسیژن واکنشگر را در سلول افزایش داده و منجر به وقوع تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود (Amani & Alizad-Salteh, 2020).

نتایج استفاده از مدل‌های رشد مجانب و نمایی مجانب در استخراج نقطه حداکثر فعالیت آنزیم GPX، کاملاً مشابه بدست آمد. در مدل نمایی مجانب، بالا بودن ضریب K یا همان سرعت نزدیک شدن فعالیت آنزیم به حداکثر مقدار خود بیانگر پاسخ سریع‌تر GPX در برابر کادمیوم بکار برده شده است. نتایج تجزیه رگرسیون غیرخطی فعالیت آنزیم‌های APX براساس مدل توانی نیز حکایت از معنی‌دار بودن رابطه رگرسیونی بین فعالیت آنزیم با سطوح مختلف کادمیوم بود. به‌طوری که شیب اولیه افزایش فعالیت آنزیم APX، در مقابل سطوح مختلف غلظت کادمیوم کمتر از مقدار درون‌یابی شده برای آنزیم SOD و GPX است که همین مورد حکایت از حساسیت اولیه کمتر آنزیم APX به حضور کادمیوم در محیط نسبت به GPX می‌باشد. بررسی مدل هذلولی نیز نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم GPX و به‌عبارتی سرعت نزدیک شدن به حداکثر فعالیت آنزیم بر پایه مدل نمایی مجانب، نسبت به دو آنزیم GPX و SOD بیشتر است و این بیانگر حساسیت بالاتر این آنزیم به حضور کادمیوم در محیط پیرامون خود می‌باشد. بیشتر بودن این ضریب، در واقع بیانگر ضریب حساسیت بالاتر آنزیم به ماده محرک است. بررسی پاسخ سطح فعالیت SOD به سطوح مختلف غلظتی کادمیوم با مدل توانی نشان داد که شیب اولیه افزایش فعالیت آنزیم نسبت به دو آنزیم APX و

GPX بیشتر بوده و این نشان‌دهنده حساسیت بالاتر این آنزیم به حضور کادمیوم است. در مدل هذلولی نیز بیشینه فعالیت SOD، نسبت به GPX و APX بیشتر بود. ازاین‌رو، حساسیت بیشتر SOD به کادمیوم، افزایش بیشینه فعالیت آنزیم را در پی خواهد داشت. همچنین مقدار عددی برآورد شده بیشینه فعالیت آنزیم SOD در دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب بیشتر از آنزیم‌های APX و GPX بود.

سرعت نزدیک شدن به حداکثر فعالیت آنزیم SOD نیز بر پایه مدل نمایی بیش از APX و GPX حاصل شد. شیب کمتر نزدیک شدن به حداکثر فعالیت آنزیم SOD نسبت به دو آنزیم APX و GPX با وجود شیب اولیه بیشتر این آنزیم نسبت به دو آنزیم یادشده می‌تواند بیانگر حساسیت کمتر آنزیم SOD به کادمیوم با افزایش غلظت در محیط رشد باشد. افزایش سطح محتوای فنلی و پرولین در گیاه به‌عنوان عوامل غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی در کنار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مواجه با فلزات سمّی مانند کادمیوم راهکاری برای گیاه به منظور جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن برای جلوگیری از اکسایش مولکول‌های زیستی یاخته‌های گیاهی محسوب می‌گردد تا از ایجاد تنش اکسیداتیو جلوگیری نماید و یا اثرهای آن را به حداقل برساند. ازاین‌رو، افزایش محتوای فنلی در مواجه با عناصری مانند کادمیوم یکی از سازوکارهای حفاظتی غیرآنزیمی در برابر تنش‌ها بوده تا تنش را کنترل کند. در بررسی مدل توانی نیز، شیب اولیه افزایش تولید پرولین نسبت به توابع نمایی مجانب و رشد مجانب دارای اختلاف است. در این تحقیق نیز حضور کادمیوم در عصاره ریشه کنگر منجر به افزایش سرعت تولید محتوای فنلی گردید. به‌نحوی که براساس مدل توانی، میزان تولید این ترکیب‌ها در مراحل اولیه تولید، از پرولین و دیگر ترکیب‌های آنزیمی هم بیشتر بود.

اهمیت آنزیم PAL و افزایش فعالیت آن در جهت افزایش دادن محتوای فنلی نیز قابل توجه است، زیرا PAL به‌عنوان آغازگر مسیر فنیل پروپانویید بوده که از طریق دآمیناسیون فنیل‌آلانین (Phenylalanine Deamination) به ترانس سینامیک اسید (Trans Cinamic Acid) منجر به افزایش سطح محتوای فنلی در مواجه با کادمیوم می‌گردد تا نقش خود را در فعال نمودن یکی از سازوکارهای دفاعی غیر آنزیمی در گیاه به انجام برساند. سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CAT و SOD و GPX نیز در مواجه با کادمیوم افزایش یافته تا با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولیدی فرایند سم‌زدایی از گیاه را انجام دهند و گیاه بتواند با بازدهی بالا تنش اکسیداتیو حاصل را خنثی کند. جلوگیری از جذب کادمیوم توسط ریشه‌های گیاه می‌تواند یکی از راهکارهای مهم در به حداقل رساندن اثر سوء این عنصر باشد. افزایش سطح فعالیت آنزیم‌هایی مانند GPX، SOD و APX و از گروه آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی افزایش پرولین و توکروفرول و فلانوئیدها به‌عنوان سرکوبگر ROSها از دیگر واکنش‌های گیاه به افزایش تجمع کادمیوم است (Solanki & Dhankhar, 2011). نتایج برخی تحقیقات نیز حکایت از افزایش قندهای نامحلول و افزایش فعالیت آنزیم GPX نسبت به شاهد در گیاه گلرنگ بود (Amir Gilaki & Mahmoodzade, 2016). نتایج مشابه دیگری نیز توسط Chen و همکاران (۲۰۱۱) و Behtash و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است. مدل‌های غیرخطی یکی از پرکاربردترین مدل‌ها برای بیان نحوه فعالیت آنزیم‌ها و دیگر فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیولوژیکی گیاهان و جانداران است. در این تحقیق نیز دقت مدل غیرخطی بتا بیشتر از سایر مدل‌های خطی و غیرخطی بدست آمد. از ویژگی‌های این تابع منحنی سیگموئیدی، اهمیت ضرایب استخراجی و مفهوم بیولوژیکی کاربردی این ضرایب است (Yin *et al*., 2003). کادمیوم

به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال آزاد منجر به افزایش میزان محتوای پرولین، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه کنگر می‌گردد و در ادامه تغییرات میزان فعالیت این آنزیم‌ها در طول رشد، نشان‌دهنده وجود سازوکارهای تنظیمی آنزیمی در ریشه کنگر در برابر تنش فلزات سنگین همچون کادمیوم می‌باشد. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی، پرولین و محتوای فنلی تولیدشده نقش کلیدی در پاسخ گیاه ریشه کنگر به تنش فلز سنگین کادمیوم ایفاء می‌کنند.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که مدل‌های رگرسیون غیرخطی یکی از کاربردی‌ترین روش‌های تجزیه‌وتحلیل برای بررسی فعالیت آنزیم‌ها به‌شمار می‌آیند. نتایج این تحقیق از منظر درون‌یابی نقاط حداکثر فعالیت آنزیم سایر ترکیب‌های مورد بررسی در سطوح مختلف کادمیوم مؤید استفاده از این روش‌ها بود. از سوی دیگر، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز افزایش عوامل آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی مانند پرولین و محتوای فنلی در عصاره ریشه کنگر از سازوکارهای دفاعی در برابر سمّیت حاصل از فلزات و عوامل مختلف محیطی مانند کادمیوم بود که پس از در معرض قرار گرفتن گیاه در برابر کادمیوم سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سایر عوامل غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد تا بتواند به‌عنوان یک راهکار دفاعی و مقاومتی در برابر تنش حاصل به دلیل مسیرهای بیوشیمیایی، رادیکال‌های اکسیژنی تولید شده در گیاه را به حداقل برساند و از آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری کند. بهترین مدل برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم GPX دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب، برای مدل SOD، بهترین مدل، مدل رشد مجانب، برای آنزیم APX نیز مدل نمایی مجانب با دارا بودن مقادیر کمتر Δ_i به‌عنوان بهترین مدل تشخیص داده شدند، هر چند که مقادیر این اعداد در هر دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب برای هر دو آنزیم یکسان بود. برای دو ترکیب غیرآنزیمی پرولین و محتوای فنلی نیز بهترین مدل‌ها دو مدل نمایی مجانب و رشد مجانب بودند که تأییدکننده نتایج حاصل از تحقیق بودند. این نتایج بخوبی بیانگر حساسیت متفاوت ترکیب‌های آنزیمی و غیرآنزیمی به حضور فلز سنگینی مانند کادمیوم در محیط رشد ریشه است و اینکه کادمیوم به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال آزاد منجر به افزایش میزان محتوای پرولین، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه کنگر می‌گردد.

References

- Amani, M. and Alizade-Salteh, S., 2020. Effect of heavy metal stress (cademium) on morphological and physiological chatacteristics of various medicinal plants. Journal of Biological safety, 11(4): 49-76.
- Amir Gilaki, M. and Mahmoodzade, H., 2016. Assesment of cademium effects on growth indexes, photosyentetics pigments and some biochemical parameters of Safflower. Journal of Plant environmental Physiological, 11(44): 33-43.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stressstudies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Behtash, F., Tabatabai, S., Malakooti, M., Sorouredin, M. and Ustan, S., 2010. Effect of cadmium and silisium on growth and physiological characters of *Beta vulgaris*. Journal of Agricultural Knowledge, 2(1): 53-67.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteinutilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Cakmak, I., Strboe, D. and Marschner, H., 1993. Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. Journal of Experimental Botany, 44: 127-132.
- Chen, X., Wang, J., Shi, Y., Zhao, M.Q. and Chi, G.Y., 2011. Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. Botanical Studies, 52: 41-46.
- Eskandari, S., Yadegari, M. and Iranipour, R., 2017. Assesment of accumulation amount of cademium and Pb in medicinal plant: Alis calendula officials.

Journal of Plant environmental Physiological, 12(47): 76-92.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 1997. Superoxid dismutase. I. occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59: 309-314.
- Gill, S.S., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry, 48: 909-930.
- Guo, T.G., Zhang, M., Zhou, F., Wu, Z. and Chen, J., 2004. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. Plant Soil, 258: 241-248.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. and Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments. Plant Signaling and Behavior, 7(11): 1456-1466.
- Hsu,Y.T. and Kao, C.H., 2007. Heat shock-mediated H2O2 accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. Plant Soil, 300: 137-147.
- Khaliliaqdam, N., 2019. Prediction of phenology, phyllochron and leaf area of wheat. Journal of plant production, 26(2): 89-99.
- Khaliliaqdam, N. and Talebzade, S.J., 2022. Prediction of rate of leaf appearance, leaf area index and growth stages in corn and sunflower. Crop Production, 15(1): 205-228.
- Khan, N., Samiullah, A., Singh, S. and Nazar, R., 2007. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. Journal of Agronomy and Crop Science, 193: 435-444.
- Khatamipour, M., Piri, E., Esaeilian, Y. and Tavassoli, A., 2011. The toxic effects of cademium on germination, seddling growth and prolin content of milk thistle. Scholars research library Annals Biology Research, 2(25): 527-532.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. and Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals occurrence and toxicity for plants: a review. Environmental Chemistry Letters, 8: 189-216.
- Nakano, Y. and Asada, K., 1992. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology, 28: 131-140.
- Polle, A., Eiblmeier, M., Sheppard, L. and 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 & Environment, 20: 1317-1321.
- Rezaei, A. and Soltani, A., 1998. An Introduction on Applied Regression. Industrial Isfahan university press, 294p.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. and Pinelli, E., 2014. Heavy-metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 232: 1-44.
- Solanki, R. and Dhankhar, R., 2011. Biochemical changes and adaptive strategies of plants under heavy metal stress. Biologia, 66(2): 195-204.
- Soltani, A., 2006. Revision On Application Of Statistical Methods In Agricultural Researches. JDM press, 74p.
- Soltani, A., 2009. Mathematical Modeling Of Crop. JDM press, 175p.
- Unyayar, S., Kele, Y. and 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.
- Vassilev, A., Tsonev, T. and Yordanov, I., 1998. Physiological response of barley plants to cadmium contamination in soil during ontogenesis. Environmental Pollution, 103: 287-293.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and 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.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Uratsu, R.L., Cui, M.G., Dandekar, A. and Fuchigami, L., 2007. Ectopic expression of Mn-SOD in Lycopersicon esculentum leads to enhanced tolerance to salt and oxidative stress. Journal of Applied Horticulture, 9: 3-8.
- Yin, X., Goudriaan, J., Lantinga, E.A., Vos, J. and Spiertz, H.J., 2003. Annals Botany, 91: 361-371.